



การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกและการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรด
แลคติกไอโซเมอร์ดีและแอลจากน้ำคั้นและกากลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยระบบการย่อย
พร้อมการหมัก

**Isolation and Screening of Lactic Acid Bacteria and Optimization for D- and L-
Lactic Acid Production from Oil Palm Sap and Trunk Residues through
Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)**

อัสมา บิลละเต๊ะ

Asma Billateh

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



การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกและการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรด
แลคติกไอโซเมอร์ดีและแอลจากน้ำคั้นและกากลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยระบบการย่อย
พร้อมการหมัก

**Isolation and Screening of Lactic Acid Bacteria and Optimization for D- and L-
Lactic Acid Production from Oil Palm Sap and Trunk Residues through
Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)**

อัสมา บิลละเต๊ะ

Asma Billateh

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 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกและการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ
ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีและแอลจากน้ำคั้นและกากลำต้นปาล์มน้ำมันด้วย
ระบบการย่อยพร้อมการหมัก

ผู้เขียน นางสาวอัสมา บิลละเต๊ะ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | คณะกรรมการสอบ |
|---|---|
| (ศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ เชียรศิลป์) |ประธานกรรมการ (ศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ) |
| |กรรมการ (ศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ เชียรศิลป์) |
| |กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร. สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล) |

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ดี ฟ้ารุ่งสว่าง)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ เชียรศิลป์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(นางสาวอัสมา บิลละเต๊ะ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาวอัสมา บิลละเต๊ะ)

นักศึกษา

| | |
|-----------------|---|
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกและการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีและแอลจากน้ำคั้นและกากลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยระบบการย่อยพร้อมการหมัก |
| ผู้เขียน | นางสาวอัสมา บิลละเต๊ะ |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| ปีการศึกษา | 2561 |

บทคัดย่อ

กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรียแลคติกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพได้ กรดแลคติกมีสองไอโซเมอร์ คือ กรดแลคติกไอโซเมอร์แอล (+) และไอโซเมอร์ดี (-) งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์มโดยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก น้ำคั้นลำต้นปาล์มประกอบไปด้วยน้ำตาลอิสระ 38-40 กรัมต่อลิตร โดยมีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลไซโลส ที่ความเข้มข้น 26.90 ± 0.06 , 9.18 ± 0.25 , 4.39 ± 0.25 และ 3.04 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ $0.6-0.7$ กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถใช้เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพื่อผลิตกรดแลคติก

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถเจริญและผลิตกรดแลคติกได้ดีเมื่อเลี้ยงในน้ำคั้นลำต้นปาล์ม โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร เลี้ยงภายใต้สภาวะควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที พบว่าการควบคุมพีเอชทำให้แบคทีเรียแลคติกมีการผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่าสภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอช โดยพบว่าสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอลเป็นหลักคือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 และสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลักคือ *Lactobacillus kefir* KF1 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 21.98 ± 3.36 และ 19.31 ± 1.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นผลผลิต 0.80 ± 0.12 และ 0.75 ± 0.04 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ

ส่วนกากลำต้นปาล์ม (oil palm trunk, OPT) หลังจากการคั้นน้ำสามารถแยกออกได้เป็นสองส่วนคือ ส่วนที่เป็นเส้นใย (vascular bundle, OPT-VB) ($0.75-2.0$ มิลลิเมตร) และส่วนที่เป็นพอง (parenchyma, OPT-PA) (<0.75 มิลลิเมตร) โดย OPT-VB ประกอบด้วยเซลลูโลสร้อยละ 56.60 เซมิเซลลูโลสร้อยละ 23.44 ลิกนินร้อยละ 13.70 และแป้งร้อยละ 4.76 ในขณะที่ OPT-PA ประกอบด้วยเซลลูโลสร้อยละ 37.1 เซมิเซลลูโลสร้อยละ 29.8 ลิกนินร้อยละ 18.4 และแป้งร้อยละ 25.09 จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 และ

L. kefir KF1 จากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์ม (OPT-VB) โดยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก พบว่าปริมาณกากลำต้นปาล์มร้อยละ 10 และการเติมเอนไซม์เซลลูเลส 15 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัม เป็นสถานะที่ทำให้เชื้อผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 64.94 ± 0.51 และ 23.4 ± 0.35 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตเท่ากับ 0.68 ± 0.01 และ 0.30 ± 0.01 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ โดยมีต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.12 บาทต่อกรัมกรดแลคติก จากการเพิ่มอัตราการใช้กากลำต้นปาล์มโดยการย่อยพร้อมการหมักแบบกะขี้โดยเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ถึง 5 รอบการหมัก โดยปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ในแต่ละรอบเท่ากับ 63.0 ± 0.44 , 71.4 ± 1.07 , 67.2 ± 1.71 , 56.2 ± 1.67 และ 50.5 ± 0.47 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาการเก็บเกี่ยวกรดแลคติกจากสารละลายกรดแลคติก โดยเรซินแลกเปลี่ยนประจุแบบเบสแก่ Amberlite IRA-402 พบว่าไอโซเทอมการดูดซับ (adsorption isotherm) สามารถทำนายได้ดีด้วยแบบจำลองแบบ Freundlich และเมื่อทำการเก็บเกี่ยวกรดแลคติกจากน้ำหมักโดยคอลัมน์ Amberlite IRA-402 ด้วยอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที และชะด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ให้ผลการเก็บเกี่ยวเท่ากับร้อยละ 24.1 ของปริมาณกรดแลคติกทั้งหมดในน้ำหมัก

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ผงลำต้นปาล์ม OPT-PA เป็นตัวพุงสำหรับตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลส โดยพบว่า OPT-PA มีประสิทธิภาพการตรึงรูปถึงร้อยละ 79.06 และยังมีความคงตัวทางความร้อนที่สูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสอิสระ ผลจากวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือหรือชีวมวลจากการเกษตรเพื่อผลิตกรดอินทรีย์และตรึงรูปเอนไซม์

Thesis title Isolation and Screening of Lactic Acid Bacteria and Optimization for D and L-Lactic Acid Production from Oil Palm Sap and Trunk Residues through Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

Author Miss Asma Billateh

Major Program Biotechnology

Academic Year 2018

ABSTRACT

Lactic acid (LA) is an organic acid produced by lactic acid bacteria (LAB) and can be used as a monomer feedstock for biodegradable plastic. There are two optical isomers of lactic acid, L(+) and D(-)-lactic acid. This study investigated the process integration strategy for LA production from oil palm sap (OPS) and oil palm trunk (OPT) as mixed substrates through simultaneous saccharification and fermentation (SSF). OPS contained high sugar concentration of 38-40 g/L (26.90±0.06 g/L glucose, 9.18±0.25 g/L fructose, 4.39±0.25 g/L sucrose, 3.04±0.06 g/L xylose) and nitrogen concentration of 0.6-0.7 g/L. It can be used as both carbon and nitrogen source.

OPS at sugar concentration of 30 g/L was used as a sole medium for screening of LAB with high LA production. The cultivation was performed at 37 °C, 100 rpm for 72 h under condition with and without pH control at 5.5. LAB produced higher LA under pH control condition than uncontrolled pH condition. *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 and *Lactobacillus kefir* KF1 could grow well in OPS and gave the highest LA production of 21.98±3.36 g/L (L-isomer 62.7%) and 19.31±1.11 g/L (D-isomer 75.4%), respectively, with LA yield of 0.80±0.12 and 0.75±0.04 g/g-available sugar, respectively under condition with pH control.

The OPT residues could be separated into vascular bundle (OPT-VB) (0.75-2.0 mm) and parenchyma (OPT-PA) (<0.75 mm). As OPT-VB contained 56.60% cellulose, 23.44% hemicellulose, 13.70% lignin and 4.76% starch. OPT-PA contained 37.1% cellulose, 29.8% hemicellulose, 18.4% lignin and 25.09% starch. OPS added with OPT were used as a sole medium for LA production. The cultivation was performed at 37°C, 200 rpm and pH 5.5 for 120 h. The optimal conditions for LA production by *L. acidophilus* TISTR 1338 and *L. kefir* KF1 through SSF were OPT loading at 10% w/v in OPS and cellulase loading at 15 FPU/g-OPT. The highest LA production obtained were 64.94±0.51 g/L and 23.45±0.35g/L, respectively, with LA yield of 0.68±0.01 and 0.30±0.01 g/g-available sugar, respectively. The medium cost of LA production

from OPS and OPT through SSF process was 0.12 Baht/g-LA. The repeated SSF was performed for five cycles for efficient utilization of OPT. The LA production by *L. acidophilus* TISTR 1338 using this strategy remained high at 63.05 ± 0.44 , 71.41 ± 1.07 , 67.21 ± 1.71 , 56.21 ± 1.67 and 50.48 ± 0.47 g/L, respectively.

The recovery of lactic acid using strong base anion resin of Amberlite IRA-402 was performed. The adsorption isotherms were closely predicted by the Freundlich model. The fermentation broth containing lactate was loaded onto the column adsorption at the flow rate of 2.0 mL/min and desorbed by 1 M HCl at the flow rate of 2.0 mL/min resulted in percent recovery of 24.1% from fermentation broth.

In addition, this study has explored the possibility to use OPT-PA as a carrier for immobilization of cellulase enzyme by physical adsorption resulting in immobilization efficiency of 79.06%. Comparative evaluation of the free and immobilized enzyme showed that the immobilized enzyme was more thermostable than the free form. This study has provided a promising strategy for efficient use of cellulosic agricultural wastes for production of organic acids and immobilization of enzyme.

LIST OF TABLES

| Table | | Page |
|--------------|---|-------------|
| 1 | Characterization of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. | 7 |
| 2 | List of homo and hetero fermentative lactic acid bacteria and configuration of lactic acid produced. | 8 |
| 3 | Analysis of vascular bundle and parenchyma. | 16 |
| 4 | Free sugars contained in sap from felled oil palm trunk. | 16 |
| 5 | Organic acid contained in sap from the inner part of felled oil palm trunk. | 17 |
| 6 | Amino acids contained in sap from the inner part of felled oil palm trunk. | 18 |
| 7 | Vitamins contained in sap from the inner part of felled oil palm trunk. | 18 |
| 8 | Minerals contained in sap from the inner part of felled oil palm trunk. | 19 |
| 9 | The content of cellulose, hemicellulose and lignin in common agricultural residues and wastes. | 20 |
| 10 | Summary of condition in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosic biomass for lactic acid production. | 31 |
| 11 | Summary lactic acid production through SSF process by various operation mode. | 34 |
| 12 | Comparative evaluation of the merits and drawbacks of various enzyme immobilization method. | 44 |
| 13 | Analysis of sugar and organic acid contained in sap from felled oil palm trunk. | 65 |
| 14 | Sugar composition in oil palm sap by various study. | 66 |
| 15 | Composition analysis of vascular bundle and parenchyma. | 67 |
| 16 | Total plate count by using spread plate on MRS agar supplemented with 0.02% bromocresol purple. | 68 |
| 17 | Characteristics of isolated lactic acid bacteria. | 68 |
| 18 | Lactic acid production by each isolate from kefir grains after 48 h of cultivation. | 70 |

LIST OF TABLES (CONT.)

| Table | | Page |
|--------------|---|-------------|
| 19 | Lactic acid production by each isolate from oil palm sap and stock culture after 48 h of cultivation. | 71 |
| 20 | Detection of isomeric form and optical purity by using D/L lactic acid assay kit and detected lactic acid and acetic acid production by HPLC after 48 h of cultivation. | 72 |
| 21 | Identification of the selected L-lactic acid producing strains by 16S rDNA sequence analysis. | 73 |
| 22 | Lactic acid, acetic acid and ethanol production by lactic acid bacteria cultivated in sap broth (total sugar 30 g/L) with and without pH controlled detected by HPLC. | 80 |
| 23 | Effect of OPT loading on LA production, yield and productivity from SSF of OPS and OPT by <i>L. acidophilus</i> TISTR 1338. | 85 |
| 24 | Effect of OPT loading on LA production, yield and productivity from SSF of OPS and OPT by <i>L. kefir</i> KF1. | 88 |
| 25 | Effect of cellulase loading on LA production, yield and productivity from OPS and OPT through SSF by <i>L. acidophilus</i> TISTR 1338. | 93 |
| 26 | Effect of cellulase loading on LA production, yield and productivity from OPS and OPT through SSF by <i>L. kefir</i> KF1. | 95 |
| 27 | Production cost of lactic acid from 1 L oil palm sap and 10% oil palm trunk through SSF. | 96 |
| 28 | Repeated SSF of OPS and OPT on LA production, yield and productivity by <i>L. acidophilus</i> TISTR 1338. | 99 |
| 29 | Scale up to 1 L of the repeated-OPT of <i>L. acidophilus</i> TISTR 1338 cultivation in sap and oil palm trunk residues through SSF process detected by HPLC. | 101 |

LIST OF TABLES (CONT.)

| Table | | Page |
|--------------|--|-------------|
| 30 | Fitting parameters of model. | 105 |
| 31 | Characteristics of fermentation broth before and after decolorization. | 109 |
| 32 | Column separation of organic acid from fermentation broth. | 110 |
| 33 | 16S rDNA sequence of <i>Lactobacillus paracasei</i> F16. | 152 |
| 34 | 16S rDNA sequence of <i>Lactobacillus kefirii</i> KF1. | 153 |

LIST OF FIGURES

| Figures | | Page |
|----------------|---|-------------|
| 1 | Structure of D(-) and L(+) isomers of the lactic acid. | 3 |
| 2 | Metabolic pathway for lactic acid production from various sugar by LAB. | 6 |
| 3 | Wastes from oil palm tree. | 15 |
| 4 | Images of felled oil palm trunks and diagrams of sample preparation for analyses. (A) Felled trunks carried to a plywood factory. (B) A disk taken from a trunk. (C, D) Disks were cut into inner (a), middle (b), and outer (c) parts. | 17 |
| 5 | Lignocellulose network. | 20 |
| 6 | Mechanism of cellulase. | 25 |
| 7 | The traditional process of lactic acid purification: extraction by precipitation. | 35 |
| 8 | Isoterm type. | 38 |
| 9 | Three common type of adsorption isotherm. | 39 |
| 10 | Concentration profiles for adsorption in fixed bed (a) profiles at various positions and times in the bed, (b) breakthrough concentration profile in the fluid at the outlet of bed. | 41 |
| 11 | Schematic of the experimental procedure. | 55 |
| 12 | Process diagram of lactic acid recovery units. | 61 |
| 13 | Preparation of oil palm sap (a) and oil palm trunk (b). | 65 |
| 14 | Characteristics of separated vascular bundle (a) and parenchyma (b) of oil palm trunk. | 67 |
| 15 | Phylogenetic tree of selected strains on 16S rDNA sequence analysis. | 74 |
| 16 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> TISTR 1338 cultivated in oil palm sap under condition without pH control (a) and with pH control (b). | 77 |
| 17 | <i>Lactobacillus casei</i> cultivated in oil palm sap under condition without pH control (a) and with pH control (b). | 77 |

LIST OF FIGURES (CONT.)

| Figures | | Page |
|----------------|---|-------------|
| 18 | <i>Lactobacillus paracasei</i> F16 cultivated in oil palm sap under condition without pH control (a) and with pH control (b). | 78 |
| 19 | <i>Lactobacillus kefirarafaciens</i> JCM 6985 cultivated in oil palm sap under condition without pH control (a) and with pH control (b). | 78 |
| 20 | <i>Lactobacillus kefir</i> KF1 cultivated in oil palm sap under condition without pH control (a) and with pH control (b). | 79 |
| 21 | Lactic acid production by <i>L. acidophilus</i> TISTR 1338 at sap concentration of 40 g/L with different substrate loading; (a) total acid, (b) total sugar and (c) reducing sugar. | 84 |
| 22 | HPLC profiles of lactic acid production by <i>L. acidophilus</i> TISTR 1338 at sap concentration of 40 g/L with diferent OPT loading; (a) 5%, (b) 10% and (c) 15%. | 86 |
| 23 | Lactic acid production by <i>L. kefir</i> KF1 at sap concentration of 40 g/L with different substrate loading; (a) total acid, (b) total sugar and (c) reducing sugar. | 87 |
| 24 | Effect of enzyme loading on LA production from OPS and OPT through SSF by <i>L. acidophilus</i> TISTR 1338; (a) total acid, (b) total sugar and (c) reducing sugar. | 92 |
| 25 | Effect of enzyme loading on LA production from OPS and OPT through SSF by <i>L. kefir</i> KF1; (a) total acid, (b) total sugar and (c) reducing sugar. | 94 |
| 26 | Repeated SSF of OPS and OPT by <i>L. acidophilus</i> TISTR 1338 using OPS with sugar concentration of 40 g/L, 10% (w/v) OPT and 15 FPU/g cellulase loading of each batch; (a) solid residues, (a) total sugar, and (b) total acid. | 98 |
| 27 | 1 L of repeated SSF of OPS and OPT by <i>L. acidophilus</i> TISTR 1338 using OPS with sugar concentration of 40 g/L, 10% (w/v) OPT and 15 FPU/g cellulase loading of each batch; (a) total acid, (a) total sugar, and (b) total reducing sugar. | 100 |

LIST OF FIGURES (CONT.)

| Figures | | Page |
|----------------|--|-------------|
| 28 | Batch adsorption of LA (a) and efficiency (b) on anion exchange resin Amberlite IRA-402 at 30°C, 150 rpm. Different resin amounts were added in 2.5 mL of 100 g/L lactic acid solution (pH 5). | 102 |
| 29 | Adsorption equilibrium data of lactic acid on to Amberlite IRA-402 at 30 °C, pH 5 and 150 rpm. The resin of 20% loading added in LA solution with different LA concentrations (a), the adsorption isotherm at equilibrium (b). | 104 |
| 30 | Adsorption isotherm of lactic acid on Amberlite IRA-400. (a) Langmuir and (b) Freundlich. | 105 |
| 31 | Desorption of lactate species from Amberlite IRA-402 resins. Equilibrated resins were soaked in 100 g/L solutions at the ratio of 0.5 g resin to 2.5 mL solution at 30 °C, 200 rpm. | 106 |
| 32 | Column adsorption of LA solution of 85 g/L and pH 5.43 with flow rate 2.0 mL/min. | 107 |
| 33 | Fermentation broth before (a) and after (b) decolorization by 4% activated carbon. | 108 |
| 34 | Batch adsorption of LA from fermentation broth. | 109 |
| 35 | Column adsorption of LA from fermentation broth. | 109 |
| 36 | Chromatogram of desorption of lactic acid from saturated lactic acid from on resins. | 110 |
| 37 | Fiber surface of oil palm wood (a): vascular bundle, (b): SEM image of vascular bundle (500X), (c): parenchyma cell, (d): SEM image of parenchyma (200X). | 111 |
| 38 | Effect of pH on immobilized cellulase and free cellulase at different pH of 3, 4, 5, 5.5, 6 and 7 incubated at 50°C for 10 min. | 113 |
| 39 | Effect of temperature on immobilized cellulase and free cellulase at pH 5 incubated at with different temperature of 30, 0, 50 60 and 70°C. | 114 |

LIST OF FIGURES (CONT.)

| Figures | | Page |
|----------------|---|-------------|
| 40 | Thermal stability of free and immobilized cellulase after incubation for 3 h at (a) 37°C (b) 50°C and (c) kd determination. | 116 |
| 41 | Reusability study of immobilized cellulase. | 118 |
| 42 | Storage stability of immobilized cellulase for 10 weeks at 4°C. | 119 |
| 43 | Standard curve of glucose by phenol-sulphuric method. | 140 |
| 44 | Standard curve of lactic acid analyzed by HPLC. | 142 |
| 45 | Standard curve of acetic acid analyzed by HPLC. | 142 |
| 46 | Standard curve of ethanol analyzed by HPLC. | 143 |
| 47 | Standard curve of glucose analyzed by HPLC. | 144 |
| 48 | Standard curve of sucrose analyzed by HPLC. | 144 |
| 49 | Standard curve of fructose analyzed by HPLC. | 145 |
| 50 | Standard curve of xylose analyzed by HPLC. | 145 |
| 51 | Standard curve of arabinose analyzed by HPLC. | 146 |
| 52 | Standard curve of starch concentrations. | 146 |
| 53 | Chromatogram of standard sugar and metabolite product analyzed at concentration of 1 g/L. | 147 |
| 54 | Chromatogram of standard sugar and metabolite product analyzed at concentration of 2.5 g/L. | 147 |
| 55 | Chromatogram of standard sugar and metabolite product analyzed at concentration of 5 g/L. | 148 |
| 56 | Chromatogram of standard sugar and metabolite product analyzed at concentration of 10 g/L. | 148 |
| 57 | LAB obtained from OPS isolation. | 149 |
| 58 | LAB obtained from kefir grains isolation. | 150 |
| 59 | Preparation of oil palm sap and oil palm trunk isolation. | 154 |
| 60 | Column adsorption of lactic acid from fermentation broth. | 155 |

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิทยานิพนธ์เรื่อง การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกและการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีและแอลจากน้ำคั้นและกากลำต้นปาล์มน้ำมัน ด้วยระบบการย่อยพร้อมการหมัก ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ เชียรศิลป์ เป็นอย่างสูง ที่ให้โอกาส ให้การชี้แนะแนวทางในการทำวิจัย ให้กำลังใจและสนับสนุนทุนในการวิจัย ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ และรองศาสตราจารย์ ดร. สาโรจน์ ศิริสันตนิยกุล ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการให้ข้อเสนอแนะและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรมทุกท่านที่คอยอบรมให้ความรู้ และให้คำแนะนำที่ดีตลอดระยะเวลาที่ศึกษา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณครอบครัวที่ให้กำลังใจและสนับสนุนตลอดมา และขอขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆในห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวภาพ (BPE lab) ที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือ สถานที่และสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

อัสมา บิลละเต๊ะ

สารบัญ

| | หน้า |
|----------------------------------|------|
| บทคัดย่อ (ภาษาไทย) | (5) |
| บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) | (7) |
| กิตติกรรมประกาศ | (16) |
| สารบัญ | (17) |
| LIST OF TABLES | (9) |
| LIST OF FIGURES | (12) |
| บทที่ | |
| 1 บทนำ | 1 |
| บทนำตั้งเรื่อง | 1 |
| บทตรวจเอกสาร | 3 |
| วัตถุประสงค์ | 46 |
| ขอบเขตงานวิจัย | 46 |
| 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง | 47 |
| วัสดุและอุปกรณ์ | 47 |
| วิธีการวิเคราะห์ | 48 |
| วิธีการดำเนินการวิจัย | 56 |
| 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง | 64 |
| 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ | 120 |
| เอกสารอ้างอิง | 122 |
| ภาคผนวก | 136 |
| ประวัติผู้เขียน | 156 |

บทที่ 1

บทนำ

บทนำสั้นเรื่อง

กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายอุตสาหกรรม เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารจะใช้สำหรับการถนอมอาหารเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางจะใช้กรดแลคติกเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น โลชั่น สบู่ แชมพู ผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้ผิวหนังและช่วยในการรักษาผิว (Wee *et al.*, 2006) ผลิตภัณฑ์สำหรับช่องปาก เช่น แคลเซียมแลคเตท เพื่อป้องกันฟันผุ และยับยั้งการก่อตัวของหินปูน ในรูปของส่วนผสมของยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปาก ผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม โดยใช้กรดแลคติกเป็นส่วนผสมเพื่อทำหน้าที่เคลือบให้เส้นผมเงางามผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดร่างกาย โดยใช้แคลเซียมแลคเตทเป็นส่วนผสมเพื่อทำหน้าที่ให้ความชุ่มชื้นและผลัดเซลล์ผิว เช่น ครีมอาบน้ำ สบู่ แชมพู เป็นต้น นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการนำกรดแลคติกมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพอลิแลคติก (Polylactic acid, PLA) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ใช้ผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics) จึงจัดเป็นพอลิเมอร์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สามารถทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนาน และก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม (Datta *et al.*, 2006) ซึ่งกรดแลคติกจะมีโครงสร้าง 2 รูปแบบที่เป็นไอแนนติโอเมอร์กัน คือ กรดแลคติกไอโซเมอร์แอล และกรดแลคติกไอโซเมอร์ดี สามารถผลิตได้ทั้งจากการสังเคราะห์ทางเคมีและการหมักของจุลินทรีย์ ซึ่งในปัจจุบันส่วนใหญ่นิยมผลิตจากการหมักของจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบราคาถูก เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ใช้พลังงานและอุณหภูมิที่ต่ำในการผลิต นอกจากนี้กรดแลคติกที่ได้ยังมีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง (High optical purity) (John *et al.*, 2007)

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตกรดแลคติก ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก ยีสต์ และรา แต่โดยส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรียแลคติกในการผลิตกรดแลคติก เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกจะผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักและให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 1.0 กรัมต่อกรัมกลูโคส (Meussen *et al.*, 2012) ในขณะที่ยีสต์ผลิตกรดแลคติกเป็นผลพลอยได้มากกว่าเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (Abdel-rahman *et al.*, 2013) ส่วนเชื้อรามีโครงสร้างเป็นเส้นใยทำให้มีข้อจำกัดในการส่งถ่ายสารทำให้ได้ผลผลิตต่ำ (Sun *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียแลคติกเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน เช่น วิตามิน เกลือแร่ และกรดอะมิโนบางชนิดที่ช่วยในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติก (Wang *et al.*, 2015) ดังนั้นจึงทำให้มีต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่อนข้างสูง จึงมีหลาย

งานวิจัยที่สนใจนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้ในการเลี้ยงและผลิตกรดแลกติกเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยหนึ่งในวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่น่าสนใจทางภาคใต้คือ ลำต้นปาล์มน้ำมัน ซึ่งเมื่อต้นปาล์มน้ำมันมีอายุ 20-25 ปี จะไม่สามารถให้ผลปาล์มได้อีกจึงต้องตัดทิ้ง ในขณะที่ประเทศไทยมีพื้นที่ของปาล์มน้ำมันที่รอโค่นประมาณ 20,000-45,000 ไร่ต่อปี (สมพงษ์ และ อลิศรา, 2552) ทำให้ในแต่ละปีมีชีวมวลจากลำต้นปาล์มประมาณ 1.44 ล้านตัน (Noparat *et al.*, 2017) โดยลำต้นปาล์มสดจะมีความชื้นสูงถึงร้อยละ 80 เมื่อนำมาคั้นน้ำจะได้น้ำคั้นที่มีปริมาณน้ำตาลสูงประกอบไปด้วยน้ำตาลหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโทส และน้ำตาลไซโลส และสารอาหารอื่นๆ เช่น กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุ (Kosugi *et al.*, 2010) ซึ่งองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในน้ำคั้นลำต้นปาล์มถือได้ว่ามีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ สำหรับกากลำต้นปาล์มที่คั้นน้ำออกแล้วสามารถแยกออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่เป็นเส้นใย (vascular bundle, VB) และส่วนที่เป็นผง (parenchyma, PA) โดยส่วนที่เป็นเส้นใยสามารถนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้เป็นน้ำตาลที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกเพื่อผลิตกรดแลกติกได้ด้วย สำหรับส่วนที่เป็นผงมีลักษณะอุ้มน้ำพองตัวง่ายและมีความเป็นรูพรุนจึงมีศักยภาพในการใช้เป็นตัวพองสำหรับการตรึงเอนไซม์

ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุกลีโคโนเซลลูโลสโดยทั่วไปจะทำการย่อยเซลลูโลสก่อนเพื่อให้ได้น้ำตาลแล้วจึงนำไปผลิตเป็นกรดแลกติกต่อไป แต่เนื่องจากในระหว่างการย่อยนั้นเอนไซม์เซลลูเลสจะถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ คือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลเซโกลไบโอส (Nguyen *et al.*, 2013) ปัจจุบันจึงมีการพัฒนากระบวนการหมักที่รวมกระบวนการย่อยและการหมักเข้าด้วยกัน (simultaneous saccharification and fermentation) ภายในถังหมักเดียวกัน ทำให้สามารถลดขั้นตอนการทำงาน ลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยความเข้มข้นที่สูงของผลิตภัณฑ์ (น้ำตาลกลูโคส) และยังสามารถส่งผลให้ผลผลิตต่อชั่วโมงเพิ่มสูงขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถใช้น้ำตาลจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มเป็นแหล่งอาหารในการเจริญและการผลิตกรดแลกติก และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียแลกติกที่เลี้ยงในน้ำคั้นลำต้นปาล์มและเติมกากลำต้นปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร่วม โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณกากลำต้นปาล์มและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม และทำการศึกษการผลิตกรดแลกติกโดยใช้การหมักแบบกะขี้ จากนั้นจึงขยายขนาดการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์และเก็บเกี่ยวกรดแลกติกโดยวิธีการดูดซับด้วยเรซินแลกเปลี่ยนประจุ

บทตรวจเอกสาร

1. จุลินทรีย์ผลิตกรดแลคติก (Lactic acid-producing microorganisms)

กรดแลคติก (Lactic acid) เป็นกรดที่ผลิตได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีหรือจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี ละลายในน้ำและตัวทำละลายได้ดี และสามารถตกผลึกได้หากมีความเข้มข้นสูง มีชื่อทางเคมี ว่า 2-hydroxypropanoic acid มีสูตรโมเลกุล คือ $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุล 2 รูปแบบที่เป็นอเนนติโอเมอร์ (enantiomer) กัน คือ กรดแลคติกไอโซเมอร์ดีและกรดแลคติกไอโซเมอร์แอล ดังแสดงใน Figure 1

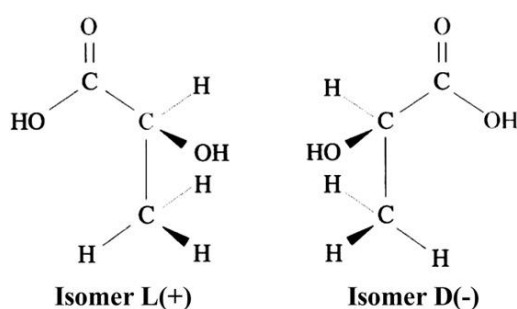


Figure 1 Structure of D(-) and L(+) isomers of the lactic acid.

Source: Martinez *et al.* (2013)

กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายอุตสาหกรรม เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารจะใช้สำหรับการถนอมอาหารเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางจะใช้กรดแลคติกเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น โลชั่น สบู่ ผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้ผิวหนังและช่วยในการรักษาผิว (Wee *et al.*, 2006) ผลิตภัณฑ์สำหรับช่องปาก เช่น แคลเซียมแลคเตท เพื่อป้องกันฟันผุ และยับยั้งการก่อตัวของหินปูน ในรูปของส่วนผสมของยาสีฟัน และน้ำยาบ้วนปาก ผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม โดยใช้กรดแลคติกเป็นส่วนผสมเพื่อทำหน้าที่เคลือบให้เส้นผมเงางามผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดร่างกาย โดยใช้แคลเซียมแลคเตทเป็นส่วนผสมเพื่อทำหน้าที่ให้ความชุ่มชื้นและผลัดเซลล์ผิว เช่น ครีมอาบน้ำ สบู่ แชมพู เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพ หรือ พอลิแลคติกแอซิด (Poly lactic acid, PLA) โดยทั่วไปในการผลิตพอลิแลคติกแอซิดจะใช้กรดแลคติกไอโซเมอร์ดีไอโซเมอร์หนึ่ง แต่ในปัจจุบันพบว่ามีกรมนำกรดแลคติกไอโซเมอร์แอลและไอโซเมอร์ดีที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง (Optical purity) มาผสมกัน (Co-Crystallization) ในสัดส่วนที่แน่นอนจะทำให้ได้สเตอริโอคอมเพลกซ์พอลิแลคติกแอซิด (stereocomplex PLA) ซึ่งจะมี

คุณสมบัติที่คงตัวต่อความร้อนที่สูงขึ้น จึงทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการความคงตัวทางความร้อนได้สูง (Zhang *et al.*, 2016) นอกจากนี้พอลิแลคติกยังมีการนำมาใช้ในด้านกรแพทย์และการเกษตรที่กว้างขวาง อาทิ ใช้ในกระบวนการควบคุมการปลดปล่อยยาในผู้ป่วย (Controlled drug release) โดยยาจะฝังอยู่ในไมโครแคปซูล (Microcapsule) ที่ทำจากพอลิเมอร์ของกรดแลคติก ยาจะค่อยๆ หลุดออกมา ทำให้ยาอยู่ในตัวผู้ป่วยได้นานขึ้นและสามารถออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น ในด้านการเกษตรจะใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยของปุ๋ยและยาฆ่าแมลง (Controlled release of fertilizers and pesticides) (Piskin *et al.*, 1994)

กรดแลคติกที่ได้จากกระบวนการทางเคมีจะอยู่ในรูปสารผสมเรซิมิกดีแอล (racemic mixer) ซึ่งเป็นกรดแลคติกที่มีปริมาณของ 2 อีแนนติโอเมอร์ในปริมาณที่เท่ากัน ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ไม่ต้องการในการนำไปผลิตพอลิแลคติกแอซิด เนื่องจากมีความบริสุทธิ์เชิงแสงต่ำซึ่งจะส่งผลให้โครงสร้างของพอลิแลคติกแอซิดมีลักษณะ โครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) (Lunt, 1998)

สำหรับกระบวนการสังเคราะห์กรดแลคติกด้วยวิธีทางชีวภาพต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตกรดแลคติก ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก ยีสต์ และรา ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรียแลคติกในการผลิตกรดแลคติก เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกจะผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ในขณะที่ยีสต์จะผลิตกรดแลคติกน้อย (Abdel-rahman *et al.*, 2013) และรามีโครงสร้างเป็นเส้นใยทำให้มีความยุ่งยากในระหว่างการหมัก แม้ว่าปัจจุบันมีการศึกษาการทำให้เส้นใยเชื้อราเกาะกันเป็นก้อน (pellets) เพื่อให้ง่ายในระหว่างการหมัก แต่วิธีนี้ก็ยังมีอุปสรรคที่เกี่ยวกับการเจริญของเชื้อรา เนื่องจากการส่งถ่ายสารอาหารทำได้ต่ำกว่าปกติ และยังให้ผลผลิตที่ค่อนข้างต่ำ (Sun *et al.*, 1999)

แบคทีเรียแลคติก เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์ คะตะเลส (Catalase) สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในระหว่างการหมักคาร์โบไฮเดรต มีทั้งชนิดที่มีรูปท่อน และรูปกลม สามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอช 6 – 7 อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส (Patel *et al.*, 2013) แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 3 โครงสร้าง คือ กรดแลคติก ไอโซเมอร์แอล, กรดแลคติกไอโซเมอร์ดี และ โครงสร้างแบบผสมดีแอล ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติก ดังแสดงในตารางที่ 2 สำหรับแหล่งที่มักพบแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ อาหารหมักดองต่างๆ และผลิตภัณฑ์นม แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมอื่นๆ ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ออกมา จากชนิดและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เชื้อผลิตได้นี้ สามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติก ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มโฮโมเฟอร์เม็นเททีฟ (Homofermentative) และเฮเทอโรเฟอร์เม็นเททีฟ (Heterofermentative) โดยลักษณะที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแลคติกทั้งสองกลุ่ม ดังแสดงใน Table 1

กลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) คือ แบคทีเรียแลคติกที่สร้างกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมอื่นๆ ได้กรดแลคติกประมาณร้อยละ 90-95 ส่วนที่เหลือจะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย ไม่ต้องการไทอามีน (Thiamine) ในการเจริญ ผลิตอัลโดเลส (Aldolase) และเอนไซม์เฮกโซสไอโซเมอเรส (Hexose isomerase) แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase) กลไกการเกิดกรดแลคติก คือ การเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูวิกหลังจากนั้นเอนไซม์แลคเตสดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase) เปลี่ยนไพรูวิกไปเป็นกรดแลคติก โดยน้ำตาลกลูโคส 1 โมล เมื่อผ่านกระบวนการหมักจะได้เป็นกรดแลคติก 2 โมล ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus acidilactici*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus cerevisiae* และ *Streptococcus lactis* เป็นต้น (Abdel-Rahman *et al.*, 2013) ดังแสดงใน Figure 2

กลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) คือ แบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ได้กรดแลคติกประมาณร้อยละ 50 ที่เหลือได้เป็นกรดอะซิติกรวมทั้งเอทานอลร้อยละ 20-25 และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20-25 ใช้ไทอามีนในการเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์เฮกโซสไอโซเมอเรส ใช้เฮกโซสโมโนฟอสเฟต (Hexose monophosphate) หรือ ผ่าน Pentose pathway ในการสังเคราะห์กรดแลคติก ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus fermentum* เป็นต้น (Abdel-Rahman *et al.*, 2013) นอกจากนี้เฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟบางสายพันธุ์ยังสามารถผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมได้ผ่าน Phosphoketolase pathway ซึ่งจะได้ผลผลิตกรดแลคติก 0.6 กรัม ต่อ 1 กรัมของน้ำตาลเพนโทส ยังสามารถผลิตกรดอะซิติก เอทานอล และแอลกอฮอล์ เป็นผลพลอยได้ จึงทำให้ได้ผลผลิตกรดแลคติกลดลง (Abdel-Rahman *et al.*, 2013) ดังแสดงใน Figure 2

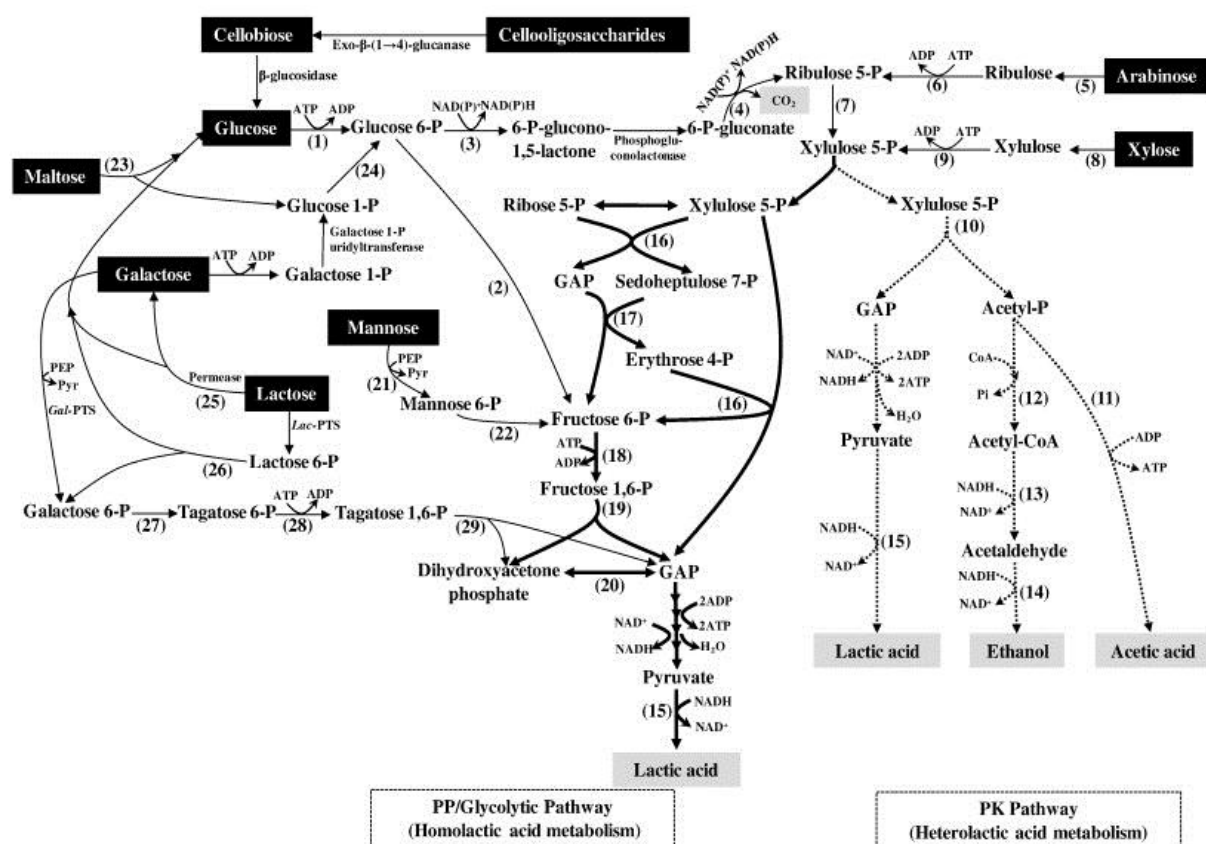


Figure 2 Metabolic pathways for lactic acid production from various sugars by LAB. Enzymes: (1) hexokinase; (2) glucose 6-phosphate isomerase; (3) glucose 6-phosphate dehydrogenase; (4) 6-phosphogluconate dehydrogenase; (5) arabinose isomerase; (6) ribulokinase; (7) ribulose 5-phosphate 3-epimerase; (8) xylose isomerase; (9) xylulokinase; (10) phosphoketolase; (11) acetate kinase; (12) phosphotransacetylase; (13) aldehyde dehydrogenase; (14) alcohol dehydrogenase; (15) lactate dehydrogenase; (16) transketolase; (17) transaldolase; (18) 6-phosphofructokinase; (19) fructose biphosphate aldolase; (20) triosephosphate isomerase; (21) mannose phosphotransferase system; (22) phosphomannose isomerase (23) maltose phosphorylase; (24) phosphoglucomutase; (25) β -galactosidase; (26) phospho- β -galactosidase; (27) galactose 6-phosphate isomerase; (28) tagatose 6-phosphate kinase; and (29) tagatose 1,6-diphosphate aldolase. Solid lines indicate the homofermentative pathway. Thick-solid lines and dashed lines indicate PP/glycolytic pathway and PK pathway, respectively. Lac-PTS: phosphoenolpyruvate-lactose phosphotransferase system.

Source: Adel-Rahman *et al.* (2013)

Table 1 Characterization of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria.

| Characterization | Homofermentative LAB | Heterofermentative LAB |
|--|--|--|
| Product | Lactic acid | Lactic acid ,Ethanol, Diacetyl, Acetic acid and Carbon dioxide |
| Metabolic pathways | Hexose: Embden–Meyerhof pathway Pentose: pentose phosphate pathway | Hexose: phosphogluconate and phosphoketolase pathway Pentose: phosphoketolase pathway |
| Theoretical yield | Hexose: 1.0 g/g (2.0 mol/mol) Pentose: 1.0 g/g (1.67 mol/mol) | Hexose: 0.5 g/g (1.0 mol/mol) Pentose: 0.6 g/g (1.0 mol/mol) |
| Microorganism | <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , some <i>Lactobacillus</i> | <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> , some <i>Lactobacillus</i> species |
| Availability for commercial lactic acid production | Available due to high selectivity | Not available due to high by-product formation |

Source: Adel-Rahman *et al.* (2013)

Table 2 List of homo and hetero fermentative lactic acid bacteria and configuration of lactic acid produced

| Microorganism | Homofermentative | Heterofermentative | Configuration |
|---------------------------|------------------|--------------------|---------------|
| <i>Lactobacillus</i> | | | |
| <i>L. delbrueckii</i> | / | - | D(-) |
| <i>L. lactis</i> | / | - | D(-) |
| <i>L. bulgaricus</i> | / | - | D(-) |
| <i>L. casei</i> | / | - | L(+) |
| <i>L. plantarum</i> | / | - | DL |
| <i>L. curvatus</i> | / | - | DL |
| <i>L. brevis</i> | - | / | DL |
| <i>L. fermentum</i> | - | / | DL |
| <i>Sporolactobacillus</i> | | | |
| <i>S. inulinus</i> | / | - | D(-) |
| <i>Streptococcus</i> | | | |
| <i>S. faecalis</i> | / | - | L(+) |
| <i>S. cremoris</i> | / | - | L(+) |
| <i>S. lactis</i> | / | - | L(+) |
| <i>Leuconostoc</i> | | | |
| <i>L. mesenteroides</i> | - | / | D(-) |
| <i>L. dextranicum</i> | - | / | D(-) |
| <i>Pediococcus</i> | | | |
| <i>P. damnosus</i> | / | - | DL |
| <i>P. acidilactici</i> | / | - | L(+) |

Source: Wee *et al.* (2006)

2. แหล่งของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์ คอะตะเลส (Catalase) มีทั้งชนิดที่มีรูปท่อน และรูปกลม แหล่งที่มักพบแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ อาหารหมักดองต่างๆ ผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้สนใจผลิตภัณฑ์แลคติกจากแบคทีเรียแลคติกโดยใช้น้ำคั้นลำต้นปาล์มเป็นแหล่งอาหาร ซึ่งมีรายงานว่าเมื่อนำน้ำคั้นมาบ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งเกิดจากการหมักของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีอยู่แล้วในน้ำคั้นลำต้นปาล์มหรือปนเปื้อนมาจากกระบวนการคั้นและการเก็บรักษา โดยชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในน้ำคั้นที่ผ่านกระบวนการหมักขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของน้ำคั้น ขั้นตอนของการหมัก และองค์ประกอบของสารอินทรีย์ต่างๆ ในน้ำคั้น (Okafar, 1978) และยังพบอีกว่าจากการหมักของจุลินทรีย์ส่งผลให้ระดับพีเอชของน้ำคั้นลดลงจึงเป็นไปได้ว่าจะมีกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สร้างกรดจากการศึกษาของ Nurul Nadia (2011) ที่ศึกษาการแยกจุลินทรีย์จากน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่ผ่านการหมักโดยจุลินทรีย์จากธรรมชาติ พบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. และบางสายพันธุ์ เป็นกลุ่ม *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium* spp. และ *Vibro* spp. ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Amoa-Awua และคณะ (2007) ที่พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่ผ่านการหมักโดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแลคติกและอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์บางสายพันธุ์ ในขณะที่ Manel และคณะ (2011) ศึกษาการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์ม พบว่าเป็นแบคทีเรียแลคติก 5.36 ถึง 8.47 log CFU/mL ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* และจากการศึกษาของ Ouoba และคณะ (2012) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่พบในน้ำคั้นลำต้นปาล์มในระหว่างการหมักส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์จีโนส *Lactobacillus* ร้อยละ 86.67 และ *Leuconostoc* ร้อยละ 10

นอกจากนี้ยังมีแหล่งที่น่าสนใจ คือ คีเฟอร์เกรน (Kefir grains) ซึ่งเป็นหัวเชื่อมหมักพื้นเมืองที่มีต้นกำเนิดจากชาวคอเคซัส ประกอบไปด้วยกลุ่มเชื้อผสมระหว่างยีสต์และแบคทีเรียแลคติกที่มีการฝังตัวอยู่ในสารเมือกเหนียวที่เรียกว่า คีเฟอร์ัน (Kefiran) มีลักษณะเป็นก้อนตะปุ่มตะป่ำคล้ายดอกกะหล่ำขาวขนาดตั้งแต่ 5-20 มิลลิเมตร (Lui and Lin, 2000; Zajsek and Gorsek, 2013) สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในคีเฟอร์เกรนส่วนใหญ่คือแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. และ *Streptococcus* spp. (Iwasawa et al., 1982) Carr และคณะ (2002) รายงานว่าแบคทีเรียแลคติกจีโนส *Lactobacillus* ซึ่งมีทั้งกลุ่มที่เป็น โฮโมเฟอร์เมนเททิฟและเฮเทอโรเฟอร์เมนเททิฟสามารถผลิตกรดแลคติกได้ทั้งไอโซเมอร์ดี ไอโซเมอร์แอล และ

ไอโซเมอร์ดีแอล ในขณะที่แบคทีเรียแลคติกจิ้นัส *Leuconostoc* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมน เทที่ฟส่วนใหญ่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดี ส่วนแบคทีเรียแลคติกจิ้นัส *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเทที่ฟที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอลเป็นหลัก

จากงานวิจัยของ Miguel และคณะ (2010) ที่ศึกษาการแยกแบคทีเรียแลคติกจากคีเฟอร์เรน ที่ได้จากประเทศบราซิล แคนาดา และสหรัฐอเมริกา พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 270 ไอโซเลท ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus kefir*, *Gluconobacter japonicas*, *Lactobacillus uvarum*, *Lactobacillus satsumensis* และ *Acetobacter syzygii* ต่อมา Leite และคณะ (2015) คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากคีเฟอร์เรนจากแหล่งที่ต่างกันได้ 34 ไอโซเลท พบว่าเป็นแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus paracasei* และมีรายงานจาก Jeong และคณะ (2017) ที่แยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากนมหมักคีเฟอร์ ได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลท และพบว่าเป็นแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactococcus lactis* และ *Leuconostoc mesenteroides* ซึ่ง Cheirsilp และคณะ (2003) รายงานว่า *Lactobacillus kefiranofaciens* เป็นแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลัก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Carr และคณะ (2002) ที่รายงานว่า *Lactobacillus kefiranofaciens* เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มออบลิเกตโฮโมเฟอร์เมนเทที่ฟที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลัก ส่วนแบคทีเรียแลคติกจิ้นัส *Leuconostoc* เป็นแบคทีเรียแลคติกที่อยู่ในกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเทที่ฟที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดี นอกจากนี้ Garrote และคณะ (2005) รายงานว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *L. kefir* เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด ในคีเฟอร์เรน ซึ่งอยู่ช่วง $2.0 \times 10^8 - 1.0 \times 10^9$ cells/mL โดย Carr และคณะ (2002) รายงานว่า *L. kefir* เป็นแบคทีเรียแลคติกที่อาศัยการหมักน้ำตาลกลูโคสผ่านเฮเทอโรเฟอร์เมนเทที่ฟพาาเวย์ และผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีแอล

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อจุลินทรีย์

3.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้ในการผลิตกรดแลคติกต้องสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูง มีความสม่ำเสมอในการผลิต มีความคงตัวของสายพันธุ์ มีความเป็นไปได้ที่จะปรับปรุงทางพันธุกรรม สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ง่ายและผลิตสารชนิดอื่นที่ไม่ต้องการน้อย จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกโดยส่วนใหญ่ คือ แบคทีเรียแลคติก เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลคติกได้เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ทั้งกรดแลคติกไอโซเมอร์แอล ไอโซเมอร์ดี และทั้งสองไอโซเมอร์ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติก โดยแบคทีเรียแลคติกที่อยู่ในสกุล *Lactococcus*

ส่วนใหญ่สร้างกรดแลคติกไอโซเมอร์ดี แบคทีเรียแลคติกสกุล *Streptococcus* ส่วนใหญ่สร้างกรดแลคติกไอโซเมอร์แอล ส่วนแบคทีเรียแลคติกในสกุล *Lactobacillus* สามารถสร้างกรดแลคติกได้ทั้งไอโซเมอร์ดี ไอโซเมอร์แอล และไอโซเมอร์ดีแอล

3.2 แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ในกระบวนการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกจะผลิตกรดแลคติกโดยอาศัยการหมักน้ำตาลผ่านกระบวนการที่แตกต่างกันเป็นผลทำให้เกิดการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ และเฮเทอโรเฟอร์เมนเททิฟ โดยมีงานวิจัยที่เลี้ยง *Lactococcus lactis* แบบกะในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสอย่างจำกัดทำให้เชื้อผลิตกรดแลคติกลดลง และมีการสร้างกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และเอทานอลเพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันเมื่อเลี้ยง *Lactococcus lactis* ในอาหารที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสอย่างเพียงพอ พบว่าเชื้อมีการผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักมากกว่าร้อยละ 90 และมีการผลิตกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และเอทานอลเพียงเล็กน้อย (Thomas *et al.*, 1987) และจากการศึกษาของ Hu และคณะ (2016) ที่ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ กลูโคส ไซโลส และเซลโลไบโอสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *Lactobacillus pentosus* FL0421 พบว่าการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคส และเซลโลไบโอส ให้ผลผลิตกรดแลคติกที่ใกล้เคียงกัน คือ 0.92 และ 0.90 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ส่วนการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลสนั้นให้ผลผลิตเพียง 0.52 กรัมต่อกรัมสับสเตรท

นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในสภาวะที่มีการควบคุมพีเอชระหว่างการหมักจะสามารถเพิ่มปริมาณกรดแลคติกได้ อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกินไปจะไปยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกได้เช่นกัน (Abdel-Rahman *et al.*, 2011) จากการศึกษาของ Wang และคณะ (2016) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลไซโลส ต่อการผลิตกรดแลคติกของ *Lactobacillus rhamnosus* LA-04-1 พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจาก 44.38 กรัมต่อลิตร เป็น 61.64, 82.5 และ 100.1 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อผลิตกรดแลคติกเพิ่มจาก 44 กรัมต่อลิตรเป็น 60, 68 และ 78 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของกรดแลคติกเพิ่มขึ้นมากกว่า 60 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้อัตราการเจริญและอัตราการผลิตกรดแลคติกลดลง ซึ่งเป็นผลจากการถูกยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ประเภท Primary metabolite ซึ่งจะผลิตควบคู่ไปกับการเจริญของเซลล์ เมื่อการเจริญของเซลล์เริ่มลดลงการผลิตกรดแลคติกก็จะช้าลงด้วย จากงานวิจัยของ สุภานิต ชุกถื่น (2011) ที่ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลโตนดโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1500 โดยกำหนดความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 10, 20, 40, 60 และ 134 กรัมต่อลิตร หมักที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาล

เพิ่มขึ้นปริมาณกรดแลคติกก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 134 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 28.35 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาในการหมัก 14 ชั่วโมง และจากงานวิจัยของ Reddy และคณะ (2016) ที่ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากไฮดรอลซึ่งเป็นของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตกลูโคส โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่แตกต่างกัน คือ 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร และใช้ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน หมักที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นปริมาณกรดแลคติกก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด คือ 184 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 51 ชั่วโมง

3.3 แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์กรดอะมิโน เพียวรีน (Purine) ไพริมิดีน (Pyrimidine) คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ไนโตรเจนสามารถพบได้ทั้งในรูปของเกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต และสารอินทรีย์ เช่น เปปโติน และยีสต์สกัด (Zhang *et al.*, 2007) การเติมแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นเพียงพอจะส่งผลให้เชื้อผลิตกรดแลคติกได้ดี ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS นั้นมีทั้งยีสต์สกัด เปปโติน และเนื้อสกัดที่เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญและผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก (Haofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000) อย่างไรก็ตามการใช้ยีสต์สกัดนั้นคิดเป็นต้นทุนร้อยละ 38 ของต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Tejaya and Cheryan, 1995) ดังนั้นจึงมีหลายงานวิจัยที่นำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาแทนที่ยีสต์สกัด ซึ่งจากงานวิจัยของ Hete'nyi และคณะ (2010) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยเชื้อ *Lactobacillus* sp. MKT-878 และใช้ยีสต์สกัดร่วมกับกลูเตน (Gluten) เป็นแหล่งไนโตรเจน หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 5.8 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร และกลูเตนที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่ให้อัตราการผลิตกรดแลคติกสูงสุด คือ 3.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สำหรับงานวิจัยของ Hu และคณะ (2016) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร พีเอช 6 โดยเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LA0421 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ยีสต์สกัด ทรีปโติน เนื้อสกัด เคซีน ไฮโดรไลเซต และผงข้าวโพด โดยแหล่งไนโตรเจนทุกชนิดมีความเข้มข้นที่เท่ากันคือ 5 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ยีสต์สกัดและผงข้าวโพดให้ผลผลิตกรดแลคติกที่ใกล้เคียงกันคือ 0.94 และ 0.87 กรัมต่อกรัมกลูโคส

3.4 ฟีเอช

เมื่อแบคทีเรียแลคติกผลิตกรดแลคติกออกมาจะส่งผลให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว ในกระบวนการผลิตกรดแลคติกจึงจำเป็นต้องควบคุมให้พีเอชอยู่ในระดับที่เหมาะสม ซึ่งแบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอช 5 ถึง 7 และการเจริญจะถูกยับยั้งเมื่อพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 4 เนื่องจากกรดแลคติกมีค่า pK_a เท่ากับ 3.86 (Adachi *et al.*, 1998) ซึ่งการลดลงของพีเอชเกิดจากการสะสมของกรดแลคติกและส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยกรดแลคติกเป็นกรดอ่อนที่จะเข้าไปแตกตัวภายในเซลล์ ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของโปรตอนภายในเซลล์ทำให้พีเอชภายในเซลล์ลดลง เซลล์จึงต้องใช้พลังงานในการผลักโปรตอนออกนอกเซลล์ ส่งผลให้มีพลังงานเหลือไม่เพียงพอในการเจริญเติบโต ทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโตหรือตายในที่สุด (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000) แต่พีเอชของอาหารสามารถควบคุมได้โดยใช้สาร neutralizing agent เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมคลอไรด์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Roberto *et al.*, 2007) ซึ่งการเติมต่างในการควบคุมพีเอช จะทำให้กรดแลคติกแตกตัวและจับกับต่างทำให้เกิดเกลือและลดการยับยั้งของกรดแลคติกต่อเซลล์ได้ Guyot และคณะ (2000) ศึกษาผลของการควบคุมพีเอชต่อการผลิตกรดแลคติกจากแป้งที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus manihotivoran* LMG 18010 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาย่อยแป้งได้โดยตรง ผลการทดลองพบว่าในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมพีเอชเชื้อผลิตกรดแลคติกได้เพียง 6.0 กรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมพีเอชเป็น 6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มอล พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเป็น 12.5 กรัมต่อลิตร Hu และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลของการควบคุมพีเอชต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LA0421 จากน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 12 โมลาร์ และควบคุมที่พีเอชแตกต่างกันคือ 5, 5.5, 6 และ 6.5 พบว่าที่พีเอช 5.5 และ 6 ให้ผลผลิตกรดแลคติกที่ใกล้เคียงกันคือ 0.90 และ 0.92 กรัมต่อกรัมกลูโคส

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อผสม เช่น งานวิจัยของ Wang และคณะ (2016) ที่ศึกษาผลของการควบคุมพีเอชโดยแคลเซียมไฮดรอกไซด์แบบลำดับขั้นที่ 5.6, 5.8, 6.0 และ 6.2 ต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus rhamnosus* LA-04-1 และ *Bacillus coagulans* LA1507 ผลการทดลองพบว่าที่พีเอช 6.2 ทำให้เชื้อผสมสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุด 118 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 92.1 ในเวลา 63 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว *L. rhamnosus* LA-04-1 หมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ที่ผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 36 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 5.6

สำหรับงานวิจัยของ Liu (2003) พบว่า *Lactobacillus bulgaricus* สามารถผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่เป็นกรดที่มีพีเอชช่วง 4-6 ในขณะที่เดียวกันเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เป็นด่างที่พีเอช 7-8 พบว่า *Lactobacillus bulgaricus* มีการสร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพีเอชมีผลต่อเมทาบอลิซึมของไพรูเวตและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก

3.5 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีต่ออัตราการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 37-43 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติก (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000) อีกทั้งอุณหภูมิยังมีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลคติกในแบคทีเรียแลคติก โดยพบว่าการแสดงออกของเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase) ใน *Lactobacillus rhamnosus* ที่เลี้ยงที่ 45 องศาเซลเซียส มีค่าลดลงและส่งผลให้การผลิตกรดแลคติกที่สภาวะดังกล่าวลดลงด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยง *L. rhamnosus* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (De Figueroa *et al.*, 2001) และจากงานวิจัยของ Hu และคณะ (2016) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LA0421 จากน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 32, 37, 42 และ 47 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุด คือ 0.92 กรัมต่อกรัมกลูโคส

4. ลำต้นปาล์มน้ำมัน (Oil palm trunk)

ลำต้นปาล์มน้ำมันเป็นหนึ่งในวัสดุเศษเหลือจากการผลิตปาล์มน้ำมัน ดังแสดงใน Figure 3 ลักษณะลำต้นของปาล์มน้ำมันจะตั้งตรง ช่วงระยะ 3 ปีแรกต้นปาล์มจะเจริญทางด้านกว้างมากกว่า จึงยังไม่เห็นส่วนของลำต้น หลังจาก 3 ปี ลำต้นจะยึดขึ้น ข้อและปล้องของลำต้นปรากฏ โดยรอยแผลที่ฐานใบติดกับลำต้นคือข้อส่วนที่อยู่ระหว่างข้อคือปล้องของลำต้น เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นประมาณ 20-75 เซนติเมตร ลำต้นจะมีความสูงเพิ่มขึ้น 35-60 เซนติเมตรต่อปี ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและพันธุกรรม ปาล์มน้ำมันมีอายุถึง 80 ถึง 100 ปี (ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี) และสูงได้มากกว่า 30 เมตร การเก็บเกี่ยวผลผลิตสามารถเก็บได้จนถึงอายุ 20 ถึง 25 ปี (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552) แล้วลำต้นปาล์มจะถูกโค่น ในประเทศไทยมีพื้นที่ของปาล์มน้ำมันที่รอโค่นประมาณ 20,000-45,000 ไร่ต่อปี (สมพงษ์ และ อลิศรา, 2552) และในแต่ละปีจึงมีชีวมวลจากลำต้นปาล์มประมาณ 1.44 ล้านตันต่อปี (Noparat *et al.*, 2017)

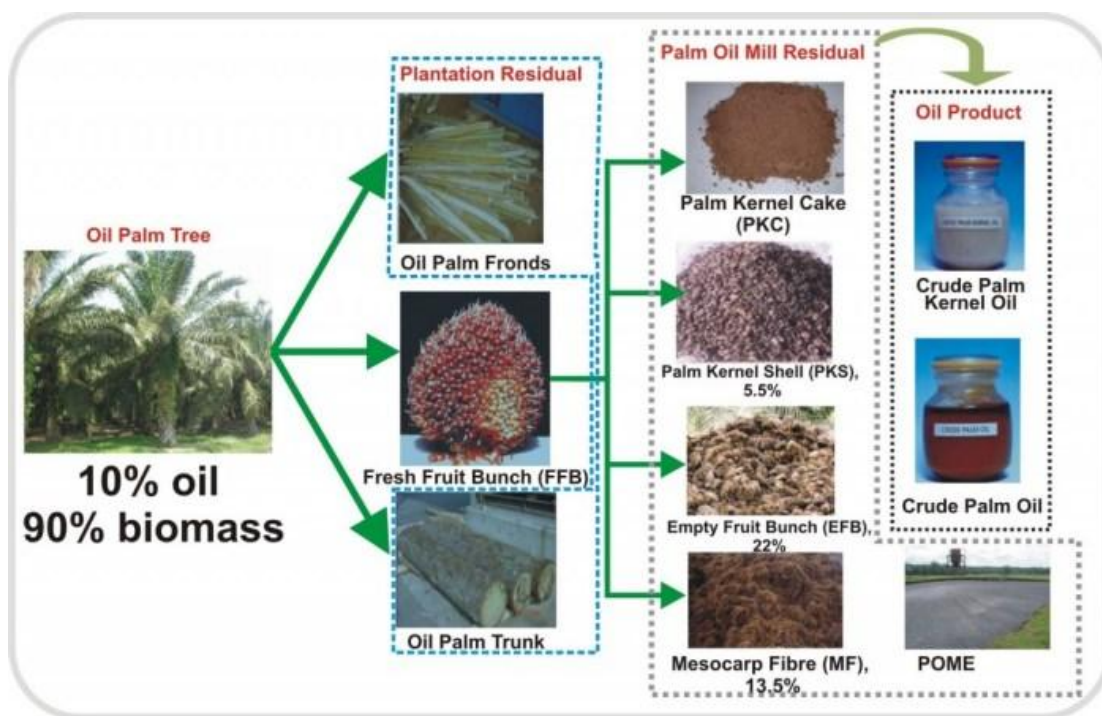


Figure 3 Wastes from Oil palm tree

Source: <https://www.bioenergyconsult.com/tag/palm-oil-biomass/>

ลำต้นปาล์มน้ำมันจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (vascular bundle, OPT-VB) และส่วน (parenchyma, OPT-PA) ที่มีลักษณะเป็นผง ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 71-76 และ 24-29 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ Table 3 แสดงองค์ประกอบของ vascular bundle และ parenchyma จะเห็นได้ว่าในส่วนของ parenchyma มีองค์ประกอบของแป้ง (ร้อยละ 55.5) สูงกว่าใน vascular bundle (ร้อยละ 2.4) ต้นปาล์มสามารถแบ่งออกเป็นสามส่วน คือ ส่วนใน (a) ส่วนกลาง (b) และส่วนนอก (c) ดังแสดงใน Figure 4D เมื่อนำลำต้นปาล์มสดมาบีบคั้นน้ำ พบว่าองค์ประกอบของน้ำตาลในน้ำคั้นลำต้นปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคสดังแสดงใน Table 4 โดยเฉพาะน้ำคั้นส่วนในลำต้นปาล์มจะมีน้ำตาลปริมาณ 85.2 กรัมต่อลิตร และลดลงเรื่อยๆ ไปทางส่วนนอกของลำต้น และนอกจากนี้ยังพบน้ำตาลชนิดอื่นๆ แต่มีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ คือ ซูโครส ฟรุกโตส กาแลคโตส ไฮโลส และแรมโนส นอกจากนี้ น้ำคั้นลำต้นปาล์มน้ำมันยังประกอบด้วยกรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดซิตริก กรดมาลิก ดังแสดงใน Table 5 และยังประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด เช่น ซีรีน อะลานีน ดังแสดงใน Table 6 วิตามิน Table 7 และแร่ธาตุต่างๆ ดังแสดงใน Table 8 (Kosugi และคณะ, 2010) ซึ่งองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในน้ำคั้นลำต้นปาล์มถือว่าเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

Table 3 Analysis of vascular bundle and parenchyma

| Plant part | Ash (%) | Starch (%) | Lignin (acid soluble) (%) | Sugar composition (%) | | | | |
|-----------------|------------|---------------|---------------------------------|-----------------------|-----|-----|------|------|
| | | | | Man | Ara | Gal | Xyl | Glu |
| Vascular bundle | 22 | 2.4 | 15.7 (3.9) | 2.0 | - | - | 34.8 | 63.2 |
| Parenchyma | 2.9 | 55.5 | 20.0 (4.5) | 1.3 | 6.5 | 1.9 | 34.8 | 55.5 |

Source: Yoichi (1992)

Table 4 Free sugars contained in sap from felled oil palm trunk

| Free sugars | Part | | |
|-------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | Inner (a) (g/L) | Middle (b) (g/L) | Outer (c) (g/L) |
| Sucrose | 6.5±1.1 | 3.0±0.4 | 1.9±0.1 |
| Glucose | 85.2±2.5 | 52.2±3.4 | 13.1±2.6 |
| Fructose | 4.1±1.2 | 3.1±1.0 | 2.1±1.7 |
| Xylose | 0.7±0.1 | 0.8±0.1 | 1.4±1.1 |
| Galactose | 0.9±0.1 | 0.8±0.3 | 1.0±0.8 |
| Rhamnose | 0.4±0.2 | 0.5±0.2 | 0.5±0.2 |
| Others | 0.3±0.3 | 0.1±0.1 | 0.1±0.2 |
| Total | 98.1±5.5 | 60.5±3.3 | 20.1±1.1 |

Source: Kosugi *et al.* (2010)

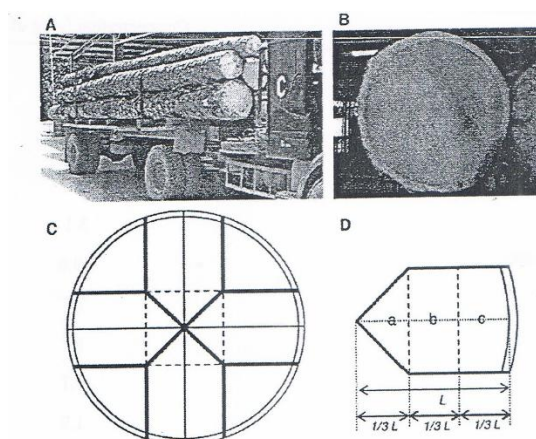


Figure 4 Images of felled oil palm trunks and diagrams of sample preparation for analyses. (A) Felled trunks carried to a plywood factory. (B) A disk taken from a trunk. (C, D) Disks were cut into inner (a), middle (b), and outer (c) parts

Source: Kosugi *et al.* (2010)

Table 5 Organic acid contained in sap from the inner part of felled oil palm trunk

| Organic | Concentration ($\mu\text{g/g}$ of sap) |
|---------------|---|
| Succinic acid | 30.9 |
| Pyruvic acid | 19.0 |
| Malic acid | 371.8 |
| Maleic acid | 119.1 |
| Lactic acid | 1.3 |
| Fumaric acid | 8.1 |
| Citric acid | 380.6 |
| Acetic acid | 39.8 |
| Total | 970.6 |

Source: Kosugi *et al.* (2010)

Table 6 Amino acids contained in sap from the inner part of felled oil palm trunk

| Amino acid | Concentration ($\mu\text{g/g}$ of sap) |
|---------------|---|
| Aspartic acid | 17.3 |
| Threonine | 7.4 |
| Serine | 45.3 |
| Glutamic acid | 33.9 |
| Glycine | 3.1 |
| Alanine | 38.8 |
| Valine | 7.6 |
| Methionine | 1.7 |
| Isoleucine | 5.1 |
| Leucine | 1.9 |
| Tyrosine | 1.8 |
| Phenylalanine | 6.9 |
| Tryptophan | 12.1 |
| Lysine | 2.3 |
| Histidine | 1.6 |
| Arginine | 5.8 |
| Proline | 5.7 |
| Total | 198.3 |

Source: Kosugi *et al.* (2010)

Table 7 Vitamins contained in sap from the inner part of felled oil palm trunk

| Vitamin | Concentration ($\mu\text{g/g}$ of sap) |
|--------------------------------------|---|
| Pyridoxine, pyridoxal, pyridoxiamine | 1.1 |
| Pantothenic acid | 1.5 |
| Niacin | 2.6 |
| Inositol | 640 |
| Biotin | 0.024 |
| Ascorbic acid | 20 |

Source: Kosugi *et al.* (2010)

Table 8 Minerals contained in sap from the inner part of felled oil palm trunk

| Mineral | Concentration ($\mu\text{g/g}$ of sap) |
|---------|---|
| Ca | 210 |
| Fe | 3.0 |
| Mg | 145 |
| Mn | 12 |
| Mo | 1.5 |
| Na | 22 |
| P | 12 |
| Si | 4.0 |
| Zn | 2.5 |
| Cl | 535 |
| Total | 947 |

Source: Kosugi *et al.* (2010)

5. องค์ประกอบของเซลล์พืช

ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของพืชและเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีมากที่สุดในธรรมชาติและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกในระยะเวลาอันสั้น วัสดุคิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ชังข้าวโพด และเศษไม้ เป็นต้น วัสดุคิบประเภทนี้มีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลส (cellulose) ประมาณร้อยละ 35-45 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 20-40 และลิกนินร้อยละ 15-35 Table 9 แสดงองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสจากแหล่งของวัสดุคิบที่ต่างกันและสัดส่วนขององค์ประกอบที่แตกต่างกัน (อิสรา โกมลเกียรติ, 2556) Figure 5 แสดงลักษณะ โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส

Table 9 The content of cellulose, hemicellulose and lignin in common agricultural residues and wastes

| Lignocellulosic materials | Cellulose (%) | Hemicellulose (%) | Lignin (%) |
|---------------------------|---------------|-------------------|------------|
| Hardwoods stems | 40-45 | 24-40 | 18.25 |
| Softwood stems | 45-50 | 25-35 | 25-35 |
| Nut shells | 25-30 | 25-30 | 30-40 |
| Corn cobs | 45 | 35 | 15 |
| Grasses | 25-40 | 35-50 | 10-30 |
| Paper | 85-99 | 0 | 0-15 |
| Wheat straw | 30 | 50 | 15 |
| Leaves | 15-20 | 80-85 | 0 |
| Cotton seed hairs | 80-95 | 5-20 | 0 |
| Newspaper | 40-55 | 25-40 | 18-30 |
| Swine waste | 6 | 28 | NA |
| Switchgrass | 45 | 31.4 | 12 |
| Oil plum trunk | 25-50 | 20-35 | 18-35 |

NA = not analysis

Source: Sun and Cheng (2002)

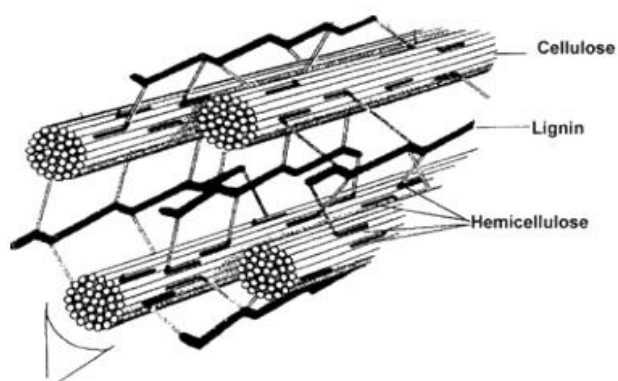


Figure 5 Lignocellulose network

Source: Yinghuai *et al.* (2013)

5.1 เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลส เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อเป็นสายยาว โครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขา ซึ่งต่อกันด้วยพันธะ $\beta(1,4)$ -glycosidic โครงสร้างส่วนใหญ่เป็นรูปผลึก จึงย่อยสลายได้ยาก ละลายน้ำได้น้อย มีความแข็งแรงมากถูกล้อมด้วยเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (พูนสุข ประเสริฐธรรม, 2542) สายพอลิเมอร์แต่ละสายจะเรียงขนานกันและสร้างพันธะไฮโดรเจนเชื่อมต่อกัน ซึ่งอาจจะสูงถึง 3 พันธะต่อหน่วยกลูโคส แต่เมื่อรวมกันหลายสายจะเรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบโครงผลึกสามมิติ ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงกับผนังเซลล์พืช มาเรียงตัวเป็นมัด (bundle) ซึ่งบางส่วนของมัดนี้จะมีส่วนที่เรียงกันเป็นระเบียบ เรียกว่า crystalline ซึ่งจะมีความคงทนต่อเอนไซม์และกรดมาก และส่วนที่เรียงตัวอย่างหลวมๆ เรียกว่า amorphous (อิสรา โทมลเกียรติ, 2556)

5.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลส เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทสหลายชนิด เช่น น้ำตาลไซโลส (xylose) น้ำตาลแมนโนส (mannose) และน้ำตาลอะราบิโนส (arabinose) เป็นต้น เป็นสารอินทรีย์ที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส สายพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นเฮเทอโรจีนัส (heterogenous) ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดปนกัน คือ

1) เพนโตแซน ส่วนใหญ่เป็นไซแลน และอะราเบน เมื่อนำไปย่อยจะได้น้ำตาลไซโลสและอะราบิโนส ซึ่งไซแลนเป็นสารที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลสมากกว่าสารอื่น ไซแลนประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสต่อกันด้วยพันธะ $\beta(1-4)$ -glycosidic

2) เฮกโซแซน ส่วนใหญ่เป็นแมนแนน กาแลคแทน กลูแคน เมื่อถูกย่อยจะได้น้ำตาลแมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส ตามลำดับ

3) พอลิยูโรไนค์ ส่วนมากเป็นสารประกอบของกรดพอลิยูโรนิก และยังพบกรดยูโรนิกปนอยู่ด้วย

ข้อแตกต่างระหว่างเฮมิเซลลูโลสกับเซลลูโลส คือ เฮมิเซลลูโลสสามารถถูกย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจาง สามารถละลายน้ำได้ดี และละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 นอกจากนี้สายพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขามากกว่า และมีความยาวของสายโซ่สั้นกว่า (พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545)

5.3 ลิกนิน (lignin)

ลิกนิน เป็นพอลิเมอร์ของสารอะโรมาติกหลายชนิด หรือที่เรียกว่า ฟีนอลิกพอลิเมอร์ (phenolic polymer) เป็นสารที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิด ทำให้ลิกนินมีความแข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์

บางชนิด เช่น เอทานอล หรือเมทานอลที่ร้อน และในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และมีบทบาทสำคัญต่อลักษณะทางกายภาพของไม้ คือ ลิกโนเซลลูโลสจะป้องกันการย่อยสลายทางชีวภาพ เช่น ต่อต้านการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์ เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกย่อยสลายด้วย เอนไซม์ลิกเนส (lignase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในรา (อิสรา โคมลเกียรติ, 2556)

6. การผลิตกรดแลคติกจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส

วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสจะมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างก็ต่อเมื่อมีการย่อยสลายโดยเอนไซม์จนได้น้ำตาล โมเลกุลเดี่ยวและสามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกได้โดยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ การผลิตกรดแลคติกจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ 3 ขั้นตอน คือ การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) ซึ่งเป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของ ลิกโนเซลลูโลสเพื่อให้เอนไซม์และจุลินทรีย์สามารถเข้าถึงและย่อยสลายได้ง่ายขึ้น การย่อย (hydrolysis) เป็นการเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้น้ำตาลเฮกโซสและน้ำตาลเพนโทส และการหมัก (fermentation) เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกโดยจุลินทรีย์ (Abdel-Rahman *et al.*, 2011)

6.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

การปรับสภาพวัตถุดิบมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินซึ่งมีสมบัติไปห่อหุ้มหรือเคลือบโครงสร้างของ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ลิกนินจึงเป็นเหมือนผนังป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส นอกจากนี้การปรับสภาพยังมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มขนาดรูพรุนของวัตถุดิบและลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น (Sun and Cheng, 2002) กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถแบ่งออกเป็น 4 รูปแบบหลัก ได้แก่ การปรับสภาพทางกายภาพ การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี การปรับสภาพทางเคมี และการปรับสภาพทางชีวภาพ

1) การปรับสภาพด้วยวิธีการทางกายภาพ

เป็นการลดขนาดวัตถุดิบทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออก เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น เช่น การตัด การบด การใช้ความร้อน เป็นต้น

2) การปรับสภาพด้วยวิธีการทางเคมี

การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีส่วนใหญ่จะนิยมใช้กรดซัลฟูริกเจือจางในการปรับสภาพชีวมวลเพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ทำให้ได้ส่วนของเซลลูโลสที่สามารถนำไปย่อยต่อเพื่อให้ได้ผลผลิตของน้ำตาลสูงขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถละลายโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบออกได้ แต่ก็มีข้อเสีย คือ วิธีนี้จำเป็นต้องมีขั้นตอนการสะเทินกรดให้เป็นกลาง ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการ

ย่อน้ำตาลต่อ ทำให้ผลผลิตของน้ำตาลลดลง และได้อองค์ประกอบอื่นเกิดขึ้น ได้แก่ กรดอะซิติก และเฟอร์ฟูรอล เป็นต้น ซึ่งอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ในขั้นตอนการหมักได้ นอกจากนี้วิธีการนี้ยังต้องการอุปกรณ์ที่มีราคาแพง โดยถึงปฏิบัติการที่ใช้ต้องมีความทนทานต่อการกัดกร่อน และแข็งแรงที่อุณหภูมิและความดันสูง (Pauley, 2007)

การปรับสภาพโดยใช้ค่า คือ การใช้สารละลายต่างในการปรับสภาพวัตถุดิบชีวมวลเพื่อกำจัดลิกนิน โดยใช้กลไกของปฏิกิริยา saponification ของพันธะเชื่อมโยงของเอสเทอร์ภายในโมเลกุลไซแลนของเฮมิเซลลูโลส และองค์ประกอบอื่นๆ เช่น ลิกนิน โดยมีรายงานว่า การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางทำให้ชีวมวลเกิดการฟองตัวส่งผลให้มีรูพรุนและพื้นที่ผิวภายในเพิ่มขึ้น ลดความเป็นผลึก และทำให้เกิดการแยกตัวของโครงสร้างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส (Silverstein, 2004)

3) การปรับสภาพด้วยวิธีการทางเคมีกายภาพ

เป็นการใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น การใช้ไอน้ำความดันสูง ซึ่งมีการเติมสารเคมีลงไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ เช่น การระเบิดด้วยไอน้ำ การระเบิดด้วยแอมโมเนีย เป็นต้น ซึ่งมีต้นทุนค่อนข้างสูง

4) การปรับสภาพด้วยวิธีการทางชีวภาพ

เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก

6.2 กระบวนการย่อย

1) การย่อยด้วยสารเคมี

การใช้สารเคมีในการย่อยจะทำให้เกิดการทำลายพันธะไกลโคสิติก (Glycosidic bond) ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน ถ้าการย่อยเกิดขึ้นสมบูรณ์จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ทำได้โดยใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง ซึ่งเป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสโดยตรง แต่ได้ผลผลิตน้ำตาลค่อนข้างน้อย เนื่องจากน้ำตาลจะทำปฏิกิริยาต่อไปเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลได้แก่ เฟอร์ฟูรอล ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล นอกจากนี้กรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลส ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการอีกด้วย (จตุพร ปานทอง, 2557)

2) การย่อยด้วยเอนไซม์

เนื่องจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบสำคัญคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน แต่องค์ประกอบที่สำคัญที่จะนำมาใช้ คือ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งทั้งสององค์ประกอบนี้มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นต้องใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายที่แตกต่างกัน เซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ $\beta(1-4)$ -glycosidic เพราะฉะนั้นในการ

ย่อยสลายเซลลูโลส จึงต้องใช้เอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เชิงซ้อน 3 ส่วน คือ เอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และ เบต้ากลูโคซิเดส (จตุพร ปานทอง, 2557) และมีกลไกการย่อยดังแสดงใน Figure 6

1) เอนโดกลูคาเนส (Endoglucanase) ทำหน้าที่ตัดพันธะ $\beta(1-4)$ -glycosidic linkage ภายในโมเลกุลเซลลูโลสบริเวณโครงสร้างอะมอर्फัส โดยตำแหน่งการย่อยเกิดขึ้นแบบสุ่มทำให้เกิดปลายอิสระขึ้น ส่งผลให้เกิดเซลโลไบโอส โอลิโกเซลลูโลส และกลูโคสในปริมาณที่น้อยมาก โดยจะย่อยสลายจากทางด้านปลายรีดิวซ์ของสายโซ่เซลลูโลส

2) เอกโซกลูคาเนส (Exoglucanase) ทำหน้าที่ย่อย โอลิโกแซคคาไรด์ และเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส ตำแหน่งที่เกิดการย่อยเป็นแบบสุ่ม

3) เบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) หรือ เซลโลไบเอส (Cellobiase) ทำหน้าที่ย่อยสายเซลโลไบโอสให้เปลี่ยนเป็นกลูโคส ซึ่งเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส จะเป็นตัวส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ทำให้ย่อยสลายได้กลูโคสมากขึ้น การย่อยเซลลูโลสจะได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสมากหรือน้อยขึ้นกับสัดส่วนของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในเซลลูเลสว่ามีมากหรือน้อย

สำหรับขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์จะมีอยู่ 3 ขั้นตอนหลัก คือ การแพร่ของเอนไซม์ในของเหลว การเคลื่อนที่ของเอนไซม์จากของเหลวไปยังผิวหน้าของสารตั้งต้น และการดูดซับเอนไซม์โดยเซลลูโลสเกิดเป็น Enzyme-cellulose complex (Cao and Tan, 2002) จากนั้นจะเกิดการย่อยสลายของเซลลูโลส ดังแสดงใน Figure 6 และในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้น จำเป็นต้องทราบปริมาณของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เพราะลิกโนเซลลูโลสบางชนิดจะมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสน้อยจึงไม่จำเป็นต้องเติมเอนไซม์ที่จะย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสเพื่อเป็นการลดต้นทุน แต่สำหรับเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่ต้องการและมีปริมาณมากจึงจำเป็นต้องเติมเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลที่มีโมเลกุลเล็กลง

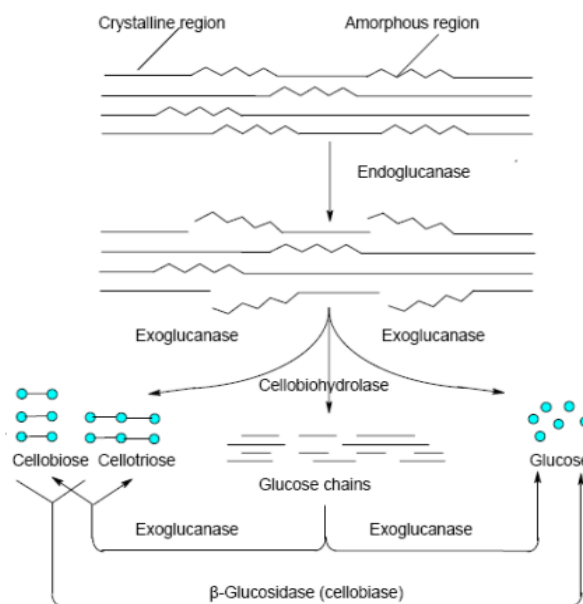


Figure 6 Mechanism of cellulase on cellulose

Source: Zhu *et al.* (2005)

ส่วนการย่อยเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นกิ่งสาขา และประกอบด้วยโพลิเมอร์ของน้ำตาลหลายชนิดด้วยกัน เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดเพื่อที่จะสลาย แต่จากองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสคือ ไซแลน ดังนั้นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

1) Endo-1,4- β -D-xylanase ทำหน้าที่ย่อยพันธะ 1,4-glucosidic ของ β -D-xylopyranoside ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของไซแลน ให้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปไซโลโอลิโกแซคคาไรด์และเซลโลไบโอส

2) Exo-1,4- β -D-xylanase ทำหน้าที่ย่อย ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์และเซลโลไบโอส ให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส

7. การผลิตกรดแลคติกแบบการย่อยพร้อมการหมัก

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาประสิทธิภาพการหมักวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยรวมกระบวนการย่อยไว้ในขั้นตอนเดียวกันกับการหมัก หรือที่เรียกว่าการย่อยพร้อมการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เติมเอนไซม์เซลลูเลสย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสออกมา แล้วเติมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้หมักน้ำตาลกลูโคสไป

เป็นกรดแลคติกในขั้นตอนเดียว ทำให้กระบวนการผลิตใช้ระยะเวลาสั้นลง ข้อได้เปรียบของการหมักแบบการย่อยพร้อมการหมัก คือ สามารถเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลคติกได้ เพราะสามารถเปลี่ยนแปลงน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้เป็นกรดแลคติกได้โดยตรง จึงช่วยลดปัญหาของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยความเข้มข้นที่สูงของผลิตภัณฑ์ (น้ำตาลกลูโคส) ทำให้สามารถใช้เอนไซม์ในปริมาณที่น้อยลง ใช้อุปกรณ์น้อยลงและใช้เวลาในการหมักสั้นลง เพราะสามารถรวมถึงในขั้นตอนการย่อยกับถึงในกระบวนการหมักเป็นถึงเดียวกัน และทำให้ได้ผลผลิตในปริมาณที่สูงขึ้น แต่ก็มีข้อเสียคือ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์จะสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ โดยงานวิจัยที่ผลิตกรดแลคติกจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก ดังแสดงใน Table 10 สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสแบบการย่อยพร้อมการหมัก ได้แก่ การปรับสภาพวัตถุดิบ ปริมาณสับสเตรท ปริมาณเอนไซม์ อุณหภูมิ การควบคุมพีเอช และรูปแบบการหมัก

7.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ

เนื่องจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลสและฮีมเซลลูโลส โดยมีลิกนินหุ้มอยู่ภายนอก และมีโครงสร้างเป็นผลึกซับซ้อนยากต่อการเข้าถึงของตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งที่เป็นสารเคมีหรือเอนไซม์ (Singh *et al.*, 2014) ในกระบวนการเปลี่ยนวัสดุลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส หากทำการแยกลิกนินออก (delignification) หรือปรับสภาพวัสดุก่อนก็จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการได้ (Yoon *et al.*, 2014) จากงานวิจัยของ Hu และคณะ (2016) ที่ได้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก พบว่าการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถกำจัดลิกนินได้ร้อยละ 13.85 และสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 92.3 กรัมต่อลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ Wang และคณะ (2017) ได้ศึกษาการปรับสภาพซังข้าวโพดโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก พบว่าสถานะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ คือ การใช้กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ในการปรับสภาพซังข้าวโพดที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 80 นาที และเมื่อนำซังข้าวโพดหลังการปรับสภาพมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 30 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมซังข้าวโพด พบว่าสามารถเปลี่ยนซังข้าวโพดไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ถึงร้อยละ 71.1 ในเวลา 72 ชั่วโมง และเมื่อนำซังข้าวโพดหลังปรับสภาพมาผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* โดยใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 10 พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 18.0 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

7.2 ปริมาณของสับสเตรท

ปริมาณและชนิดสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการย่อยพร้อมการหมักเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ ซึ่งสับสเตรทจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียแลกติกนำไปใช้ในการเจริญและผลิตกรดแลกติก โดยชนิดของสับสเตรทที่แตกต่างกันจะมีองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่ต่างกัน ทำให้ได้ปริมาณและชนิดของน้ำตาลที่ต่างกัน นอกจากนี้ปริมาณลิกนิน ความแข็งแรง ระดับความเป็นผลึก พื้นที่ผิวและองค์ประกอบของสับสเตรทก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิตผลิตภัณฑ์และอัตราการย่อยของเอนไซม์ เช่น ลิกนินจะขัดขวางการเข้าถึงของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเซลลูโลสและสร้างพันธะกับเอนไซม์ที่ไม่สามารถผันกลับได้ ดังนั้นการแยกลิกนินออกจึงสามารถเพิ่มอัตราการย่อยของเอนไซม์ได้ (Sun and Cheng, 2002) นอกจากนี้การใช้สับสเตรทประเภทลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นของแข็งจะมีข้อจำกัด คือ ปริมาณสับสเตรทที่มากเกินไปจะทำให้เกิดการกวนผสมได้น้อย และการเข้าถึงของเอนไซม์ต่อสับสเตรทเกิดได้ยาก ซึ่งเป็นผลมาจากข้อจำกัดของการถ่ายโอนมวลในระบบ (ยุทธศักดิ์ สุภการีย์, 2552)

Zhao และคณะ (2013) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการย่อยพร้อมการหมักจากซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางและผ่านการกำจัดสารยับยั้งด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus resiniae* ZN1 และใช้เชื้อ *Pediococcus acidilactici* DQ2 ในการหมักกรดแลกติก โดยใช้ปริมาณซังข้าวโพดที่ต่างกัน คือ ร้อยละ 15, 20, 25 และ 30 โดยน้ำหนัก หมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5 ใช้เอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรม 15 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมซังข้าวโพด พบว่าปริมาณซังข้าวโพดร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคือ 72.7 กรัมต่อลิตร ในเวลา 80 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ Hama และคณะ (2015) ที่ศึกษาการใช้ปริมาณไม้เนื้อแข็งที่ต่างกันในการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการย่อยพร้อมการหมักจากไม้เนื้อแข็ง โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งใช้ปริมาณไม้เนื้อแข็งร้อยละ 5, 10 และ 15 โดยน้ำหนัก หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 5.5 ใช้เอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรม 30 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมไม้เนื้อแข็ง พบว่าการใช้ปริมาณไม้เนื้อแข็งร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด 84.6 กรัมต่อลิตร ในเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ Shi และคณะ (2018) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus pentosus* ATCC8014 จากกากตะกอนของเสียที่ได้จากบ่อปลาควมมีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบโดยใช้กากตะกอนในปริมาณที่ต่างกัน คือ ร้อยละ 6.8, 10 และ 15 โดยน้ำหนัก พบว่าเมื่อปริมาณกากตะกอนเพิ่มขึ้นทำให้การผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ปริมาณกากตะกอนร้อยละ 15 เป็นปริมาณที่ให้กรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 35.7 กรัมต่อลิตร

7.3 ปริมาณเอนไซม์

ปริมาณและชนิดของเอนไซม์ที่เติมเข้าไปเพื่อย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการผลิตกรดแลคติกโดยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก การเติมเอนไซม์ในปริมาณมากจะทำให้เกิดการย่อยเพิ่มขึ้นและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักได้ แต่จะเป็นการเพิ่มต้นทุนของการผลิต ถ้าใช้เอนไซม์น้อยเกินไปก็จะทำให้การผลิตกรดแลคติกเกิดขึ้นช้าและได้ผลผลิตน้อย ในส่วนของชนิดของเอนไซม์ที่เติมเข้าไปก็ต้องมีความจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพในการย่อย เช่นการเติมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเข้าไปผสมกับเอนไซม์เซลลูเลส จะทำให้เกิดการย่อยเป็นน้ำตาลได้ดีกว่าระบบที่มีแต่เซลลูเลสอย่างเดียว เนื่องจากเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสามารถย่อยเซลโลไบโอสได้เป็นกลูโคส 2 โมเลกุลซึ่งเป็นการลดการยับยั้งโดยเซลโลไบโอสได้ (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้ จตุพร ปานทอง (2557) ศึกษาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการย่อยเส้นใยปาล์ม โดยการใส่เอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรม 5, 10, 20, และ 30 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมเส้นใยปาล์ม ย่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 5 ด้วยอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นส่งผลให้น้ำตาลกลูโคสมีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยการใส่เอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรม 30 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมเส้นใยปาล์มจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุด คือ 13.5 กรัมต่อลิตร

Zhao และคณะ (2013) ผลิตกรดแลคติกแบบการย่อยพร้อมการหมักจากซังข้าวโพดโดยเชื้อ *Pediococcus acidilactici* DQ2 และใช้เอนไซม์ Accellerase 1000 (จาก Genecor International) ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ไซลานเนส และเบต้ากลูโคซิเดส ซึ่งมีค่ากิจกรรม 15 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมซังข้าวโพด หมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส พีเอช 5.5 ได้ปริมาณกรดแลคติก 101.9 กรัมต่อลิตร ในเวลา 96 ชั่วโมง ต่อมา Hu และคณะ (2016) ได้ทำการผลิตกรดแลคติกโดยวิธีการย่อยพร้อมการหมักแบบกึ่งกะจากต้นข้าวโพดที่ผ่านการล้างหลังการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 โดยใช้เอนไซม์ Cellic CTec 2 (Novozym Denmark) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เบต้ากลูโคซิเดส และไซลานเนส ที่มีค่ากิจกรรม 30 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมซังข้าวโพด โดยเชื้อ *Lactobacillus pentosus* FL0421 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6 ได้ปริมาณกรดแลคติก 92.30 กรัมต่อลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ Shi และคณะ (2018) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus pentosus* ATCC8014 จากกากตะกอนของเสียที่ได้จากบ่อปลาอุกมีมิลิก โนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส (Novozym Cellic CTec2) ที่มีค่ากิจกรรมที่แตกต่างกัน คือ 0, 10 และ 20 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากตะกอน พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ทำให้เชื้อสามารถผลิตกรดแลคติกได้เพิ่มขึ้น โดยที่

เอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 20 ฟิลเตอร์เปเปอร์ยูนิตทำให้เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด

7.4 อุณหภูมิ

กระบวนการย่อยพร้อมการหมักนอกจากจะมีข้อได้เปรียบทางเศรษฐศาสตร์แล้วยังเป็นการลดการยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการย่อยโดยเอนไซม์ด้วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลรีดิคซ์ แต่จะมีปัญหาเรื่องอุณหภูมิที่เหมาะสมเนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมของการย่อยด้วยเอนไซม์กับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักมีความแตกต่างกัน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมของการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสคือ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งถ้าอุณหภูมิที่ใช้ต่ำเกินไปก็จะทำให้เกิดการย่อยน้ำตาลได้น้อย ในขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียแลกติกคืออุณหภูมิ 37 ถึง 43 องศาเซลเซียส (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000)

ดังนั้นในกระบวนการหมักแบบการย่อยพร้อมกับการหมักร่วมจึงจำเป็นต้องมีการย่อยเบื้องต้น (prehydrolysis) ก่อนกระบวนการหมักโดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็นช่วงระยะเวลาหนึ่งก่อนใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติกเพื่อให้ได้น้ำตาลในระดับหนึ่งสำหรับการเจริญของแบคทีเรียแลกติกในช่วงแรก (Olofsson *et al.*, 2008) โดย Zhao และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการย่อยพร้อมการหมักจากซังข้าวโพด โดยเชื้อ *Pediococcus acidilactici* DQ2 ที่มีปริมาณซังข้าวโพดร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก และใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 15 ฟิลเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมซังข้าวโพด ทำการย่อยเบื้องต้นเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการหมักโดยใช้อุณหภูมิในการหมักที่แตกต่างกัน คือ 42, 45, 48 และ 50 องศาเซลเซียส หมักที่พีเอช 5.5 พบว่า ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด 73.5 กรัมต่อลิตร และได้ผลผลิตร้อยละ 63.7 ในเวลา 80 ชั่วโมง

7.5 การควบคุมพีเอช

การควบคุมพีเอชที่เหมาะสมในการหมักกรดแลกติกแบบการย่อยพร้อมการหมักจะทำให้การผลิตกรดแลกติกได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น หรือได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น Abdel-Rahman และคณะ (2011) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลส คือ 5.0 ส่วนพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการหมักกรดแลกติกของกลุ่มแบคทีเรียแลกติกจะอยู่ในช่วง 5.0-7.0 ซึ่งเห็นได้ว่าพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์และการหมักกรดแลกติกมีค่าที่ใกล้เคียงกัน โดย Zhao และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการย่อยพร้อมการหมักจากซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเจือจางและกำจัดสารยับยั้งเฟอร์ฟูรอล (furfural) และ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (hydroxymethylfurfural) ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus resiniae* ZN1 โดยเชื้อ *P. acidilactici* DQ2 และใช้พีเอชในการหมักที่แตกต่างกัน

คือ 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ใช้เอนไซม์ที่มีกิจกรรม 15 ฟิเตอร์เปเปอร์ต่อกรัมซังข้าวโพด ปริมาณซังข้าวโพดร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก หมักที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส พบว่าที่พีเอช 5.5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด คือ 73.5 กรัมต่อลิตร และได้ผลผลิตร้อยละ 63.7 ในเวลา 80 ชั่วโมง

Table 10 Summary of condition in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosic biomass for lactic acid production

| Substrate | Strains | Pretreatment | Substrate (%w/v) | Enzyme | pH | Temperature (°C) / Time (h) | LA (g/L) | Ref. |
|-------------|--|---|---------------------|--|-----------------------|--|---|------------------------------|
| Corn stover | <i>Pediococcus acidilactici</i> TY112 | Dry sulfuric acid and detoxified by <i>Aspergillus resiniae</i> ZN1 | 10 | Cellulase 15 FPU/g | 5.5 | 50/6 ^a 45/72 ^b | 104.5 | Liu <i>et al.</i> (2015) |
| | <i>P. acidilactici</i> DQ2 | Dry sulfuric acid | 30 | Cellulase 15 FPU/g | 5.5 | 50/8 ^a 48/96 ^b | 101.9 | Zhao <i>et al.</i> (2013) |
| | <i>Lactobacillus pentosus</i> FL0421 | 5% NaOH | 14 | Cellic CTec2 (cellulase, β - glucosidase, xylanase) 30 FPU/g | 6.0 | 50/6 ^a 37/48 ^b | 92.3 | Hu <i>et al.</i> (2016) |
| | <i>L. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> CICC21101 | 1.5% solid hydrochloric acid | 10 | Cellulase 30 FPU/g | 5.5 | - ^a 42/48 ^b | 18.0 | Wang <i>et al.</i> (2017) |
| | <i>P. acidilactici</i> ZP26 | Dry dilute acid pretreated and biodetoxified | 25 | Cellulase 15 FPU/g | 5.5 | 50/6 ^a 45/72 ^b | 77.7 | Yi <i>et al.</i> (2016) |
| | Hardwood pulp | <i>L. Plantarum</i> NCLMB 8826 | Mill | 15 | Cellulase 20 FPU/g | 5.5 | 50/6 ^a 37/72 ^b | 84.6 |
| wheat bran | <i>S. inulinus</i> YBS1-5 | 5% dilute acid pretreatment | 20 | Cellulase 20 FPU/g | 5.5 | 50/8 ^a 40/108 ^b | 87.3 | Li <i>et al.</i> (2017) |

^a Temperature and time for prehydrolysis, ^b Temperature and time for fermentation

7.6 รูปแบบของการหมัก

กระบวนการหมักจากชีวโมเลกุลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กระบวนการใหญ่ๆ คือ การหมักแบบกะ การหมักแบบกึ่งกะ และการหมักแบบต่อเนื่อง โดยที่กระบวนการหมักแบบกะจะเป็นกระบวนการหมักในระบบปิดที่มีปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงในระบบแล้วจะไม่มีเพิ่มเติมอาหารใดๆ เพิ่มลงไปอีก นอกจากกรดหรือด่างที่ใช้ในการควบคุมพีเอช ในขณะที่กระบวนการหมักแบบกึ่งกะเป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มเข้าไปในอาหารเดิมเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้อาหารอย่างเต็มที่โดยไม่มีการถ่ายเทน้ำหมักออก การหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้แก้ปัญหาเรื่องความเข้มข้นของอาหารเริ่มต้น ซึ่งหากความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารสูงเกินไปจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องที่มีการเติมอาหารใหม่และถ่ายน้ำหมักออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีและเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยไม่มีข้อจำกัดในด้านอาหาร การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบต่อเนื่องมีข้อดี คือ ให้ผลผลิตสูงกว่าการหมักแบบกะ มีความสม่ำเสมอในการผลิตผลิตภัณฑ์และสามารถควบคุมโดยใช้ระบบอัตโนมัติ ส่วนข้อเสีย คือ มีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้ง่ายถ้าระบบไม่มีการป้องกันที่ดีพอ (สมใจ ศิริ โภช, 2537) อีกทั้งในปัจจุบันยังมีกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ (repeated batch) ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีการถ่ายอาหารเดิมออกจากระบบแต่ยังคงมีเซลล์เดิมอยู่ในระบบจากนั้นจึงเติมอาหารใหม่เข้าไปในระบบเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์รอบต่อไป (Zhao *et al.*, 2010) การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบการหมักแบบกะซ้ำมีข้อดี คือ สามารถลดระยะเวลาในการหมักและเพิ่มผลผลิตผลิตภัณฑ์ได้ เนื่องจากความเข้มข้นของเซลล์ในระบบที่สูง (Naritomi *et al.*, 2002) และยังสามารถลดการเกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ได้เช่นกัน

งานวิจัยที่ผลิตกรดแลคติกจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักที่ใช้ระบบการหมักที่แตกต่างกัน ดังแสดงใน Table 11 ซึ่งจากการศึกษาของ Hama และคณะ (2015) ที่ผลิตกรดแลคติกจากมันเนื้อแข็งด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักในระบบการหมักแบบกะโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ใช้ปริมาณ มันเนื้อแข็งร้อยละ 15 และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 20 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัม มันเนื้อแข็ง หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 5.5 พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 84.6 กรัมต่อลิตร ในเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ Hu และคณะ (2015) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus pentosus* จากซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ผ่านและไม่ผ่านการล้างหลังจากปรับสภาพด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก โดยมีปริมาณซังข้าวโพดร้อยละ 8 และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 30 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมซังข้าวโพด หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6

พบว่าซังข้าวโพดที่ไม่ผ่านการล้างหลังปรับสภาพให้ปริมาณกรดแลคติก 37.0 กรัมต่อลิตร ในเวลา 30 ชั่วโมง โดยที่ยังมีน้ำตาลกลูโคสคงเหลือในระบบ 10 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการล้างหลังการปรับสภาพเพื่อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายใน 18 ชั่วโมง และสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 54.3 กรัมต่อลิตร และพบว่าการหมักแบบกึ่งกะโดยการเติมซังข้าวโพดให้มีปริมาณร้อยละ 14 ที่ชั่วโมงที่ 18 และเติมเอนไซม์เซลลูเลสให้มีค่ากิจกรรม 30 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมซังข้าวโพดที่ชั่วโมงที่ 30 ของการหมัก พบว่าปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเป็น 92.5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง และจากงานวิจัยของ Wang และคณะ (2016) ที่ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากกากลำต้นข้าวฟ่างหวานหลังการคั้นน้ำด้วยวิธีการหมักแบบการย่อยพร้อมการหมักแบบกะซ้าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 74.0 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะสามารถเพิ่มปริมาณกรดแลคติกได้ถึง 111.0 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมงเท่ากัน และถ้าความเข้มข้นของกรดแลคติกมากเกินไปยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกได้ ซึ่งการใช้ระบบการหมักแบบกะซ้าสามารถเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลคติกและลดการเกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งจากรายงานของ Tosungnoen และคณะ (2014) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากมันสำปะหลัง โดยใช้ น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลังแทนที่อาหาร modified MRS โดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MSUL702 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาย่อยแป้งได้โดยตรงด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักแบบกะซ้า ที่มีปริมาณของมันสำปะหลังร้อยละ 4 หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการทดลองทั้งหมด 5 กะ พบว่าปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นจาก 20.29 ถึง 28.71 และอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นจาก 0.21 ถึง 0.60 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ Okano และคณะ (2017) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากกากข้าวกล้องด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักแบบกะซ้า โดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 IdhL1::amyA ที่มีปริมาณกากข้าวกล้องร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ซึ่งในแต่ละกะจะใช้เซลล์เดิม พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ถึง 10 กะ โดยที่ปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นจาก 118.4 ถึง 129.8 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นจาก 1.67 ถึง 2.18 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Table 11 Summary lactic acid production through SSF process by various operation mode

| Microorganism | Product | Operation mode | Substrate | Titer (g/L) | Productivity (g/L/h) | Yield (g/g) | Ref. |
|---------------------------------|---------------|---------------------|---------------------------|-------------|----------------------|-------------|---------------------------------|
| <i>Lactobacillus casei</i> G-02 | L-lactic acid | Fed-batch (SSF) | Jerusalem artichoke | 141.50 | 4.70 | 0.96 | Ge <i>et al.</i> (2010) |
| <i>L. pentosus</i> FL0421 | Lactic acid | Fed-batch (SSF) | Corn stover | 92.30 | 1.92 | 0.66 | Hu <i>et al.</i> (2016) |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | Lactic acid | Batch (SSF) | Detoxified corn stover | 104.50 | 1.45 | 0.72 | Lui <i>et al.</i> (2015) |
| <i>L. plantarum</i> (GMO) | D-lactic acid | Batch (SSF) | Delignified hardwood pulp | 102.30 | 2.29 | 0.88 | Hama <i>et al.</i> (2015) |
| <i>L. paracasei</i> | L-lactic acid | Batch (SSF) | <i>Curcuma longa</i> | 91.61 | 2.08 | 0.69 | Nguyen <i>et al.</i> (2013) |
| <i>L. coryniformis</i> | D-lactic acid | Batch (SSF) | biomass | 97.13 | 2.70 | 0.65 | (2013) |
| <i>L. rhamnosus</i> ATCC7469 | Lactic acid | Batch (SSF) | Recycled paper sludge | 73.0 | 2.90 | 0.97 | Djukic <i>et al.</i> (2012) |
| <i>L. plantarum</i> MSUL702 | Lactic acid | Repeated-batch(SSF) | Cassava starch | 20.29-28.71 | 0.21-0.60 | nd | Tosungnoen <i>et al.</i> (2014) |

*nd means not detected

8. กระบวนการเก็บเกี่ยวและการทำบริสุทธิ์กรดแลคติก

กระบวนการเก็บเกี่ยวและการทำให้กรดแลคติกมีความบริสุทธิ์ มีหลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้งานเป็นหลัก ในอุตสาหกรรมอาหารจะต้องการกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 55 ถึงร้อยละ 80 โดยจะต้องเป็นกรดแลคติกที่ไม่มีสีและเกือบจะไม่มีกลิ่น ส่วนในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพใช้กรดแลคติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง (high optical purity) และมีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 88 อีกทั้งยังสามารถทนอุณหภูมิที่สูงได้และไม่เกิดสีที่

อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส (อภิชาติ บุญทาวัน, 2551) ทำให้การแยกและการทำบริสุทธิ์กรดแลคติกเป็นกระบวนการที่มีต้นทุนสูง วิธีการแยกกรดแลคติกออกจากน้ำหมักมีหลายวิธี แต่โดยทั่วไปจะใช้วิธีการตกตะกอนด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตเนื่องจากเป็นกระบวนการที่ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก โดยที่แคลเซียมคาร์บอเนตจะจับตัวกับกรดแลคติกกลายเป็นเกลือแคลเซียมแลคเตท ทำให้สามารถแยกกรดแลคติกออกจากน้ำหมักได้ จากนั้นจึงเติมกรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 78 เพื่อแยกเอาแคลเซียมออก โดยที่เกลือแคลเซียมแลคเตทจะถูกสลายให้เป็นกรดแลคติกอิสระและเกิดเป็นตะกอนของเกลือแคลเซียมซัลเฟต จากนั้นทำการกรองเอาเกลือแคลเซียมออกไป ส่วนสารละลายกรดแลคติกที่ได้จะถูกนำมาระเหยเอาน้ำออกด้วยเครื่องระเหย จากนั้นกำจัดสีออกโดยใช้ถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) แล้วทำให้กรดแลคติกมีความบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchanger) ดังแสดงใน Figure 7

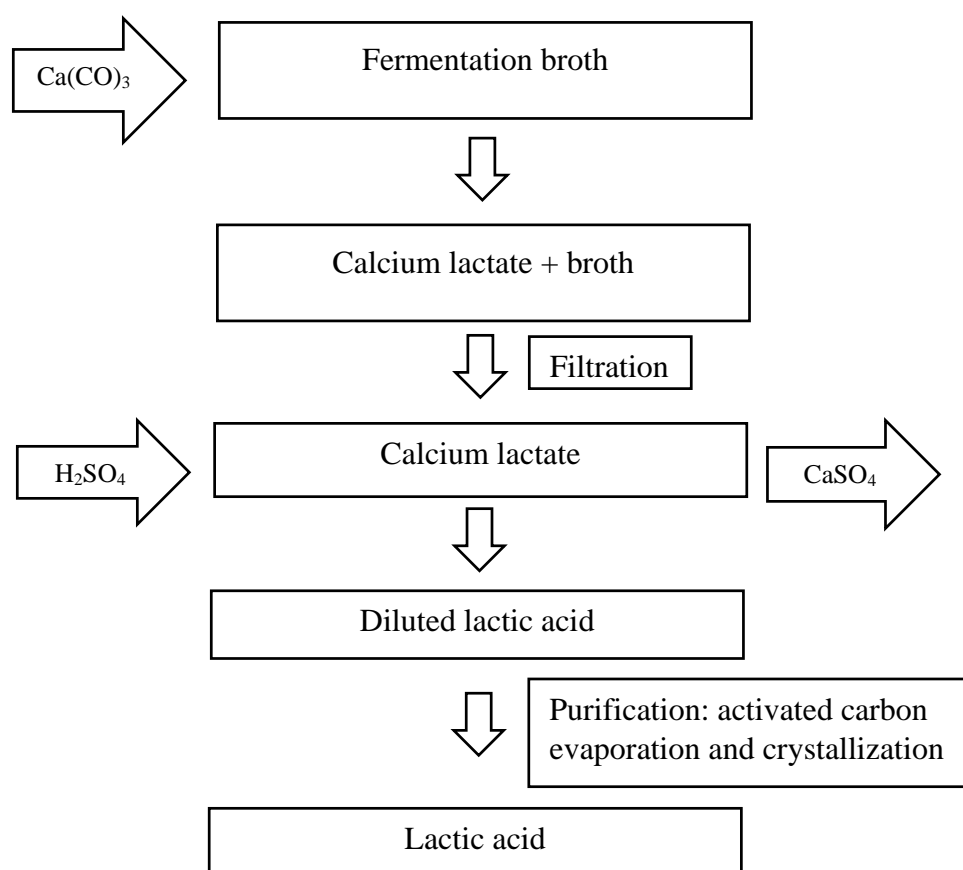


Figure 7 The traditional process of lactic acid purification: extraction by precipitation

Source: Oliveira *et al.* 2018

Min และคณะ (2011) ศึกษาการเก็บเกี่ยวกรดแลคติกออกจากน้ำหมักที่มีความบริสุทธิ์ของกรดแลคติกเริ่มต้นร้อยละ 69 โดยวิธีการตกตะกอนด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต โดยศึกษาผลของอัตราส่วน โมลของแคลเซียมแลคเตทต่อกรดซัลฟูริก ที่อัตราส่วน 1.0:0.5, 1.0:0.75, 1.0:1.0, 1.0:1.25 และ 1.0:1.5 พบว่าที่อัตราส่วน 1.0:1.0 เป็นอัตราส่วนที่ทำให้ได้ปริมาณของแคลเซียมซัลเฟตมากที่สุด แสดงว่ามีปริมาณกรดแลคติกอิสระออกมามาก นอกจากนี้ยังศึกษาผลของพีเอชของสารละลายแคลเซียมแลคเตทก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริก พบว่าที่พีเอชมากกว่าค่า pKa ของแคลเซียมแลคเตท จะทำให้แคลเซียมแลคเตทอยู่ในรูปที่แตกตัวเป็นไอออนทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริกได้ง่าย จากนั้นจึงกำจัดสีของสารละลายกรดแลคติกด้วยถ่านกัมมันต์และพบว่าความบริสุทธิ์ของกรดแลคติกหลังจากการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีการตกตะกอนมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 92

นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นๆ เช่น การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (solvent extraction) ซึ่งจะใช้สารละลายอินทรีย์ในการสกัดกรดแลคติก ทำให้หลังเสร็จสิ้นกระบวนการยังเกิดสารละลายอินทรีย์นี้อยู่ ซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม (Lee, 1998) วิธีการตกผลึก (crystallization) กรดแลคติกที่ถูกแยกโดยวิธีตกผลึกจะได้ผลผลิตต่ำและมีต้นทุนการดำเนินการที่สูง นอกจากนี้ยังมีวิธีการดูดซับ (adsorption) กรดแลคติกโดยใช้เรซินแลกเปลี่ยนประจุซึ่งเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจในการแยกกรดแลคติกออกจากน้ำหมักเนื่องจากเป็นวิธีที่ต้นทุนต่ำและเป็นเทคนิคที่ใช้กัน ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น การกำจัดอิมูนออกจากน้ำ (Cao *et al.*, 2002) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า การใช้เรซินแลกเปลี่ยนอิมูนสามารถแยกกรดแลคติกออกจากสิ่งเจือปนอื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการดูดซับบนเรซินนั้นเกิดจากการดูดซับและการแลกเปลี่ยนอิมูนของเรซิน (Moldes *et al.*, 2003) แต่จะมีปัญหาในส่วนของพื้นที่ผิวของการดูดซับเนื่องจากเรซินมีพื้นที่ผิวที่จำกัดซึ่งอาจทำให้ประสิทธิภาพการดูดซับลดลงแต่อย่างไรก็ตามระบบการดูดซับนั้นจะมีการชะเพื่อนำเรซินกลับมาใช้ใหม่ได้ (Thang *et al.*, 2008)

8.1 การเก็บเกี่ยวกรดแลคติกโดยวิธีการดูดซับด้วยเรซินแลกเปลี่ยนประจุ

กระบวนการดูดซับเป็นกระบวนการแยกสารผสมที่อาศัยตัวดูดซับซึ่งเป็นวัสดุของแข็งที่ให้ตัวถูกละลายที่สนใจยึดจับกันอย่างหลวมๆ แบบผันกลับได้ สารที่ต้องการแยกจะยึดเกาะบนผิวของตัวดูดซับด้วยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลอย่างอ่อน ในกระบวนการทางชีวภาพนิยมใช้ตัวดูดซับ 2 ประเภท คือ ตัวดูดซับจำพวกคาร์บอน และเรซินสังเคราะห์ชนิดแลกเปลี่ยนอิมูน (Ion exchange resins) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยหมู่ที่มีประจุ เช่น $-SO_3^-$, $-COO^-$ และ $-NR_3^+$ สำหรับเรซินที่ทำมาจากสเตอรีน (Styrene) และไดไวนิลเบนซีน (Divinylbenzene) จะดูดซับสารที่ไม่มีขั้ว (Nonpolar) ส่วนเรซินที่ทำมาจากอะคริลิกเอสเตอร์ (Acrylic ester) จะสามารถ

ดูดซับสารกลุ่มที่ชอบน้ำ (Hydrophilic solutes) ได้ดี ในระหว่างกระบวนการดูดซับนั้นสารจะถูกดูดซับและมีการคายการดูดซับไปพร้อมๆ กัน โดยสมดุลจะเกิดขึ้นเมื่ออัตราการดูดซับและอัตราการคายการดูดซับมีค่าเท่ากัน ที่จุดนี้ความเข้มข้นของสารที่ถูกดูดซับจะเท่ากับความเข้มข้นในสารดูดซับที่อุณหภูมิคงที่หนึ่งๆ ซึ่งจะใช้ ไอโซเทอมการดูดซับ (Adsorption Isotherm) เป็นตัวแทนในการอธิบายสมดุลที่เกิดขึ้น (ฐานภาวรินทร์ รำพาย, 2554)

8.1.1 ไอโซเทอมการดูดซับ (Adsorption isotherm)

ไอโซเทอมการดูดซับ คือกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสารที่ถูกดูดซับต่อน้ำหนักของสารดูดซับ ซึ่งจะบ่งบอกถึงความสามารถในการดูดซับของเรซินชนิดนั้นๆ (อิทธิชัย นพแก้ว, 2539) โดยรูปแบบของไอโซเทอมการดูดซับจะให้ข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการดูดซับและปริมาณสารที่ถูกดูดซับบนพื้นผิวสารดูดซับ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ 6 รูปแบบ (Rouqurol *et al.*, 1999) ดังแสดงใน Figure 8

1) แบบที่ 1 (Type I) เป็นการดูดซับที่พบมากที่สุด คือการดูดซับโดยมีชั้นของตัวถูกดูดซับคลุมบนผิวของสารดูดซับเพียงชั้นเดียว เป็นลักษณะการดูดซับของวัสดุที่ไม่มีรูพรุน (Non-Porous) จาก Figure 8 จะเห็นได้ว่าการดูดซับเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ความดันสัมพัทธ์ต่ำๆ และที่ความดันสัมพัทธ์เข้าใกล้ 1 จะเกิดการดูดซับเพียงเล็กน้อย

2) แบบที่ 2 (Type II) เป็นการดูดซับของโมเลกุลที่มากกว่า 1 ชั้น โดยชั้นของตัวถูกดูดซับบนผิวของตัวดูดซับหนาขึ้นเรื่อยๆ มักพบในตัวดูดซับที่ไม่มีรูพรุน หรือรูพรุนส่วนใหญ่มีขนาดกลาง (2-50 นาโนเมตร) และขนาดใหญ่ (มากกว่า 50 นาโนเมตร)

3) แบบที่ 3 (Type III) เป็น ไอโซเทอมที่มีลักษณะคล้ายระจกเว้าและไม่มีจุดเปลี่ยนกราฟเป็นลักษณะการดูดซับที่แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของตัวถูกดูดซับและผิวหน้าของตัวดูดซับทำให้เกิดการดูดซับได้น้อยที่ความดันสัมพัทธ์ต่ำแต่การดูดซับจะเกิดขึ้นมากเมื่อความดันสัมพัทธ์สูงขึ้น

4) แบบที่ 4 (Type IV) ลักษณะของไอโซเทอมการดูดซับคล้ายกับแบบที่ 2 แต่มีการเกิดการดูดซับหลายชั้นอย่างจำกัด พบได้ในการดูดซับของแข็งพวก Mesopores

5) แบบที่ 5 (Type V) ลักษณะไอโซเทอมคล้ายกับแบบที่ 3 แต่มีจุดเปลี่ยนกราฟและ Hysteresis Loop เกิดกับระบบดูดซับที่แรงดึงดูดระหว่างตัวดูดซับและตัวถูกดูดซับมีค่าน้อย

6) แบบที่ 6 (Type VI) เป็น ไอโซเทอมแบบขั้นบันได (stepped isotherm) เกิดกับตัวดูดซับที่ไม่มีรูพรุนและมีลักษณะพื้นที่ผิวสม่ำเสมอ ทำให้เกิดการดูดซับเป็นช่วงๆ ตามความดันที่เพิ่มขึ้น โดยลักษณะรูปร่างของขั้นบันไดจะขึ้นอยู่กับระบบและอุณหภูมิของระบบ

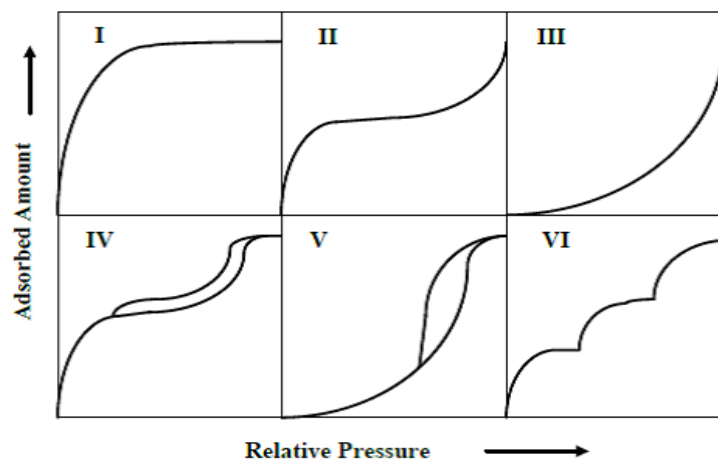


Figure 8 Isotherm type

Source: Rouquerol *et al.* (1999)

8.1.2 สมการไอโซเทอมการดูดซับ (Adsorption isotherm equations)

สมการไอโซเทอมการดูดซับ คือ สมการที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารที่ถูกดูดซับกับความเข้มข้นของสารที่สถานะสมดุลที่อุณหภูมิใดๆ ดังแสดงใน Figure 9

1) ไอโซเทอมเชิงเส้น (Linear isotherm) ความสัมพันธ์ที่สถานะสมดุลของกระบวนการดูดซับที่เป็นแบบเชิงเส้นจะแสดงด้วยสมการที่คล้ายคลึงกับกฎของเฮนรี (Henry's law) ดังแสดงในสมการที่ 1

$$q = KC \dots\dots\dots (1)$$

โดยที่ K คือ ค่าคงที่สมดุลของกระบวนการดูดซับ ($\text{m}^3/\text{kg adsorbent}$)

2) ไอโซเทอมแบบ Freundlich เป็นไอโซเทอมที่นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการอธิบายความสัมพันธ์ที่สถานะสมดุลของกระบวนการดูดซับที่ตัวถูกดูดซับเรียงซ้อนกันหลายชั้นด้วยพันธะอ่อนๆ โดยเฉพาะในระบบของเหลว-ของแข็ง ความสัมพันธ์ของไอโซเทอม Freundlich ดังแสดงในสมการที่ 2

$$q_e = K_f C^{1/n} \dots\dots\dots (2)$$

$$\log q = \frac{1}{n} \log C + \log K_f \dots\dots\dots (3)$$

โดยที่ C คือ ความเข้มข้นของตัวถูกดูดซับที่สมดุล (mg/L)

q คือ ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ (mg) ต่อปริมาณตัวดูดซับ (g) ที่ภาวะสมดุล

K_f คือ ค่าคงที่ที่แสดงความสามารถในการดูดซับแบบหลายชั้น (mg/g)

n คือ ค่าคงที่สัมพันธ์กับพลังงานของการดูดซับซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลาย

เมื่อพล็อตกราฟระหว่าง $\log q$ กับ $\log C$ จะได้กราฟเส้นตรงที่มีความชันเท่ากับ $1/n$ และมีจุดตัดแกนเท่ากับ $\log K_f$ จากสมการความสัมพันธ์ ความสามารถในการดูดซับสามารถได้จากการพิจารณาความชันของกราฟระหว่าง $\log C$ กับ $\log q$ ถ้ากราฟมีค่าความชันมาก หรือค่า n น้อย แสดงว่าการดูดซับจะเกิดได้ดีที่ความเข้มข้นสูงๆ แต่เกิดได้น้อยที่ความเข้มข้นต่ำ ส่วนค่า $1/n$ อธิบายถึงไอโซเทอมของการดูดซับ ถ้าเท่ากับ 1 ไอโซเทอมของการดูดซับเป็นเส้นตรง แต่ถ้ามากกว่า 1 อธิบายถึงปริมาณพื้นผิวบนตัวดูดซับมีปริมาณจำกัดที่จะใช้ในการดูดซับ

3) ไอโซเทอมแลงเมียร์ (Langmuir isotherm) เป็นกระบวนการดูดซับที่มีสมมติฐานว่า การดูดซับสูงสุดสัมพันธ์กับโมเลกุลของตัวถูกละลายที่จัดเรียงตัวเพียงชั้นเดียวบนพื้นผิวดูดซับ มีพลังงานของการดูดซับคงที่ ไม่มีการเคลื่อนที่ของโมเลกุลตัวถูกละลายในแนวระนาบพื้นที่ผิวตัวดูดซับ (Patterson and Patzelt, 1981)

สมการแสดงความสัมพันธ์ของไอโซเทอมแลงเมียร์ ดังสมการที่ 4

$$q_e = (q_m b C_e) / (1 + b C_e) \dots \dots \dots (4)$$

โดยที่ q_e คือ ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ (mg) ต่อปริมาณของตัวดูดซับ (g) ที่ภาวะสมดุล

q_m คือ ปริมาณสารที่ถูกดูดซับมากที่สุด (mg/g)

b คือ ค่าคงที่ทางพลังงานของการดูดซับ หรือค่าคงที่ของแลงเมียร์ (L/mg)

C_e คือ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่สมดุล (mg/L)

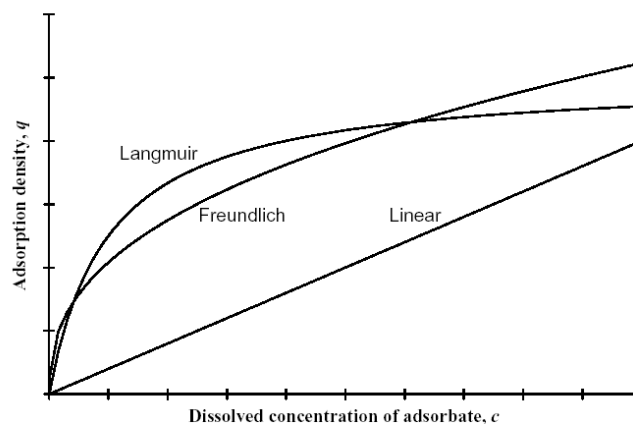


Figure 9 Three common type of adsorption isotherm

Source: Kazak *et al.* (2016)

8.1.3 กระบวนการดูดซับ (Adsorption process)

1) การดูดซับแบบกะ (Batch adsorption)

กระบวนการดูดซับแบบกะโดยทั่วไปมักใช้ในการดูดซับตัวถูกละลายออกจากสารละลาย ในกรณีตัวถูกละลายมีความเข้มข้นน้อย เช่น ในอุตสาหกรรมยา หรือ อุตสาหกรรมอื่นๆ กระบวนการดูดซับแบบกะมีความคล้ายคลึงกับกระบวนการสกัดแบบกะ เนื่องจากในการวิเคราะห์เกี่ยวกับกระบวนการเหล่านี้จำเป็นต้องอาศัยสมการสมดุลมวลสาร (Mass balance) และความสัมพันธ์ที่สถานะสมดุล (Equilibrium relation) สำหรับในกระบวนการดูดซับนั้น ความสัมพันธ์ที่สถานะสมดุล คือ ไอโซเทอมที่ได้จากการทดลอง (Geankoplis, 2004)

2) การดูดซับด้วยคอลัมน์โดยตัวดูดซับอยู่กับที่ (Fixed bed adsorption column)

เนื่องจากความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่อยู่ในเฟสของเหลวและเฟสของแข็งจะเปลี่ยนไปตามเวลาและตำแหน่งในคอลัมน์เมื่อมีการดูดซับเกิดขึ้น เมื่อของเหลวเข้าสู่ทางเข้าคอลัมน์การถ่ายโอนมวลและการดูดซับจะเกิดขึ้น ในขณะเดียวกันความเข้มข้นของสารละลายจะลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน โดยตัวดูดซับหรือเรซินที่บริเวณทางเข้าของคอลัมน์จะดูดซับสารละลายจนอิ่มตัวและบริเวณที่มีการดูดซับที่อิ่มตัวจะเคลื่อนที่ไปอย่างช้าๆจนถึงปลายทางออกของคอลัมน์ เมื่อสารละลายถูกดูดซับไปมากกว่าร้อยละ 95 ของความเข้มข้นเริ่มต้น การดูดซับจะหยุดลงตรงตำแหน่งนี้จะเรียกว่า ตำแหน่ง break point อัตราส่วนของความเข้มข้นของสารละลายเริ่มต้นกับความเข้มข้นของสารละลายขาออก (C/C_0) กับเวลา ตั้งแต่เริ่มต้นการดูดซับจนเกิดการอิ่มตัวของ การดูดซับ เรียกว่า breakthrough curve ดังแสดงใน Figure 10 ลักษณะของ breakthrough curve และตำแหน่งของ break point จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของตัวดูดซับ ตัวถูกละลาย ลักษณะของคอลัมน์ และสถานะการดูดซับ

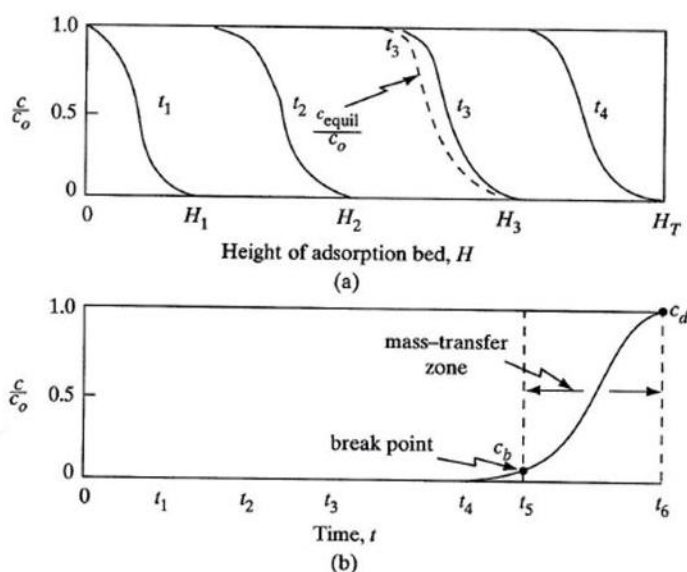


Figure 10 Concentration profiles for adsorption in fixed bed (a) profiles at various positions and times in the bed, (b) breakthrough concentration profile in the fluid at the outlet of bed

Source: Geankoplis (2004)

จากการศึกษาของ Cao และคณะ (2002) ที่ศึกษาการดูดซับกรดแลคติกโดยใช้เรซิน Amberlite IRA-400 ซึ่งเป็นเรซินแลกเปลี่ยนประจุแบบเบสแก่ โดยศึกษาผลของพีเอชที่ต่ำกว่า (พีเอช 2) และสูงกว่า (พีเอช 5) ค่า pKa (3.86) ของกรดแลคติก และศึกษาการคายซับโดยใช้ตัวชะที่แตกต่างกัน คือ กรดไฮโดรคลอริก, กรดซัลฟูริก, แอมโมเนีย, เมทานอล และ โซเดียมคลอไรด์ พบว่า ที่พีเอช 5 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จะได้ไอโซเทอมการดูดซับแบบแลงเมียร์ (Langmuir isotherm) ที่มีค่าการดูดซับสูงสุดเท่ากับ 222.46 มิลลิกรัมต่อกรัมเรซิน สำหรับการดูดซับแบบกะ และค่าการดูดซับ 197.09 มิลลิกรัมต่อกรัมเรซิน สำหรับการดูดซับในคอลัมน์ขนาด 1.0×10^4 เซนติเมตร โดยใช้ น้ำหมักที่ได้จากการผลิตกรดแลคติก และจากการศึกษาการคายซับในคอลัมน์ พบว่า การใช้สารละลายเมทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50 ล้างคอลัมน์ และใช้สารละลายกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ในการชะทำให้ได้ผลผลิตกรดแลคติกร้อยละ 86.21

Tong และคณะ (2004) ศึกษาการแยกกรดแลคติกจากน้ำหมักโดยวิธีการดูดซับด้วยเรซินแลกเปลี่ยนประจุแบบเบสอ่อน Amberlite IRA-92 ก่อนการทดลองมีการปรับสภาพเรซินด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ตามด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก 1 โมลาร์ แล้วตามด้วยน้ำ ตามลำดับ จากนั้นจึงศึกษาอัตราการไหลของน้ำหมักกรดแลคติกที่เข้าสู่คอลัมน์ พีเอช และขนาด

ของคอลัมน์ พบว่าน้ำหมักที่พีเอชเท่ากับ 6 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อ นาที โดยใช้คอลัมน์ชนิด XK ขนาด 16×40 มิลลิเมตร ที่บรรจุเรซิน 30 กรัม สามารถเก็บเกี่ยวกรด แลคติกได้ 1.16 กรัมต่อกรัมเรซิน โดยมีผลผลิตเท่ากับร้อยละ 82.6 และมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 96.2

Gullon และคณะ (2010) ได้ศึกษาการแยกกรดแลคติกและ โอลิโกเมอร์ (Oligomer) จากน้ำหมักโดยวิธีการดูดซับด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออนประจุลบแบบเบสอ่อน Amberlite IRA 96 และ เบสแก่ Amberlite IRA 400 พบว่าเรซิน Amberlite IRA 96 สามารถแยกกรดแลคติกและ โอลิโกเมอร์จากน้ำหมักได้ดีกว่าเรซิน Amberlite IRA 400 ต่อมา Chooklin และคณะ (2013) ได้ ศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus casei* TISTR1500 จากน้ำคั้นลำต้น ปาล์มและใช้คอลัมน์เรซิน Duwex 66 ในการดูดซับกรดแลคติกจากน้ำหมัก พบว่า สามารถดูดซับ กรดแลคติกได้ 148.6 มิลลิกรัมต่อกรัมเรซิน และได้ศึกษาการคายซับโดยใช้ตัวชะที่แตกต่างกัน คือ น้ำ เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.9 และร้อยละ 50 พบว่าการใช้น้ำเป็นตัวชะกรดแลคติกจากเรซินให้ ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุด คือ ร้อยละ 75.16

9. การตรึงเอนไซม์

ในปัจจุบันเทคโนโลยีเอนไซม์ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย อาทิ อุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง สิ่งทอ และผงซักฟอก เป็นต้น โดยเอนไซม์จะทำหน้าที่ในการ เร่งปฏิกิริยาต่างๆให้เร็วขึ้น ในขณะที่กระบวนการเกิดปฏิกิริยานั้นเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่ อย่งไรก็ตามเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมยังมีข้อจำกัด เนื่องจากมีราคาแพง มีความคงตัวต่ำ และ ไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ หรือมีประสิทธิภาพลดลงเมื่อนำกลับมาใช้ซ้ำ (Jesionowski *et al.*, 2014) จึงมีการพัฒนากระบวนการตรึงรูปเอนไซม์มาใช้ในการแก้ปัญหาดังกล่าว การตรึงเอนไซม์ (Enzyme immobilization) เป็นเทคนิคที่ทำให้เอนไซม์อยู่ในขอบเขตหรือมีบริเวณที่จำกัด โดยที่ เอนไซม์นั้นยังคงมีกิจกรรมอยู่ สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง และสามารถนำไปใช้ใน ระบบ การผลิตแบบต่อเนื่อง (อรัญ หันพงษ์กิตติกุล, 2556)

9.1 กระบวนการตรึงรูปเอนไซม์

กระบวนการที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 4 กระบวนการ โดยข้อดี และข้อเสียของแต่ละวิธีดังแสดงใน Table 12

1) การตรึงรูปโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ (adsorption)

การตรึงเอนไซม์โดยวิธีนี้อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาทางกายภาพระหว่างเอนไซม์และตัว พยุงเพื่อให้เกิดการยึดติดกันด้วยพันธะต่างๆ เช่น พันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจน รวมถึงอาศัยแรง แวนเดอร์วาลส์ (Vander waals forces) ระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงในการยึดเกาะ ถึงแม้ว่าพันธะ

ระหว่างเอนไซม์และตัวดูดซับค่อนข้างอ่อนแอ แต่ปฏิกิริยาหรือการยึดเกาะนั้นไม่ส่งผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามการตรึงเอนไซม์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพยังคงมีข้อจำกัดคือ เอนไซม์ที่ตรึงรูปที่ได้จะมีความเสถียรต่ำส่งผลให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวพุงได้ง่าย ทำให้ประสิทธิภาพการใช้ซ้ำและการเร่งปฏิกิริยาลดน้อยลง (Jesionowski *et al.*, 2014)

2) การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้ม (entrapment/encapsulation)

การตรึงเอนไซม์วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะเอนไซม์ไม่ได้ถูกยึดกับตัวพุงหรือจับยึดกันเอง แต่จะถูกขังให้อยู่ในบริเวณที่จำกัดซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ (1) เอนไซม์จะถูกขังหรือห่อหุ้มไว้ภายในช่องตาข่าย ของสารโพลีเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำอย่างสม่ำเสมอ สารที่ใช้ห่อหุ้มเอนไซม์วิธีนี้อาจเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติหรือสังเคราะห์ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องเลือกชนิดของสารโพลีเมอร์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ เนื่องจากสารบางชนิดขณะเกิดเป็นโพลีเมอร์จะมีปฏิกิริยารุนแรงจนทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์เสียหายได้ (2) เอนไซม์จะถูกห่อหุ้มไว้ในแคปซูลขนาดเล็กที่มีคุณสมบัติยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้าออกได้แต่เอนไซม์ผ่านออกมาไม่ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จำเป็นต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาขณะเกิดสารโพลีเมอร์เพื่อป้องกันการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

3) การตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bonding)

วิธีนี้ทำการเชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพุงด้วยพันธะโควาเลนต์ซึ่งมีข้อดีว่าการดูดซับทางกายภาพ คือ สามารถป้องกันเอนไซม์ไม่ให้หลุดออกจากตัวพุงได้ แต่ปฏิกิริยาการเกิดพันธะจะมีผลต่อโครงสร้างและกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีนี้จึงจำเป็นต้องพิจารณาเลือกตัวพุงและสภาวะในการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์และวัตถุดิบที่ใช้เป็นสับสเตรท

4) การตรึงรูปด้วยการเชื่อมแบบไขว้ (cross linking method)

การตรึงรูปวิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพุง แต่จะอาศัยสารเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะเคมีแบบโควาเลนต์ ทำให้โมเลกุลเอนไซม์ตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปต่อเชื่อมเกาะกันเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ละลายน้ำได้น้อยลง การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้จะมีผลต่อโครงสร้างและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ เนื่องจากการเชื่อมระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับสารเชื่อมขวางจะเกิดปฏิกิริยารุนแรง

Table 12 Comparative evaluation of the merits and drawbacks of various enzyme immobilization method

| Method | Merits | Drawbacks |
|---------------------|---|---|
| Physical absorption | <ul style="list-style-type: none"> - Easy to perform - No reagents required - No pore diffusion limitations - Minimum activation steps involved - Comparatively cheap method of immobilization - Less disruptive to enzymes than chemical methods - Low time for the physical absorption | <ul style="list-style-type: none"> - Lower efficiency - Desorption of enzymes from carrier - Distortion of kinetics due to partitioning or diffusion phenomena and subsequently alter the pH stability or pH optimum of the enzyme |
| Covalent bonding | <ul style="list-style-type: none"> - Wider applicability - Comparatively simple method - No leakage or desorption - Variety of supports/carriers available - Strong linkage of enzyme to supports - Multifunctional group availability from supports/carriers | <ul style="list-style-type: none"> - Competitive inhibition issues - Chemical modification of enzymes - Loss of functional conformation of enzyme |
| Entrapment | <ul style="list-style-type: none"> - Mild conditions required - Easy to practice at small Scales - Fast method of immobilization - Can be used for sensing Applications - Inexpensive (low-cost matrices available) - Less chance of conformational changes | <ul style="list-style-type: none"> - Leakage of enzyme - Pore diffusion limitations - Chance of microbial contamination - Lower levels of industrial implementation and limited to small scale operations |
| Encapsulation | <ul style="list-style-type: none"> - Cost-effective method - Enzymes are stable longterm | <ul style="list-style-type: none"> - Lower concentrations of enzymes |

| | | |
|--|---|---|
| | - No extraction/purification steps required | - Generation of unwanted products |
| | - “One-pot” immobilization of multiple enzymes | - Modification of end products by other enzymes |
| | - Native conformation of enzymes is best maintained | - Pore size limitation |

| | | |
|---------------|--|---|
| Cross-linking | - No matrix or support involved | - Poly-functional reagents are required (glutaraldehyde) |
| | - Comparatively simple method | - Denaturation or structural modification by crosslinkers |
| | - Widely used in industrial applications | |
| | - Fast and cheap method | |
| | - Large amount of enzyme can be cross-linked at the time | |

Source: Scouten *et al.* (1995); Shen *et al.* (2011); Datta *et al.* (2013) and Bilal *et al.* (2017)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตกรดแลคติก ไอโซเมอร์ดีและไอโซเมอร์แอล ได้สูงจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกีเฟอร์กรน
2. เพื่อผลิตกรดแลคติก ไอโซเมอร์ดีและไอโซเมอร์แอลแอลจากน้ำคั้นและกากลำต้นปาล์มน้ำมัน ด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักโดยเชื้อที่คัดเลือกได้
3. เพื่อนำกากลำต้นปาล์มมาประยุกต์ใช้เป็นตัวพองสำหรับตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลส

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตกรดแลคติก ไอโซเมอร์แอลและดีจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มน้ำมันและจากกีเฟอร์กรน จากนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเจริญและผลิตกรดแลคติกได้สูงในน้ำคั้นลำต้นปาล์ม และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตกรดแลคติก โดยใช้ น้ำคั้นลำต้นปาล์มและเติมกากลำต้นปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร่วม ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ผลของปริมาณกากลำต้นปาล์มและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม และทำการศึกษการผลิตกรดแลคติกโดยใช้การหมักแบบกะขี้ จากนั้นจึงขยายขนาดการผลิตกรดแลคติกในถังปฏิกรณ์และเก็บเกี่ยวกรดแลคติกโดยวิธีการดูดซับด้วยเรซินแลกเปลี่ยนประจุ

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุ

1. ลำต้นปาล์มน้ำมัน

ลำต้นปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการทดลองได้จากการสับตัดไม้ปาล์มที่มีอายุ 20-25 ปี ในจังหวัดกระบี่ ใช้ส่วนที่ค่อนข้างตรงของต้นปาล์มน้ำมันประมาณ 3 เมตร เอาส่วนเปลือกออกหั่นไม้เป็นแผ่นๆ แล้วคั้นเอาน้ำออกด้วยเครื่องรีดแผ่นยางแล้วกรองน้ำคั้นที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง 5-6 ชั้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วนของน้ำคั้นลำต้นปาล์ม นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Chooklin *et al.*, 2012) ส่วนกากลำต้นปาล์ม น้ำมันที่เหลือจากการคั้นนำไปผึ่งแดดให้แห้งสนิท จากนั้นนำมาบดเพื่อลดขนาดของเส้นใยแล้วร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 10, 25 และ 30 เมช (อิสรา โกมลเกียรติ, 2556) จะได้ส่วนของกากเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่เป็นผนังเซลล์ (Parenchyma, PA) และส่วนของเส้นใย (Vascular bundle, VB)

2. เชื้อจุลินทรีย์

2.1 เชื้อจุลินทรีย์เป็นเชื้อที่แยกได้จากหัวเชื้อนมเปรี้ยวคีเฟอร์เกรน (Kefir grains) จากห้องปฏิบัติการวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.2 เชื้อจุลินทรีย์เป็นเชื้อที่แยกได้จากน้ำคั้นลำต้นปาล์มน้ำมัน

2.3 แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus casei* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา จันทะชุม แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus kefirifaciens* JCM 6985 จาก Japan collection of Microorganism ประเทศญี่ปุ่น เก็บรักษาในกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 30 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. เอนไซม์

เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าจากเชื้อ *Aspergillus niger* บริษัท Wuhan Vanz Pharm Inc. สาธารณรัฐประชาชนจีน

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นใช้อาหารสำเร็จรูป Man-Rogosa Sharpe (MRS) ยี่ห้อ Hi-media ประกอบไปด้วย โดโทแทสเซียมฟอสเฟต 10.0 กรัมต่อลิตร, เนื้อ

สกัด 2.0 กรัมต่อลิตร, ยีสต์สกัด 5.0 กรัมต่อลิตร, น้ำตาลเดรกซ์โทส 20.0 กรัมต่อลิตร, ทวีน 80 1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร, แอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัมต่อลิตร, โซเดียมอะซิเตรท 5.0 กรัมต่อลิตร, แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร, แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร, เปปโตน 10.0, กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 15.0 กรัมต่อลิตร

อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และสำหรับการวิเคราะห์

| ชื่อเครื่องมือ | รุ่น | บริษัท |
|------------------------------------|--------------|------------------------------|
| ตู้เย็นสำหรับเก็บเชื้อ | SF-C697(GYN) | Sanyo, Thailand |
| หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ | SS-325 | Tomy Seiko Co Ltd, Japan |
| ตู้ปลอดเชื้อ | 5270044 | Hotpack, China |
| เครื่องกวนแม่เหล็ก | RO 5 | Ika Labotechnic, Germany |
| เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ | 5203 | Hitachi, Japan |
| ตู้อบแห้ง | UM 200-800 | Memmert, Germany |
| เครื่องวัดพีเอช | 420 A | Orion Research, Inc., Japan |
| เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ | U-200 | Teachical Cooperation, Japan |
| เครื่องชั่งละเอียดทศนิยมสี่ตำแหน่ง | BP 210-s | Sartorius, Germany |
| เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง | HF-1200 | A&D Company, Ltd, Japan |

วิธีการวิเคราะห์

1. การวัดการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

การวัดการเจริญของเชื้อทำ 2 วิธี คือ วัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (OD_{660}) และวัดจากน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยดัดแปลงจากวิธีของ Papanikalaou และคณะ (2002) ปีเปิดตัวอย่าง 4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ คือ ประมาณ 48-72 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่ง บันทึกผลและคำนวณตามสูตร

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = (A-B) \times 1000/2$$

เมื่อ

$$A = \text{น้ำหนักหลอด} + \text{น้ำหนักของเซลล์หลังอบแห้ง}$$

$$B = \text{น้ำหนักของหลอดที่อบแห้ง}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดโดยวิธีการไทเทรต

นำตัวอย่างน้ำหนักภายหลังจากการเลี้ยงใส่ในขวดรูปชมพู่ขวดละ 10 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาไลน์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงไป 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดยุติเมื่อสารละลายเป็นสีชมพูอ่อน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกับกรดแลคติก (AOAC, 2000)

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกับกรดแลคติก (\%)} = \frac{\text{ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์} \times \text{นอร์มอล} \times 90.09 \times 100}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 1000}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดยเทคนิค HPLC โดยดัดแปลงตามวิธีของ Olano-Maetin และคณะ (2000)

สารเคมี

ก. สารมาตรฐานกรดแลคติก

ข. กรดซัลฟิวริก

เครื่องมือ

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

Mobile phase: 0.005 M H₂SO₄

Flow rate: 0.6 ml/min

Detector: UV 215 nm

Injet: 20 μL

วิธีการ

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใส่ออกจากตะกอน นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่คอลัมน์ เปรียบเทียบปริมาณสารที่ได้กับสารมาตรฐานของกรดแลคติกที่มีความเข้มข้น 1, 2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร

4. การวิเคราะห์ปริมาณและไอโซเมอร์ของกรดแลคติกโดยใช้ชุดวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณและไอโซเมอร์ของกรดแลคติกโดยใช้ชุดวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ (D/L lactic acid assay kit) (Cingadi *et al.*, 2015) นำน้ำกลั่นใส่ในคิวเวทปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร สำหรับแบลงค์ใส่ 1.60 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักที่ถูกเจือจางในระดับที่เหมาะสมใส่ในคิวเวทปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.50 มิลลิลิตร สารละลาย NAD^+ 0.01 มิลลิลิตร และเอนไซม์ดีกลูตามาเทไพรูเวตทรานส์มีเนส (D-GPT) 0.02 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 3 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (A1) จากนั้นเติมเอนไซม์ดีเลคเตทดีไฮโดรจีเนส (D-LDH) ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดิม (A2) จากนั้นเติมเอนไซม์แอลเลคเตทดีไฮโดรจีเนส (L-LDH) ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดิม (A3) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณความเข้มข้นของกรดแลคติก

$$c = \frac{V \times MW \times \Delta A_{\text{D-lactic acid}} / \Delta A_{\text{L-lactic acid}}}{\epsilon \times d \times v}$$

โดยที่

c = ความเข้มข้นของกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)

v = ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)

MW = น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก (กรัมต่อโมล)

ϵ = ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสงของ NADH ที่ 340 นาโนเมตร
 $= 6300 (1 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$

d = 1 เซนติเมตร

v = ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

$\Delta A_{\text{D-lactic acid}}$ = ค่าการดูดกลืนแสง ($A_2 - A_1$)

$\Delta A_{\text{L-lactic acid}}$ = ค่าการดูดกลืนแสง ($A_3 - A_2$)

5. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Total sugar Phenol-sulfuric method (Wang *et al.*, 2009) เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปิเปิดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 2-3 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงอย่างรวดเร็ว เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณหา

ปริมาณน้ำตาลโดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้น้ำตาลกลูโคส ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นแบบลงค์ วิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างการคำนวณ

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{A \times \text{อัตราเจือจาง}}{B}$$

โดยที่

A = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

B = ความชันของกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

6. การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลในน้ำคั้นลำต้นปาล์ม

วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส ฟรุกโทส อะราบีโนส และไซโลส โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) (Egues *et al.*, 2010)

วิธีการ

- 1) เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ซูโครส ฟรุกโทส อะราบีโนส และไซโลส 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารละลายมาตรฐาน 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
- 2) เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร

- 3) นำสารละลายมาตรฐานมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column: Aminex-87P × 7.8

Mobile phase: 0.005 โมลาร์ ของกรดซัลฟิวริก

Flow rate: 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

Detector: Refractive Index

Column temperature: 80 องศาเซลเซียส

Injection volume: 20 ไมโครลิตร

- 4) แปลผลและวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง

4.1) ค่ารีเทนชันไทม์ (retention time) ของสารมาตรฐานกลูโคส ซูโครส ฟรุกโทส อะราบีโนส และไซโลส ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.2) ค่าพื้นที่พีค (area) ของสารมาตรฐานกลูโคส ซูโครส ฟรุกโทส อะราบีโนส และไซโลส ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.3) สร้างกราฟมาตรฐานและหาปริมาณของสารมาตรฐานกลูโคส ซูโครส ฟรุกโทส อะราบิโนส และไซโลสในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางในระดับการเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปทำปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในน้ำเย็นทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

8. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยวิธี Filter Paper Assay (Mandels และคณะ, 1976 อ้างโดย Ghose, 1987) นำกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่มีขนาด 1×6 เซนติเมตร ปริมาตร 50 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายซเตรทบัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ที่มีพีเอช 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แยกตะกอนออกโดยการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

เอนไซม์ 1 หน่วยกระดาษกรอง หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้น (กระดาษกรอง Whatman NO. 1) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลใน 1 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

9. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งในไม้ปาล์ม

วิเคราะห์ปริมาณแป้งในตัวอย่างไม้ปาล์ม โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากสารเชิงซ้อนสีฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างอะไมโลสและไอโอดีน (Optical method on starch-iodine reaction) (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

- | | |
|---------|---|
| สารเคมี | 1. กรดอะซิติกเข้มข้น 2 นอร์มอล |
| | 2. สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์เข้มข้นร้อยละ 10 |
| | 3. สารละลายโพแทสเซียมไตรไอโอเดตเข้มข้น 1/600 โมลาร์ |

วิธีการวิเคราะห์

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

- 1) ชั่งแป้งปริมาณ 50 มิลลิกรัม นำมาละลายน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดแก้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- 2) นำสารละลายนี้ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อละลายแป้งออกจากไม้ปาล์ม จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
- 3) ปิเปตสารละลายมาจำนวน 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรแต่ละหลอดให้ได้ 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
- 4) เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร โปแทสเซียมไอโอไดด์เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และโปแทสเซียมไอโอเดตเข้มข้น 1/600 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน
- 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลาย blank ซึ่งเตรียมโดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายตัวอย่าง
- 6) นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสง (570 นาโนเมตร) และความเข้มข้นของแป้ง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

- 1) เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐาน
- 2) ปิเปตตัวอย่างมาปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 มิลลิลิตร
- 3) ทำการทดลองเช่นเดียวกับกราฟมาตรฐาน

การคำนวณ

1. คำนวณความเข้มข้นของแป้ง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเทียบกับสมการกราฟมาตรฐาน
2. คำนวณปริมาณแป้ง (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) จากสามการ

$$\text{ปริมาณแป้ง (ร้อยละ โดยน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของแป้ง} \times 100 \times 100}{v \times 1000 \times (50 - 50M)/100}$$

โดยที่ v คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

M คือ ปริมาณความชื้นของตัวอย่าง (ร้อยละ)

10. การคำนวณทางจลนพลศาสตร์

นำข้อมูลจากการทดลองมาคำนวณ อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (productivity) ผลผลิตผลิตภัณฑ์ (product yield) และ ปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป (substrate consumption) (สาโรจน์ ศิริ ศันสนียกุลและคณะ, 2544) ดังนี้

$$\text{อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)} = \frac{dP}{dt} \dots\dots\dots (1.0)$$

โดยที่ dP คือ ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)

dt คือ เวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก (ชั่วโมง)

$$\text{ผลผลิตเซลล์ (Growth yield) (กรัมต่อกรัมสับสเตรท)} = (X_t - X_0)/(S_t - S_0) \dots\dots\dots (2.0)$$

โดยที่ X_0 คือ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

X_t คือ ปริมาณเซลล์ที่ชั่วโมงใดๆของการหมัก (กรัมต่อลิตร)

S_0 คือ ปริมาณสับสเตรทเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

S_t คือ ปริมาณสับสเตรทที่ชั่วโมงใดๆของการหมัก (กรัมต่อลิตร)

$$\text{ผลผลิตผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อกรัมสับสเตรท)} = (P_t - P_0)/(S_t - S_0) \dots\dots\dots (3.0)$$

โดยที่ P_0 คือ ปริมาณผลิตภัณฑ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

P_t คือ ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ชั่วโมงใดๆของการหมัก (กรัมต่อลิตร)

S_0 คือ ปริมาณสับสเตรทเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

S_t คือ ปริมาณสับสเตรทที่ชั่วโมงใดๆของการหมัก (กรัมต่อลิตร)

11. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธี One Way Analysis of Variance และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Science (SPSS) version 20.0

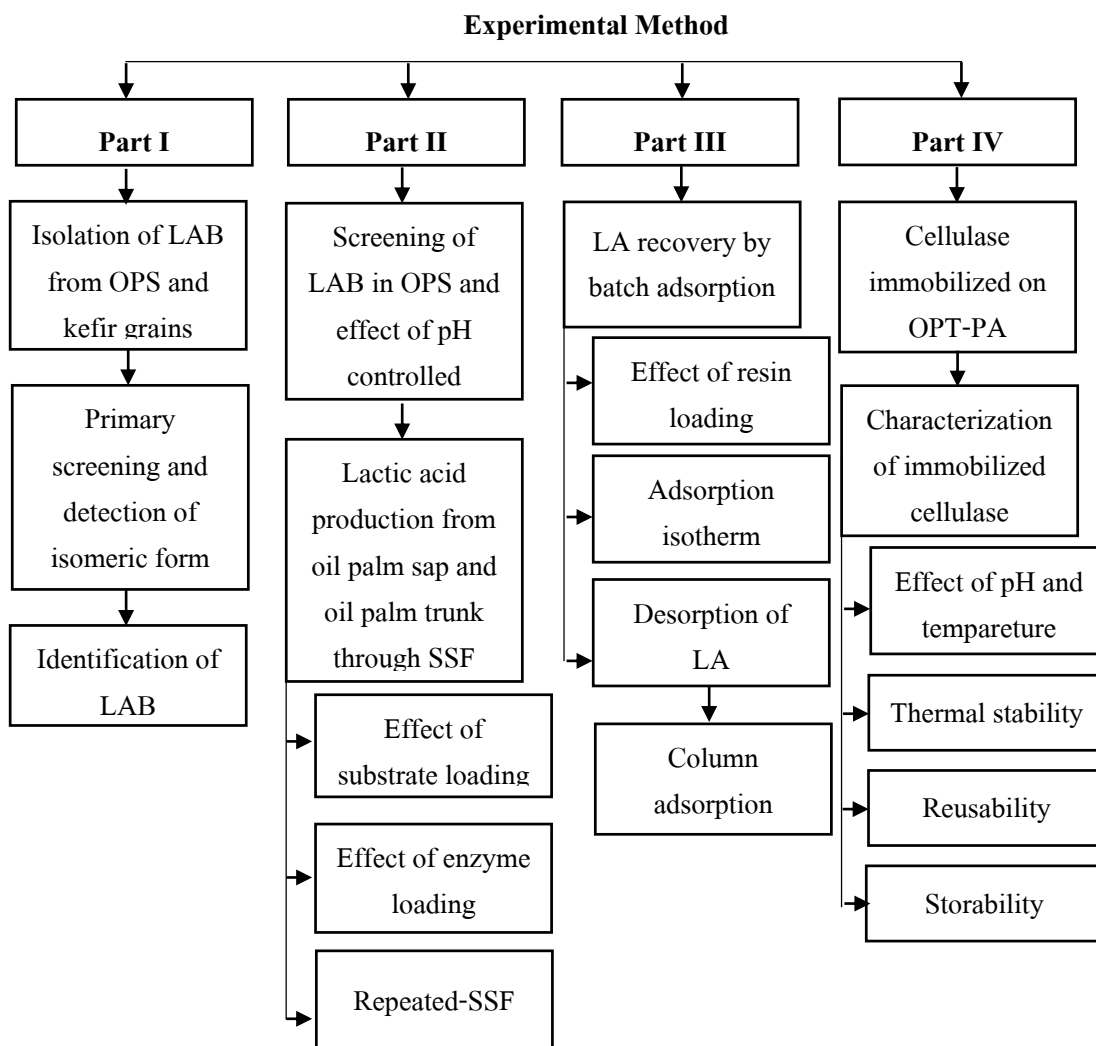


Figure 11 Schematic of the experimental procedure.

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 น้ำคั้นลำต้นปาล์มน้ำมัน

ลำต้นปาล์มน้ำมันอายุ 20-25 ปี ที่ต้องการโค่นทิ้งโดยใช้ส่วนที่ค่อนข้างไปทางยอดของต้นปาล์มน้ำมันประมาณ 3 เมตร เอาส่วนเปลือกออกหั่นไม้เป็นแผ่นๆ แล้วคั้นเอาน้ำออกด้วยเครื่องรีดแผ่นยางแล้วกรองน้ำคั้นที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง 5-6 ชั้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วนของน้ำคั้นลำต้นปาล์ม นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส น้ำคั้นลำต้นปาล์มที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลอะราบิโนส ทำการวัดพีเอช และส่งวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในน้ำคั้น (อิสรา โคมลเกียรติ, 2556) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 กากลำต้นปาล์มน้ำมัน

กากลำต้นปาล์มน้ำมันหลังจากคั้นน้ำออกไปผึ่งแดดให้แห้งสนิท จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดแห้งอเนกประสงค์ (NT-500D, Nanotech Quality Product, Thailand) ใช้ความเร็วในการบด 25,000 รอบต่อนาที เพื่อลดขนาดของเส้นใยแล้วร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 10, 20 และ 30 เมช (อิสรา โคมลเกียรติ, 2556) จะได้ส่วนของกากเป็นสองส่วน คือ ส่วนของเส้นใย (Vascular bundle, VB) ซึ่งมีขนาด 0.75-2.0 มิลลิเมตร และส่วนที่เป็นผนังเซลล์ (Parenchyma, PA) ซึ่งจะมีขนาดน้อยกว่า 0.75 มิลลิเมตร ทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง และลิกนิน ของตัวอย่างไม้ทั้ง 2 ส่วน

2. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและหัวเชื่อมมเปรี้ยวคิเฟอร์เกรน

2.1 การแยกแบคทีเรียแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและหัวเชื่อมมเปรี้ยวคิเฟอร์เกรน

นำตัวอย่างน้ำคั้นลำต้นปาล์มจากข้อ 1.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก โดยใช้ตัวอย่างน้ำคั้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างหัวเชื่อมคิเฟอร์เกรนจากห้องปฏิบัติการวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ ปริมาตร 10 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาเจือจางให้มีระดับความเจือจางที่เหมาะสมแบบ ten-fold serial dilution จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางมาทำการเกลี่ยเชื้อ บนอาหารแข็ง MRS ที่มี bromocresol purple ร้อยละ 0.02 เป็นอินดิเคเตอร์การผลิตรวด บ่มในในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง นำจานที่เพาะเชื้อมาแยกเชื้อ โดยเลือกโคโลนีที่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง

นำมา restreak 2-3 ครั้ง บนอาหารแข็ง MRS เพื่อให้แน่ใจว่าได้เชื้อบริสุทธิ์ บ่มที่อุณหภูมิเดิมจนเกิดโคโลนีเดี่ยว เลือกลโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะสมบูรณ์ที่สุดมาทดสอบการเป็นแบคทีเรียแลคติก โดยย้อมสีแกรมตามวิธีของ Hucker staining method (Murray *et al.*, 1994) ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะรูปร่าง ลักษณะการจัดเรียงตัว และการติดสีแกรมของเชื้อ โดยแบคทีเรียแลคติกต้องติดสีแกรมบวก และทดสอบการสร้างเอนไซม์อะซิเตส (Axelsson, 1998) ด้วยสารละลายไฮโดรเจนเพอร์รอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 แบคทีเรียแลคติกต้องไม่สร้างเอนไซม์อะซิเตสโดยจะให้ผลอะซิเตสเป็นลบ (ไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นระหว่างการทำปฏิกิริยา)

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกขั้นต้นโดยวิธีการไทเทรตและการตรวจสอบไอโซเมอร์ของกรดแลคติก

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1.1 และแบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยกำหนดค่าความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.2 บ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร วัดค่าพีเอช และทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดโดยวิธีการไทเทรต แล้วคัดเลือกไอโซเลทที่ให้ปริมาณกรดสูงสุดมาตรวจสอบไอโซเมอร์ของกรดแลคติกด้วยชุดตรวจวิเคราะห์ทางเอนไซม์ D/L lactic acid assay kit จากบริษัท Megazyme ประเทศไอร์แลนด์ (Cingadi *et al.*, 2015) แล้วยืนยันผลด้วย HPLC นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้เก็บรักษาในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 30 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาเทียบเคียงสายพันธุ์โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA เริ่มจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด genomic DNA (TIANGel Maxi DNA Purification Kit) แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ยูนิเวอร์เชิลไพร์เมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCTTGGCTCAG-3') และ 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') ซึ่งเป็นไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย (Leite *et al.*, 2015) สำหรับสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR คือ การทำ first denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำ PCR 30 รอบ (อุณหภูมิที่ใช้ต่อรอบ คือ การทำ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, การทำ Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที) และ Final extension ด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Pan *et al.*, 2011) นำ PCR product ที่ได้ส่งวิเคราะห์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen ประเทศ

เกาหลีแล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเทียบกับข้อมูลใน Genbank โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก National Center for Biotechnology Information server (NCBI)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

3. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่เจริญและผลิตกรดแลคติกได้ในน้ำคั้นลำต้นปาล์มภายใต้สภาวะที่ควบคุมและไม่ควบคุมพีเอช

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ที่เก็บในกลีเซอรอลมาลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ให้ได้เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นเป็น 10^9 cfu/ml ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกปริมาณร้อยละ 10 ลงในน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 30 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บรรจุในขวดซีรัมขนาด 120 มิลลิลิตร เลี้ยงภายใต้สภาวะควบคุมและไม่ควบคุมพีเอช ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง กวนที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง โดยสภาวะควบคุมพีเอชจะทำการปรับพีเอชตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 5.0-5.5 ทุก 12 ชั่วโมง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดค่าพีเอช วัดค่าความขุ่นที่ค่าดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเซลล์มาวัดการเจริญโดยวัดน้ำหนักแห้ง นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปวัดปริมาณกรดทั้งหมดโดยวิธีการไทเทรต ปริมาณกรดแลคติกโดย HPLC และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอล 1 สายพันธุ์ และไอโซเมอร์ดี 1 สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณกรดแลคติกและผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

4. การผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นและกากลำต้นปาล์มโดยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก

4.1 ศึกษาผลของปริมาณกากลำต้นปาล์มในน้ำคั้นลำต้นปาล์ม

ชั่งกากลำต้นปาล์มน้ำมันส่วน OPT-VB ที่ได้จากการเตรียมในข้อ 1.2 ปริมาตรร้อยละ 5, 10, และ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใส่ขวดซีรัมขนาด 120 มิลลิลิตร เติมน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.5 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 15 ฟิเตอร์เปปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์ม (Lui *et al.*, 2015) แล้วเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากข้อ 3 ที่มีเชื้อเริ่มต้น 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปริมาตรร้อยละ 10 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนผสมที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในระหว่างการเพาะเลี้ยง

ควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 5-5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมดโดยวิธีการไทเทรต ปริมาณกรดแลคติกโดย HPLC และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด คำนวณอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ และผลผลิตผลิตภัณฑ์ จากนั้นเลือกปริมาณกากลำต้นปาล์มที่ทำให้ได้ปริมาณกรดแลคติกสูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.2 ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์

ซังกากลำต้นปาล์มน้ำมันในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 ใส่ขวดเซรัมขนาด 120 มิลลิลิตร เติมน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.5 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 5, 10, 15 และ 20 ฟิวเจอร์เปปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์ม ทำการทดลองและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.1 จากนั้นเลือกปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณกรดแลคติกสูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.3 การผลิตกรดแลคติกแบบกะขี้

ทำสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 และ 4.2 มาเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 โดยวิธีการหมักแบบกะขี้ ทำการทดลองในขวดเซรัมขนาด 120 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับข้อ 4.1 เพื่อเพิ่มอัตราการใช้กากลำต้นปาล์ม การผลิตกรดแลคติกและลดการถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ เมื่อหมักครบ 96 ชั่วโมงทำการถ่ายน้ำหมักออกปริมาณร้อยละ 90 และเติมน้ำคั้นลำต้นปาล์มใหม่ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 40 กรัมต่อลิตร ปริมาตรร้อยละ 90 และเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรมที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 ทำการหมักต่ออีก 96 ชั่วโมง ควบคุมพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 10 นอร์มอล ให้อยู่ในช่วง 5.0-5.5 ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ทำการหมักซ้ำเช่นนี้อีก 5 ครั้ง (modified from Okano *et al.*, 2017) เปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก อัตราการผลิตและผลผลิตกรดแลคติกของแต่ละกะ

5. การผลิตกรดแลคติกในถังปฏิกรณ์ขนาด 1 ลิตร ด้วยวิธีการหมักแบบกะขี้

ทำการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 ในน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.5 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 1.25 ลิตร แล้วเติมกากลำต้นปาล์มน้ำมันที่มีปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรมที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนผสมที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ควบคุมพีเอชด้วย

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 10 นอร์มอล ให้อยู่ในช่วง 5.0-5.5 ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ทำการหมักแบบกะขำและวิเคราะห์ตามข้อ 4.3

6. การเก็บเกี่ยวกรดแลกติกโดยการดูดซับด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

6.1 การศึกษาผลของปริมาณเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

เรซินแลกเปลี่ยนไอออนประจุลบเบสแก่ Amberlite IRA-402 ก่อนทำการทดลองนำไปปรับสภาพด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ และน้ำ ตามลำดับ (Moldes *et al.*, 2001) บรรจุเรซิน Amberlite IRA-402 ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ 4, 6.4, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก ในหลอดทดลองขนาด 7.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดแลกติกมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอช 5 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที เก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ถูกดูดซับและความเข้มข้นของกรดแลกติกที่เหลือในสารละลาย (ดัดแปลงจากวิธีการของ กนกอร ประยูรพันธ์, 2549)

6.2 การศึกษาไอโซเทอมการดูดซับของเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

เตรียมสารละลายกรดแลกติกมาตรฐานที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเป็น 5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 10 โมลาร์ บรรจุลงในหลอดทดลองขนาด 7.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเรซินในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 6.1 ลงในหลอดทดลอง นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที (Chooklin *et al.*, 2013) เก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ถูกดูดซับและความเข้มข้นของกรดแลกติกที่เหลือในสารละลาย

6.3 การเก็บเกี่ยวกรดแลกติกจากน้ำหมักโดยคอลัมน์เรซินแลกเปลี่ยนไอออน

นำน้ำหมักที่ได้จากการทดลองไปแยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปกำจัดสีด้วยถ่านกัมมันต์ ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำหมักกรดแลกติกที่มีพีเอช 5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมถ่านกัมมันต์ปริมาณร้อยละ 4 ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 (Wei *et al.*, 2010)

นำเรซินที่ผ่านการปรับสภาพแล้วปริมาณ 20 กรัม โหลดลงในคอลัมน์ขนาด 1.0 x 46 เซนติเมตร จากนั้นนำน้ำหมักกรดแลกติกที่ผ่านการกำจัดสีแล้วที่มีความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร พีเอช 5 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โหลดลงคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาทีจนเรซินอิ่มตัวแล้วชะน้ำกลั่น 1 รอบ ตามด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล

2 ลิตรต่อนาที เพื่อชะกรดแลคติกออกจากเรซินจนกระทั่งไม่มีกรดแลคติกออกมาจากทางออกของคอลัมน์ (ฐานภูวรินทร์ ร้าพาย, 2558) Figure 12 แสดงกระบวนการแยกกรดแลคติกโดยวิธีการดูดซับด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

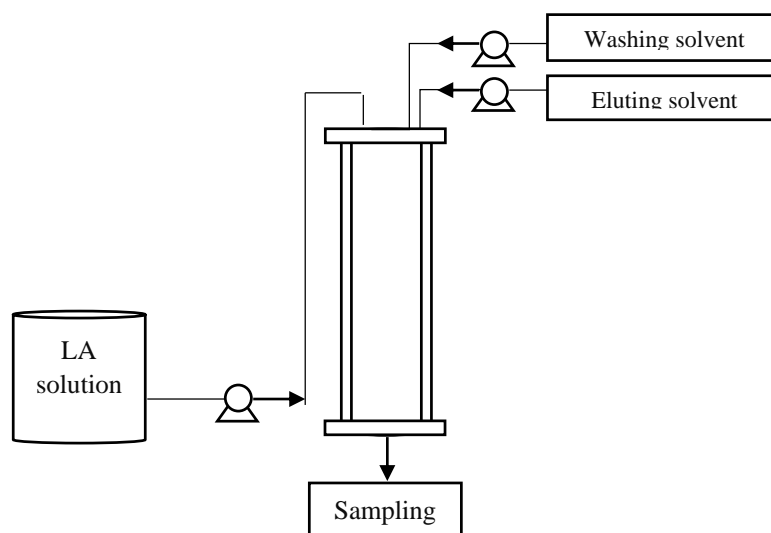


Figure 12 Process diagram of lactic acid recovery units.

7. การประยุกต์ใช้ผงลำต้นปาล์มป็นตัวพุงสำหรับการตรึงเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

7.1 การตรึงเอนไซม์เซลลูเลสบนผงลำต้นปาล์มโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

นำผงลำต้นปาล์มส่วนพาแรงไคมา (OPT-PA) ตรึงเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ คัดแปลงตามวิธีการของ Buntic และคณะ (2018) โดยเริ่มจากการเตรียมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสให้มีกิจกรรม 500 ยูนิต ในสารละลายซีเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวพุงผงลำต้นปาล์ม 0.5 กรัม ลงในสารละลายเอนไซม์ ผสมสารละลายเอนไซม์กับตัวพุงโดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองตัวพุงและเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วล้างด้วยสารละลายซีเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 2 รอบ แล้วนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูป และคำนวณค่า Immobilized yield (%) และ Immobilized efficiency (%) ตามสมการ

$$\text{Immobilized yield (\%)} = \text{Immobilized activity} / \text{Initial activity} \times 100$$

$$\text{Immobilized efficiency (\%)} = \text{Observed activity} / \text{Immobilized activity} \times 100$$

7.2 การศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูป

นำเอนไซม์ตรังรูปปริมาณ 10 มิลลิกรัม มาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด ที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกัน ได้แก่ สารละลายซีเตดบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 3, 4, 5 และ 5.5 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 6, 7 และ 8 (Ma *et al.*, 2015) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยมีชุดควบคุมคือ เอนไซม์เซลลูเลสอิสระที่ไม่ผ่านการตรึง จากนั้นวัดกิจกรรมของเอนไซม์คงเหลือโดยวัดจากปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS ค่าพีเอชที่ให้ผลของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดจะคิดเป็นร้อยละ 100 โดยคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) จากสมการ

$$\text{กิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ)} = (A_n - A_p) / A_n \times 100$$

โดยที่ A_p คือ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ตรังรูป (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

A_n คือ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ตรังรูปสูงสุด (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

7.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูป

ซึ่งเอนไซม์ตรังรูปปริมาณ 10 มิลลิกรัม เติมสารละลายซีเตดบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยมีชุดควบคุมคือเอนไซม์เซลลูเลสอิสระที่ไม่ผ่านการตรึง จากนั้นวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยวัดจากปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS ซึ่งอุณหภูมิที่ให้ผลกิจกรรมจำเพาะสูงสุดจะคิดเป็นร้อยละ 100 แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์

7.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูป

ซึ่งเอนไซม์ตรังรูปปริมาณ 10 มิลลิกรัม เติมสารละลายซีเตดบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที (Muthuvelu *et al.*, 2018) จากนั้นนำเอนไซม์ที่บ่มที่เวลาต่างๆ มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่เวลาบ่ม 0 นาที จะคิดเป็นร้อยละ 100 แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์

7.5 การศึกษาการนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรีงรูป

ซึ่งเอนไซม์ตรีงรูปปริมาณ 10 มิลลิกรัม เติมสารละลายซัคเคตบัพเฟออร์ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนใสออก แล้วเติมสารละลายซัคเคตบัพเฟออร์ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดเดิม บ่มที่อุณหภูมิเดิม ทำปฏิกิริยาเช่นนี้ประมาณ 10 รอบ แล้วนำส่วนใสที่ได้จากการทำปฏิกิริยาแต่ละรอบไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น (Qi *et al.*, 2018) แล้วคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์รอบที่ 1 จะคิดเป็นร้อยละ 100 แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์

7.6 การศึกษาความคงตัวในการเก็บรักษาของเอนไซม์เซลลูเลสตรีงรูป

ศึกษาความคงตัวในการเก็บรักษาของเอนไซม์ตรีงรูปโดยการเก็บรักษาเอนไซม์ตรีงรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วัน เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมคงเหลือของเอนไซม์เป็นเวลา 10 สัปดาห์ ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์วันที่ 0 จะคิดเป็นร้อยละ 100 แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์ม

น้ำคั้นลำต้นปาล์มที่ได้มีลักษณะสีเหลืองขุ่นมีตะกอนแขวนลอย แสดงดัง Figure 13a เมื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลพบว่ามีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลไซโลส เท่ากับ 26.9 ± 0.06 , 4.39 ± 0.25 , 9.18 ± 0.25 และ 3.04 ± 0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 61.8 ± 0.14 , 10.1 ± 0.58 , 21.1 ± 0.59 และ 6.89 ± 0.13 ตามลำดับ รวมความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 43.51 ± 0.92 กรัมต่อลิตร (Table 13) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Kosugi และคณะ (2010) ที่พบว่าน้ำคั้นลำต้นปาล์มน้ำมันประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลฟรุกโตสเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลไซโลส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแรมโนส เป็นต้น และยังพบกรดอะมิโนหลายชนิด เช่น เซอรีน อะลานีน กรดกลูตามิก และกรดแอสพาทิก ซึ่งคล้ายกับกรดอะมิโนที่พบในน้ำอ้อย อีกทั้งยังพบกรดอินทรีย์ แร่ธาตุ และวิตามิน ในขณะที่จากการศึกษาของ Lokesh และคณะ (2012) พบว่าองค์ประกอบในน้ำคั้นลำต้นปาล์มโดยส่วนใหญ่คือน้ำตาลซูโครส รองลงมาคือน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลอื่นๆ จะเห็นได้ว่าน้ำคั้นลำต้นปาล์มน้ำมันอาจมีองค์ประกอบและปริมาณของน้ำตาลชนิดต่างๆ แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน พื้นที่เพาะปลูก และอายุของปาล์มน้ำมันที่แตกต่างกัน (อิสรา โคมลเกียรติ, 2556) และจากการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดพบว่ามีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 0.63 กรัมต่อลิตร ดังแสดงใน Table 13 ซึ่งคุณสมบัติของน้ำคั้นลำต้นปาล์มดังกล่าว ถือว่ามีความเหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ในการผลิตกรดแลคติกได้ โดยงานวิจัยที่ศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในน้ำคั้นลำต้นปาล์ม ดังแสดงใน Table 14

สำหรับค่าพีเอชของน้ำคั้นลำต้นปาล์มพบว่ามีค่าเท่ากับ 5.43 ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Kosugi และคณะ (2010) ที่พบว่าค่าพีเอชในน้ำคั้นลำต้นปาล์มมีค่าประมาณ 5.0 จากการศึกษานของอิสรา โคมลเกียรติ (2016) พบว่าต้นปาล์มน้ำมันสดมีค่าพีเอชประมาณ 7 ส่วนน้ำคั้นลำต้นปาล์มน้ำมันมีค่าพีเอช 4.50 ซึ่งการลดลงของค่าพีเอชในน้ำคั้นลำต้นปาล์มน้ำมันเกิดจากการหมักของจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรวบรวม การขนส่ง และการจัดเก็บ



Figure 13 Preparation of oil palm sap (a) and oil palm trunk (b).

Table 13 Analysis of sugar and organic acid contained in sap from felled oil palm trunk

| Composition | Concentration (g/L) | Sugar content (%) |
|----------------|---------------------|-------------------|
| Glucose | 26.9±0.06 | 61.8±0.14 |
| Fructose | 4.39±0.25 | 10.1±0.58 |
| Sucrose | 9.18±0.25 | 21.1±0.59 |
| Xylose | 3.04±0.06 | 6.89±0.13 |
| Acetic acid | 4.18±0.81 | |
| Lactic acid | 1.48±0.43 | |
| Total nitrogen | 0.63±0.04 | |

Table 14 Sugar composition in oil palm sap by various study

| Composition | Kosugi et al. (2010) | Lokesh et al. (2012) | Chooklin et al. (2012) | Nutongkaew et al. (2019) | This study |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------|
| Glucose (g/L) | 50.2 | 16.01 | 16.58 | 12.74 | 26.9 |
| Sucrose (g/L) | 3.8 | 33.28 | nd | nd | 9.18 |
| Fructose (g/L) | 3.1 | 1.55 | 2.59 | 5.06 | 4.39 |
| Xylose (g/L) | 0.97 | 0.97 | nd | nd | 3.04 |
| Arabinose (g/L) | nd | 0.51 | nd | nd | nd |

*nd means not detected

กากลำต้นปาล์มน้ำมันที่เหลือจากการคั้นน้ำประกอบไปด้วยกลุ่มเซลล์ท่อลำเลียง (vascular bundles) และกลุ่มเซลล์พarenchyma ที่อยู่รอบๆกลุ่มเซลล์ท่อลำเลียง (Hashim *et al.*, 2011) เมื่อนำไปอบแห้งและลดขนาดโดยการบดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 10, 25 และ 30 เมช จากลักษณะทางกายภาพของไม้ต้นปาล์มทำให้สามารถแยกกากลำต้นปาล์มได้เป็นสองส่วนคือ ส่วนที่เป็นเส้นใย (vascular bundle, OPT-VB) ซึ่งจะมีขนาด 0.75-2.0 มิลลิเมตร และส่วนที่เป็นผง (parenchyma, OPT-PA) จะมีขนาดที่เล็กกว่า 0.75 มิลลิเมตร คิดเป็นร้อยละ 62 และ 38 ตามลำดับ ดังแสดง Figure 14 การลดขนาดกากลำต้นปาล์มมีความจำเป็นต่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อ จากงานวิจัยของ Chen และคณะ (2012) ที่ศึกษาผลของขนาดของฟางข้าวฟางในช่วง 9.5-1.8 มิลลิเมตร, 4.0-6.0 มิลลิเมตร และ 1.0-2.0 มิลลิเมตร ในการปรับสภาพไม้ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟต่อปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าย่างฟางข้าวมีขนาดเล็กจะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น โดยฟางข้าวที่มีขนาด 1.0-2.0 มิลลิเมตร สามารถให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากลำต้นปาล์มน้ำมันส่วนของ OPT-VB พบว่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลสร้อยละ 56.6 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 23.44 ลิกนินร้อยละ 13.7 และปริมาณแป้งร้อยละ 4.76 ในขณะที่ส่วน OPT-PA มีองค์ประกอบของเซลลูโลสร้อยละ 37.06 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 29.83 ลิกนินร้อยละ 18.36 และปริมาณแป้งร้อยละ 25.09 (Table 15) จะเห็นได้ว่า ส่วนของ OPT-VB จะมีองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่สูงกว่าส่วนของ OPT-PA ในขณะที่ส่วน OPT-PA จะมีปริมาณแป้งมากกว่า OPT-VB เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Prawitwong และคณะ (2012) ที่ศึกษาการผลิตเอทานอลจากลำต้นปาล์มน้ำมัน โดยแบ่งส่วนของลำต้นปาล์ม

ออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของ VB และ PA โดยส่วนของ VB จะมีปริมาณกลูแคนและไซแลนสูงกว่า PA แต่มีปริมาณแป้งที่น้อยกว่า

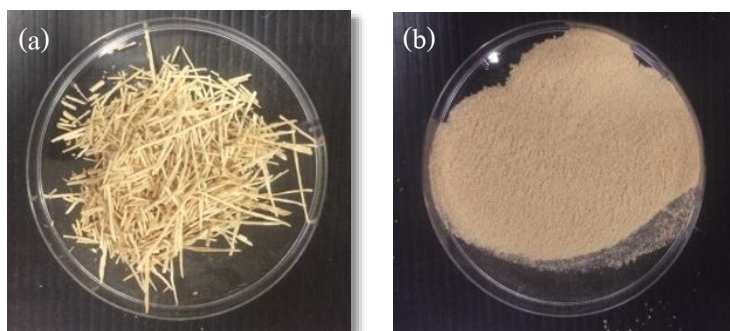


Figure 14 Characteristic of separated (a) vascular bundle (OPT-VB) and (b) parenchyma of oil palm trunk (OPT-PA).

Table 15 Composition analysis of vascular bundle and parenchyma

| Plant part | Cellulose (%) | Hemicellulose (%) | Lignin (%) | Starch (%) |
|-----------------|---------------|-------------------|------------|------------|
| Vascular bundle | 56.6 | 23.44 | 13.70 | 4.76 |
| Parenchyma | 37.06 | 29.83 | 8.36 | 25.09 |

2. การแยกและคัดเลือกรวมที่เรียลแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและหัวเชื่อมมเปรี้ยวคิเฟอร์เกรน

2.1 การแยกและคัดเลือกรวมที่เรียลแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและหัวเชื่อมมเปรี้ยวคิเฟอร์เกรน

จากการทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นและหัวเชื่อมมเปรี้ยวคิเฟอร์เกรน ปาล์ม โดยวิธีการเกลี่ยเชื่อบนอาหารแข็ง MRS ที่มี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งจะทำการอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเมื่อเชื้อจุลินทรีย์มีการสร้างกรด และพบว่าลักษณะของโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะกลม มีความวาว มีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ซึ่งเมื่อทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า จุลินทรีย์ที่แยกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มมีจำนวน 3.0×10^7 โคโลนีต่อมิลลิเมตร ในขณะที่จุลินทรีย์ที่แยกได้จากคิเฟอร์เกรนมีจำนวน 9.6×10^8 โคโลนีต่อกรัม ดังแสดงใน Table 16 จะเห็นได้ว่าในน้ำคั้นลำต้นปาล์มมีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่าในคิเฟอร์เกรนประมาณ 10 เท่า เนื่องจากคิเฟอร์เกรนเป็นหัวเชื่อมมเปรี้ยวที่ประกอบไปด้วยกลุ่มเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ (Arslan *et al.*, 2015) จึงทำให้มีประชากรของจุลินทรีย์ที่หนาแน่นกว่าในน้ำคั้นลำต้นปาล์ม จากนั้นคัดเลือกโคโลนีตรงบริเวณที่มีการสร้างกรดมาเกลี่ยเชื้อใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียแลคติกเบื้องต้น

โดยการทดสอบคะตะเลส โดยสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3 พบว่ามี 27 ไอโซเลท ที่แยกจากคีเฟอร์เกรน และ 7 ไอโซเลทที่แยกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่มีผลคะตะเลสเป็นลบ คือไม่มีการสร้างฟองแก๊สเกิดขึ้น จากนั้นนำไอโซเลทที่ให้ผลคะตะเลสเป็นลบไปย้อมแกรมพบว่าทั้ง 27 ไอโซเลท ที่แยกจากคีเฟอร์เกรน และ 7 ไอโซเลทที่แยกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มให้ผลการย้อมแกรมเป็นบวก คือ ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต จากผลการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากทั้งสองแหล่ง พบว่า เป็นแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 34 ไอโซเลท (Table 17) จากนั้นนำแต่ละไอโซเลทไปทำการคัดเลือกเบื้องต้นโดยเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ 3 สายพันธุ์ คือ *L. acidophilus* TISTR 1338, *L. casei* และ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุด

Table 16 Total plate count by using spread plate on MRS agar supplemented with 0.02% bromocresal purple

| Source | Total plate count |
|--------------|----------------------------|
| Kefir grains | 9.6×10^8 (CFU/g) |
| Oil palm sap | 3.0×10^7 (CFU/ml) |

Table 17 Characteristics of isolated lactic acid bacteria

| Source | Catalase test | | Gram-staining | | Morphology | | | LAB* (isolates) |
|--------------|---------------|----|---------------|---|------------|-------|----------|--------------------|
| | + | - | + | - | rod | cocci | long rod | |
| Kefir grains | 13 | 27 | 27 | - | 18 | 3 | 6 | 27 |
| Oil palm sap | 3 | 7 | 7 | - | 6 | 1 | - | 7 |

*LAB: Lactic acid bacteria

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตกรดแลคติกเบื้องต้น

จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ได้เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 34 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากคีเฟอร์เกรน 27 ไอโซเลท และจากน้ำคั้นลำต้นปาล์ม 7 ไอโซเลท จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงเบื้องต้นโดยวิธีการไทเทรตหาปริมาณกรดทั้งหมดที่เชื้อผลิตได้เปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลคติก 3 สายพันธุ์ คือ *L. acidophilus* TISTR 1338, *L. casei* และ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ซึ่งโดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียแลคติกสามารถให้ผลผลิตผลิตกรดแล

คติกได้ถึง 1 กรัมต่อกรัมกลูโคส (A-dellrahman *et al.*, 2011) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดทั้งหมดมากกว่า 0.8 กรัมต่อกรัม เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก ผลการทดลองดังแสดงใน Table 18 และ 19 พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เป็นสายพันธุ์อ้างอิงให้ผลผลิตกรดทั้งหมดสูงกว่า 0.8 กรัมต่อกรัม ในขณะที่ไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำคั้นลำต้นปาล์มมีเพียง 1 ไอโซเลท คือ SAP4 ที่ให้ผลผลิตกรดทั้งหมดมากกว่า 0.8 กรัมต่อกรัม ส่วนแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากคีเฟอร์เกรนที่ให้ผลผลิตกรดทั้งหมดมากกว่า 0.8 กรัมต่อกรัม มีทั้งหมด 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลทรหัส KF1, KF6, KF16, และ F19 นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงจะมีอัตราการเจริญที่สูงด้วย จากนั้นนำสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงทั้ง 8 สายพันธุ์ไปตรวจสอบ stereoisomer ของกรดแลคติกที่แต่ละสายพันธุ์ผลิตได้ว่าเป็น ไอโซเมอร์แอล หรือดี หรือทั้งสองไอโซเมอร์โดยใช้วิธีทางเอนไซม์ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงสูง (Cingadi *et al.*, 2015) โดยใช้ชุดทดสอบทางการค้า (D/L lactic assay kit, Megazyme, Ireland) ผลการทดลองดังแสดงใน Table 18 พบว่าสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอลเป็นหลัก มี 5 สายพันธุ์ คือ *L. acidophilus* TISTR 1338, *L. casei*, ไอโซเลทรหัส F16, F19 และ SAP4 ซึ่งมีค่า optical purity มากกว่าร้อยละ 60 และสามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 20.95, 22.19, 18.01, 18.21, 17.75 และ 12.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลัก ได้แก่ *L. kefiranofaciens* JCM 6585 และ ไอโซเลทรหัส KF1, และ KF6 โดยมีค่า optical purity มากกว่าร้อยละ 70 และสามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 13.13, 14.17 และ 10.90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองใน Table 19 จะเห็นได้ว่าไอโซเลทรหัส SAP4 และ KF6 นอกจากจะผลิตกรดแลคติกแล้วยังผลิตกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้เท่ากับ 9.11 และ 8.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณของกรดแลคติกที่เชื้อผลิตได้ ดังนั้น ไอโซเลทรหัส SAP4 และ KF6 จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตกรดแลคติกเป็นหลัก

จากการทดลองนี้จะได้แบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 6 สายพันธุ์ (Table 20) ที่ให้ผลผลิตกรดทั้งหมดสูง 0.8 กรัมต่อกรัมกลูโคส และผลิตกรดแลคติกได้ 10.90-22.19 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอลเป็นหลัก ได้แก่ *L. acidophilus* TISTR 1338, *L. casei*, ไอโซเลทรหัส F16, และไอโซเลทรหัส F19 และกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลัก ได้แก่ *L. kefiranofaciens* JCM 6585 และ ไอโซเลทรหัส KF1 จากนั้นนำแบคทีเรียแลคติกที่ยังไม่ทราบสายพันธุ์ซึ่งได้แก่ ไอโซเลท F16, F19 และ KF1 ไปวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์

Table 18 Total acid production by each isolate from kefir grains after 48 h of cultivation

| Strains | OD 660 nm | pH | Total acid (g/L) | Total acid yield ^a (g/g-glucose) |
|---------|------------|-------------|------------------|---|
| KF1 | 1.996±0.07 | 4.18±0.007 | 18.9±0.04 | 0.94 |
| KF2 | 1.766±0.01 | 4.19±0.000 | 17.8±0.21 | 0.89 |
| KF3 | 1.50±0.04 | 4.87±0.000 | 8.5±0.01 | 0.43 |
| KF6 | 1.804±0.21 | 4.13±0.007 | 19.1±0.01 | 0.95 |
| KF7 | 1.14±0.25 | 4.94±0.007 | 8.1±0.01 | 0.40 |
| KF10 | 1.09±0.05 | 5.03±0.007 | 9.1±0.01 | 0.45 |
| KF17 | 0.98±0.15 | 5.11±0.007 | 9.6±0.01 | 0.48 |
| F3 | 0.83±0.17 | 4.89±0.021 | 6.4±0.01 | 0.32 |
| F4 | 1.36±0.21 | 4.82±0.007 | 7.1±0.00 | 0.35 |
| F5 | 0.76±0.20 | 4.96±0.049 | 5.3±0.02 | 0.26 |
| F6 | 0.71±0.45 | 4.97±0.021 | 5.2±0.01 | 0.26 |
| F10 | 1.00±0.10 | 5.10±0.064 | 9.3±0.02 | 0.46 |
| F12 | 0.788±0.43 | 4.95±0.000 | 4.6±0.01 | 0.23 |
| F15 | 1.88±0.04 | 4.38±0.035 | 16.3±0.03 | 0.82 |
| F16 | 2.88±0.04 | 4.19±0.021 | 18.0±0.01 | 0.90 |
| F19 | 2.97±0.03 | 4.13±0.028 | 17.7±0.01 | 0.88 |
| F20 | 1.45±0.01 | 4.86±0.035 | 9.2±0.09 | 0.46 |
| F21 | 1.85±0.01 | 4.26±0.028 | 14.7±0.03 | 0.74 |
| F22 | 0.62±0.21 | 5.12±0.0021 | 5.5±0.02 | 0.27 |
| F23 | 1.86±0.01 | 4.82±0.03 | 6.6±0.05 | 0.33 |
| F25 | 1.98±0.03 | 4.34±0.21 | 16.1±0.04 | 0.80 |
| F26 | 1.77±0.28 | 4.13±0.57 | 17.5±0.01 | 0.88 |
| F27 | 1.58±0.01 | 5.03±0.24 | 9.0±0.04 | 0.45 |
| F29 | 1.08±0.11 | 4.87±0.20 | 8.65±0.14 | 0.43 |
| F30 | 1.19±0.15 | 4.88±0.15 | 8.88±0.42 | 0.44 |
| F32 | 0.98±0.64 | 5.00±0.30 | 7.82±0.06 | 0.39 |
| F35 | 1.48±0.01 | 4.92±0.10 | 8.97±0.09 | 0.45 |

^aBatch cultures were conducted in test tubes with 10 ml working volume in MRS medium

Table 19 Total acid production by each isolate from oil palm sap and stock culture after 48 h of cultivation

| Strains | OD 660 nm | pH | Total acid (g/L) | Tatal acid yield ^a (g/g-glucose) |
|---------------------------|-------------|------------|---------------------|--|
| SAP2 | 1.009±0.001 | 4.38±0.057 | 11.7±0.13 | 0.58 |
| SAP4 | 1.117±0.000 | 4.36±0.191 | 17.0±0.01 | 0.85 |
| SAP5 | 0.895±0.010 | 4.58±0.028 | 13.1±0.06 | 0.66 |
| SAP7 | 1.058±0.002 | 4.57±0.042 | 13.1±0.06 | 0.66 |
| SAP8 | 0.785±0.191 | 4.58±0.014 | 11.3±0.06 | 0.56 |
| SAP9 | 0.958±0.007 | 4.21±0007 | 14.4±0.00 | 0.72 |
| SAP10 | 1.024±0.005 | 4.27±0.035 | 10.8±0.00 | 0.54 |
| <i>L. acidophilus</i> | 2.69±0.014 | 4.02±0.028 | 21.3±0.03 | 1.0 |
| TSTR 1338 | | | | |
| <i>L. casei</i> | 2.40±0.008 | 4.10±0.04 | 19.5±0.05 | 0.97 |
| <i>L. kefiranofaciens</i> | 1.416±0.021 | 4.28±0.05 | 17.60±0.19 | 0.88 |
| JCM | | | | |

*Batch cultures were conducted in test tubes with 10 mL working volume in MRS medium

^a Based on glucose concentration of 20 g/L in MRS; $Y_{p/s} = (P_t - P_0) / (S_t - S_0)$

Table 20 Detection of isomeric form and optical purity by using D/L lactic acid assay kit and detected lactic acid and acetic acid production by HPLC after 48 h of cultivation

| Strains | Major isomer | Optical purity (%) | Lactic acid (g/L) | Acetic acid (g/L) |
|---------------------------|--------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| KF1 | D | 75.4 | 14.17±0.20 | 3.45±0.06 |
| KF6 | D | 66.9 | 10.9±0.05 | 8.03±0.56 |
| F16 | L | 97.2 | 18.01±0.10 | 0.64±0.02 |
| F19 | L | 96.6 | 17.75±0.47 | 0.65±0.03 |
| SAP4 | L | 69.8 | 12.87±0.19 | 9.11±0.22 |
| <i>L. acidophilus</i> | L | 62.7 | 20.95±0.23 | 2.72±0.10 |
| TISTR 1338 | | | | |
| <i>L. casei</i> | L | 61.9 | 22.19±0.56 | 3.32±0.22 |
| <i>L. kefiranofaciens</i> | D | 97.6 | 13.13±0.51 | 2.46±0.86 |
| JCM 6985 | | | | |

2.3 การเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากคีเฟอร์กรนและจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่ให้ปริมาณกรดแลคติกสูง สามารถคัดเลือกได้ 6 สายพันธุ์ คือ *L. acidophilus* TISTR 1338, *L. casei*, *L. kefiranofaciens* JCM 6585, ไอโซเลทรหัส F16, ไอโซเลทรหัส F19 และไอโซเลทรหัส KF1 ซึ่งจะมี 3 ไอโซเลทที่ยังไม่ทราบสายพันธุ์ของเชื้อจึงนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA โดยใช้ Universal primer คือ 27F (5' -CACCAGGTTCTGCC -3') และ 1492R (5' -CGGTTACCTTGTTACGACTT- 3') ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรีย นำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ใน database ที่มีฐานข้อมูลอยู่ในอินเทอร์เน็ตด้วยโปรแกรม BLAST จ 1 ก National Center for Biotechnology Information server (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ผลการทดลองดังแสดงใน Table 21 พบว่าแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท f16 และ f19 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Lactobacillus paracasei* R094 (Genbank accession number NR_025880.1) ซึ่งมีความเหมือนร้อยละ 100 (2553/2553 bp) จึงจำแนกแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท F16 และ F19 *Lactobacillus paracasei* F16 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+)-lactic acid เป็นหลัก ส่วนไอโซเลทรหัส KF1 มีลำดับเบสที่เหมือนกับ *L. kefir* (Genbank accession number AJ_621553) ซึ่งมีความเหมือนร้อยละ 99.93 จึงจัดจำแนกเป็น *L. kefir* KF1 และจากการศึกษาแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยใช้แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) เพื่อแสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการและความสัมพันธ์คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในกลุ่มใด โดยวิเคราะห์แบบ neighbor-joining (Figure 15) ซึ่งมี *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 เป็น out group ในแผนภูมิต้นไม้จะเห็นได้ว่า แบคทีเรียแลคติก ไอโซเลท F16 และ F19 มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus paracasei* ส่วนไอโซเลทรหัส KF1 มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus kefir*

Table 21 Identification of the selected L-lactic acid producing strains by 16S rDNA sequence analysis

| Isolated | Identification | GenBank Accession | | Base pair | Similarity (%) |
|----------|--------------------------|-------------------|--|-----------|----------------|
| | | No. | | | |
| F16 | <i>L. paracasei</i> R094 | NR_025880.1 | | 2553/2553 | 100 |
| F19 | <i>L. paracasei</i> R094 | NR_025880.1 | | 2553/2553 | 100 |
| KF1 | <i>L. kefir</i> | AJ_621553 | | 1346/1346 | 99.93 |

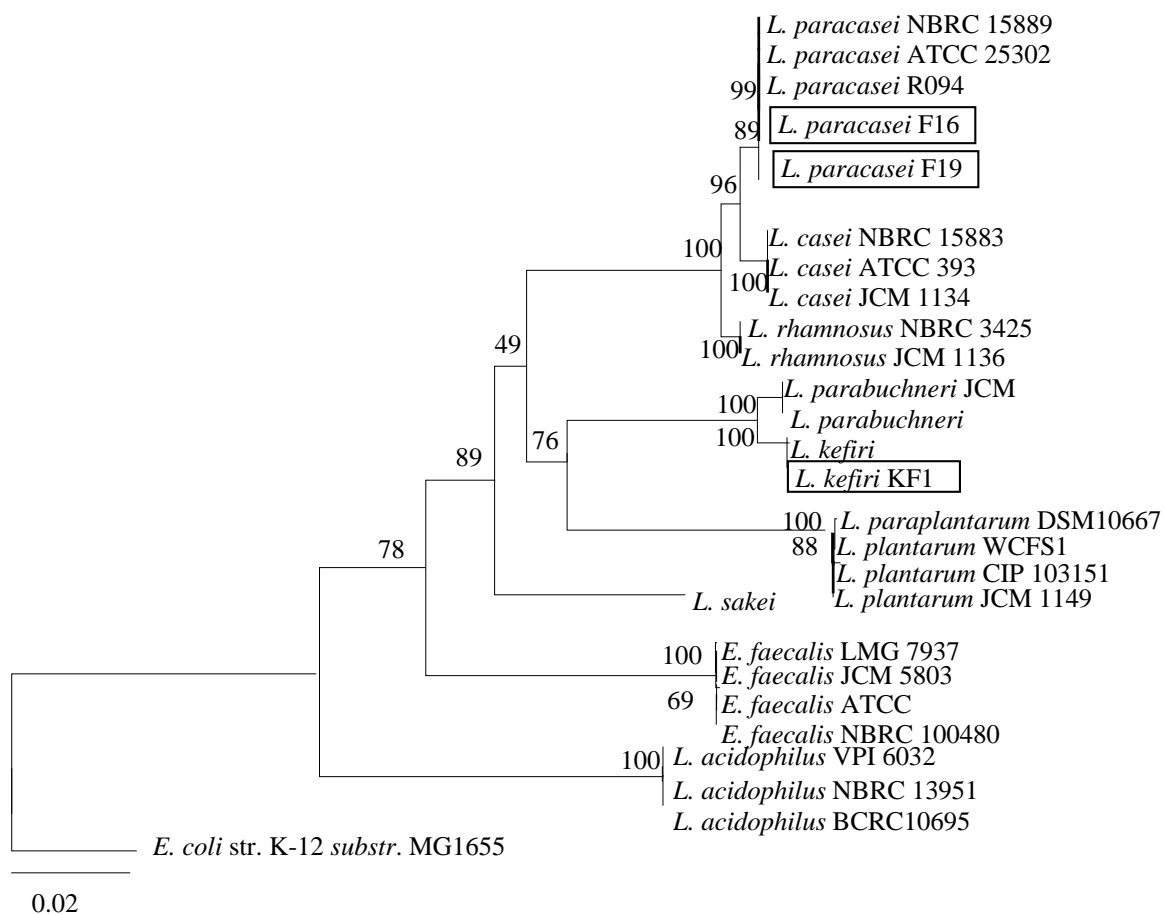


Figure 15 Phylogenetic tree of the selected strains based on the 16S rDNA sequence analysis.

3. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่เจริญและผลิตกรดแลคติกได้ในน้ำคั้นลำต้นปาล์มภายใต้สภาวะที่ควบคุมและไม่ควบคุมพีเอช

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแบคทีเรียแลคติก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอลเป็นหลัก ได้แก่ แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. paracasei* F16 และกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลัก ได้แก่ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และ *L. kefir* KF1 เพาะเลี้ยงในน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยไม่เติมสารอาหารอื่นๆและปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 กวนที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอชและควบคุมพีเอชในระหว่างการหมักให้อยู่ในช่วง 5-5.5 โดยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล ผลการทดลองแสดงใน Figure 16a, 17a, 18a, 19a และ 20a พบว่าภายใต้สภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอช แบคทีเรียแลคติกทุกสายพันธุ์เจริญเติบโตได้ดีโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วง 0.55-1.15 กรัมต่อลิตร และผลิตกรดทั้งหมดในช่วง 5.11-12.74 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดยังคงเหลือ 7.62-17.80 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าค่าพีเอชของน้ำหมักลดลงอย่างรวดเร็วไปจนถึงช่วง 3.11-3.45 ซึ่งการลดลงของพีเอชเกิดจากการสะสมของกรดแลคติก โดยทั่วไปแล้วกรดแลคติกจะมีค่า pKa เท่ากับ 3.86 (Adashi *et al.*, 1998) ซึ่งถ้าค่าพีเอชของน้ำหมักลดลงต่ำกว่า pKa ของกรดแลคติกจะทำให้กรดแลคติกอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว (undissociated) ทำให้กรดแลคติกเข้าไปแตกตัวภายในเซลล์ ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของโปรตอนภายในเซลล์ เซลล์จึงต้องใช้พลังงานในการผลักโปรตอนออกนอกเซลล์ ทำให้มีพลังงานเหลือไม่เพียงพอในการเจริญเติบโต เซลล์จึงหยุดการเจริญเติบโตหรือตายในที่สุด (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000) และเมื่อเซลล์หยุดการเจริญ การผลิตกรดแลคติกก็จะหยุดลงด้วยเช่นกัน

เมื่อมีการควบคุมพีเอชในระหว่างการหมักให้อยู่ในช่วง 5.0-5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 10 นอร์มอล พบว่าแบคทีเรียแลคติกทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอชโดยน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเป็น 0.96-1.66 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 11.95-17.44 กรัมต่อลิตร ดังแสดงใน Figure 16b, 17b, 18b, 19b และ 20b จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการควบคุมพีเอชมีความสำคัญต่อกระบวนการหมักกรดแลคติก โดยการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกภายใต้สภาวะควบคุมพีเอช จะเป็นการเติมต่างซึ่งจะทำให้กรดแลคติกแตกตัวและจับกับต่างทำให้เกิดเกลือและลดการยับยั้งของกรดแลคติกต่อเซลล์ได้

เมื่อนำตัวอย่างน้ำหมักชั่วโมงสุดท้ายไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดย HPLC ผลการทดลองดังแสดงใน Table 22 พบว่าในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอลเป็นหลัก *L. acidophilus* TISTR 1338 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 21.98 กรัมต่อลิตร

ภายใต้สภาวะควบคุมพีเอช และให้ผลผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 0.80 กรัมต่อกรัม และผลิตกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้เล็กน้อย ส่วนกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลัก พบว่า *L. kefir* KF1 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุดเท่ากับ 19.31 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 0.75 กรัมต่อกรัม นอกจากนี้พบว่า *L. kefir* KF1 ยังสามารถผลิตกรดอะซิติกและเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Guyot และคณะ (2000) ที่ศึกษาผลของการควบคุมพีเอชต่อการผลิตกรดแลคติกจากแป้งที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus manihotivoran* LMG 18010 ซึ่งพบว่าสภาวะที่ไม่มีการควบคุมพีเอชเชื้อผลิตกรดแลคติกได้เพียง 6.0 กรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมพีเอชเป็น 6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มอล พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเป็น 12.5 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ Mussatto และคณะ (2008) ที่รายงานว่าภายใต้สภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอชแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *L. delbrueckii* UFV H2B20 ผลิตกรดแลคติกได้เพียง 13.02 กรัมต่อลิตร และเมื่อมีการควบคุมพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เชื้อสามารถผลิตกรดแลคติกได้เพิ่มขึ้นเท่ากับ 35.54 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกจากแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* TISTR 1338 ซึ่งผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอลเป็นหลักและ *L. kefir* KF1 ซึ่งผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลักจะเห็นได้ว่า *L. acidophilus* TISTR 1338 สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งจะอาศัยการหมักน้ำตาลผ่านกระบวนการหมักแบบ Homofermentative ในขณะที่ *L. kefir* KF1 จะอาศัยการหมักน้ำตาลผ่านกระบวนการหมักแบบ Heterofermentative ซึ่งนอกจากจะผลิตกรดแลคติกแล้ว ยังผลิตกรดอะซิติก และเอทานอลด้วย โดยเชื่อจะใช้น้ำตาลบางส่วนในการผลิตกรดอะซิติก และเอทานอลจึงส่งผลให้ผลิตกรดแลคติกได้น้อยกว่า

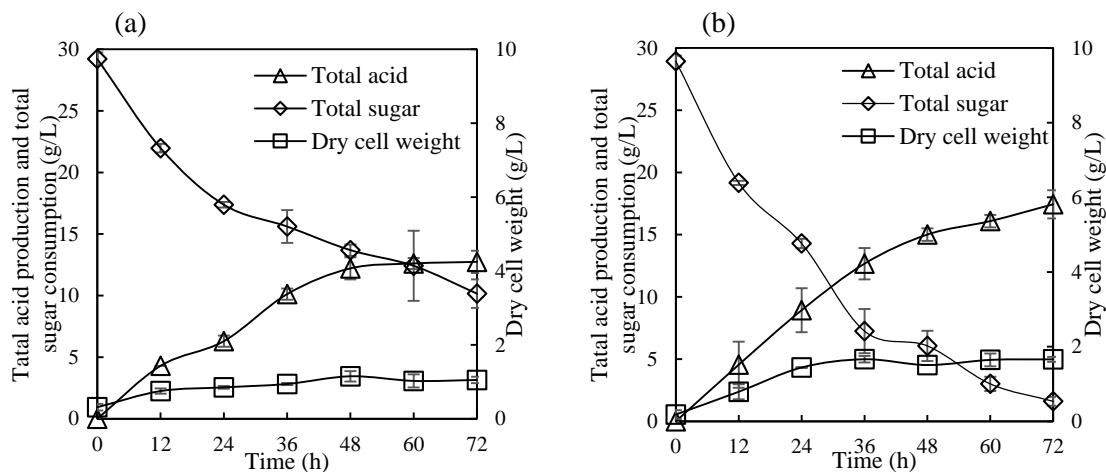


Figure 16 *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 cultivated in oil palm sap under condition without pH control (a) and with pH control (b).

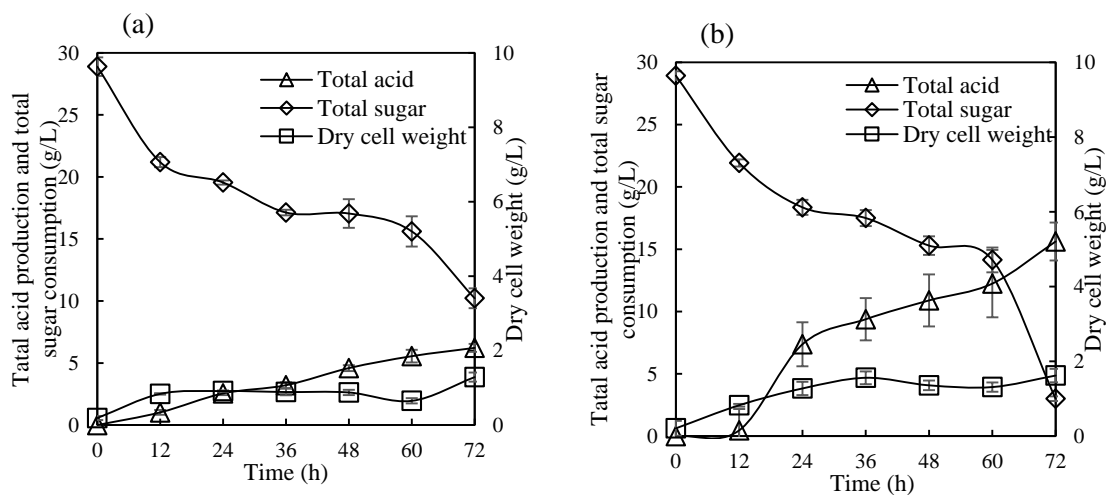


Figure 17 *Lactobacillus casei* cultivated in oil palm sap under condition without pH control (a) and with pH control (b).

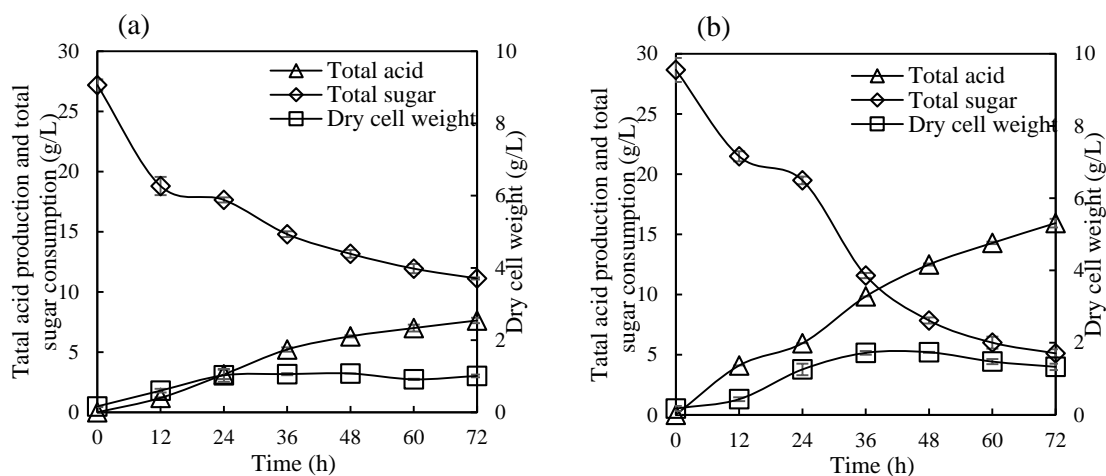


Figure 18 *Lactobacillus paracasei* F16 cultivated in oil palm sap under condition without pH control (a) and with pH control (b).

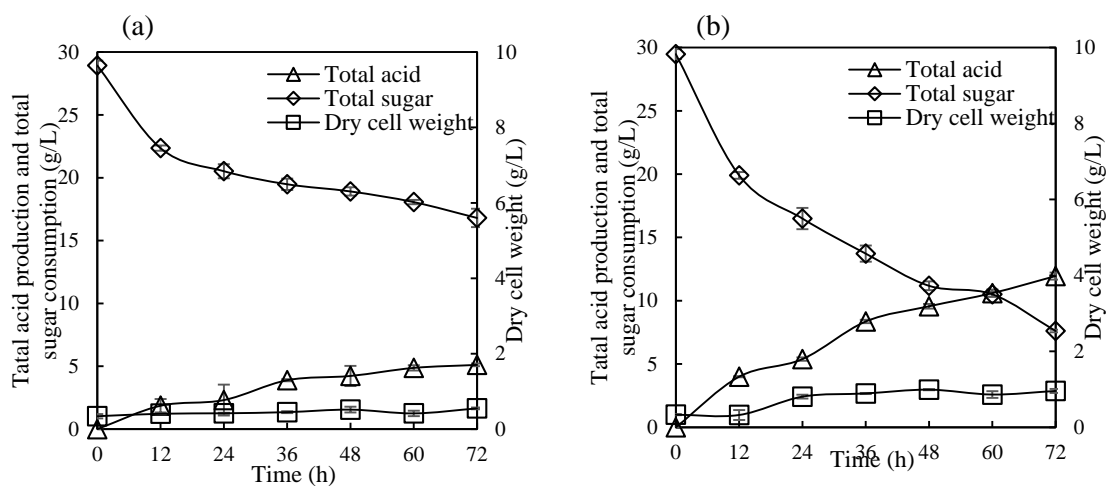


Figure 19 *Lactobacillus kefirarafaciens* JCM 6985 cultivated in oil palm sap under condition without pH control (a) and with pH control (b).

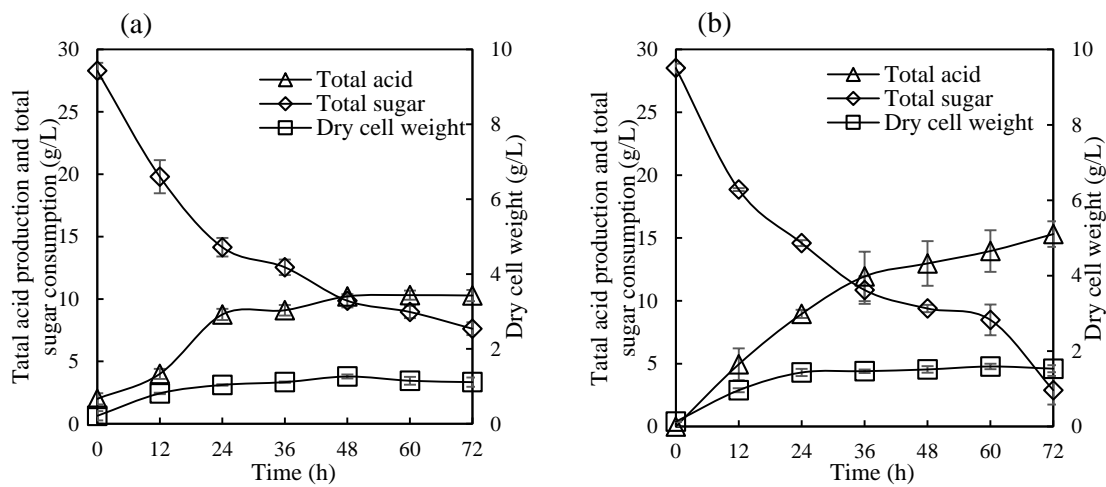


Figure 20 *Lactobacillus kefir* KF1 cultivated in oil palm sap under condition without pH control (a) and with pH control (b).

Table 22 Lactic acid, acetic acid and ethanol production by lactic acid bacteria cultivated in sap broth (total sugar 30 g/L) with and without pH controlled detected by HPLC

| Metabolites | LAB group that produce mainly | | | LAB group that produce mainly | |
|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| | L-lactic acid | | | D-lactic acid | |
| | <i>L. acidophilus</i> TISTR 1338 | <i>L. casei</i> | <i>L. paracasei</i> F16 | <i>L. kefirarafaciens</i> JCM 6985 | <i>L. kefiri</i> KF1 |
| Uncontrolled pH | | | | | |
| Lactic acid (g/L) | 12.63±0.12 ^a | 7.22±0.46 ^c | 11.04±0.89 ^b | 4.54±0.33 ^d | 11.37±0.59 ^{ab} |
| Acetic acid (g/L) | 0.37±0.11 ^c | 0.13±0.05 ^d | 0.52±0.22 ^b | 0.36±0.09 ^c | 0.98±0.5 ^a |
| Ethanol (g/L) | nd | 4.53±0.27 ^a | 0.46±0.13 ^d | 0.54±0.26 ^c | 3.88±1.06 ^b |
| Lactic acid yield (g/g-sugar) | 0.66±0.01 ^a | 0.39±0.02 ^c | 0.69±0.06 ^a | 0.37±0.03 ^c | 0.53±0.03 ^b |
| Controlled pH | | | | | |
| Lactic acid (g/L) | 21.98±3.36 ^a | 18.9±0.79 ^{ab} | 18.57±0.30 ^c | 13.13±1.24 ^d | 19.31±1.11 ^b |
| Acetic acid (g/L) | 0.91±0.01 ^b | 0.69±0.02 ^d | 1.06±0.17 ^a | 0.31±0.07 ^b | 0.80±0.09 ^c |
| Ethanol (g/L) | nd | 0.11±0.15 ^c | 0.68±0.24 ^b | 0.12±0.20 ^c | 1.25±0.53 ^a |
| Lactic acid yield (g/g-sugar) | 0.80±0.12 ^a | 0.73±0.03 ^a | 0.79±0.01 ^a | 0.60±0.06 ^b | 0.75±0.04 ^a |

* Different superscript letters indicate significant differences between strains and conditions in the same group, * nd means not detected.

4. การผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์มด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก

4.1 การศึกษาผลของปริมาณกากลำต้นปาล์มในน้ำคั้นลำต้นปาล์ม

การผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกโดยทั่วไปแล้วจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการเติมกากลำต้นปาล์มน้ำมันในน้ำคั้นลำต้นปาล์มเพื่อเพิ่มแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในการผลิตกรดแลคติกโดยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก ซึ่งในกระบวนการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์บอนประเภทลิกโนเซลลูโลสจะต้องเติมสารอาหารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์และต้องอาศัยกระบวนการย่อยเบื้องต้น (prehydrolysis) เพื่อให้มีน้ำตาลเริ่มต้นให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ (Boonsawang *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามการใช้กากลำต้นปาล์มร่วมกับกากลำต้นปาล์มน้ำมันสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับแบคทีเรียแลคติกได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารอื่นๆ และไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการย่อยเบื้องต้นเพื่อให้ได้น้ำตาลก่อนการหมักของจุลินทรีย์

การเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนสามารถเพิ่มการผลิตกรดแลคติกได้ แต่การเติมกากลำต้นปาล์มที่มากเกินไปมีผลทำให้ระบบมีความหนืดสูงจนส่งผลให้กวนได้ยากขึ้น และทำให้การสัมผัสระหว่างกากลำต้นปาล์มกับเอนไซม์เกิดขึ้นได้ยาก (ยุทธศักดิ์ สุภการีย์, 2552) โดยพบว่าการใช้ปริมาณกากลำต้นปาล์มที่สูงกว่าร้อยละ 15 ทำให้เกิดการกวนผสมได้ไม่ดี ดังนั้นจึงศึกษาปริมาณกากลำต้นปาล์มที่แตกต่างกันที่ร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์มด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก โดยใช้กากลำต้นปาล์มน้ำมันที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลที่ไม่ผ่านการเจือจางและเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 15 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์ม ควบคุมพีเอชเท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอลในระหว่างการเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนด้วยอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

จากการทดลองการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ซึ่งผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอล เป็นหลัก ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 21 พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ในชุดควบคุมที่เติมเฉพาะน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรและไม่เติมกากลำต้นปาล์ม ให้ปริมาณกรดทั้งหมด 34.07 ± 0.81 กรัมต่อลิตร โดยที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลในน้ำคั้นลำต้นปาล์มหมดภายในระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง และเมื่อเติมกากลำต้นปาล์มร้อยละ 5-15 และเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า ปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 43.70 ± 0.21 , 63.35 ± 0.17 และ 66.82 ± 0.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่น้ำตาลทั้งหมดยังคงเหลือในระบบเท่ากับ 11.05 ± 1.12 , 25.90 ± 0.43 , 49.95 ± 1.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ยังคงเหลือเท่ากับ 3.34 ± 0.13 , 10.14 ± 0.12 และ 18.92 ± 0.28 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง

จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงเหลือมากกว่าน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือเนื่องจากการทดลองเติมเฉพาะเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลสทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยมีทั้งน้ำตาลกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ (จตุพร ปานทอง, 2557) การที่น้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือมีปริมาณน้อยกว่านั้นเป็นผลมาจากแบคทีเรียแลคติกสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญและการผลิตกรดแลคติกได้ ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงเหลืออาจจะเป็นกลุ่มของโอลิโกแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียแลคติกไม่สามารถใช้ในการเจริญและการผลิตกรดแลคติกได้ โดยที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงเหลือจะมีมากขึ้นเมื่อปริมาณกากลำต้นปาล์มเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ของตัวอย่างน้ำหมักข้าวโม่สุกท้าย ดังแสดงใน Figure 22 จะเห็นได้ว่าโครมาโตแกรมที่ตำแหน่งรีเทนชันไทม์ (retention time) ช่วง 6.3-7.5 จะมีค่าพื้นที่พีค (area) เพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณกากลำต้นปาล์มเพิ่มขึ้น อาจเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เชื้อไม่สามารถใช้ในการเจริญและการผลิตกรดแลคติก

เมื่อนำตัวอย่างข้าวโม่สุกท้ายของการหมักไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดย HPLC พบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* TISTR 1338 ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และมีผลพลอยได้คือ กรดอะซิติก ผลการทดลองดังแสดงใน Table 23 พบว่าชุดควบคุมที่เติมเฉพาะน้ำคั้นลำต้นปาล์ม 40 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซิติกเท่ากับ 22.85 ± 0.47 และ 2.28 ± 0.09 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในขณะที่การเพิ่มปริมาณกากลำต้นปาล์มลงในระบบที่ร้อยละ 5, 10 และ 15 ทำให้ปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเป็น 39.81 ± 1.61 , 64.94 ± 0.51 และ 66.61 ± 0.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นเป็น 2.90 ± 0.09 , 3.77 ± 0.09 และ 3.83 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่ปริมาณกากลำต้นปาล์มร้อยละ 10 และ 15 เชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันและมีอัตราการผลิตที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณกากลำต้นปาล์มร้อยละ 15 และเมื่อพิจารณาผลของความหนืดที่เกิดขึ้นในระบบ พบว่า ที่ปริมาณกากลำต้นปาล์มร้อยละ 15 เป็นปริมาณที่สูงเกินไปทำให้ระบบมีความหนืดสูงและเกิดข้อจำกัดของการถ่ายโอนมวล (Nguyen *et al.*, 2016) ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณกากลำต้นปาล์มร้อยละ 10 ในการทดลองถัดไป

ส่วนการทดลองการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. kefir* KF1 ซึ่งผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลัก ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 23 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณกากลำต้นปาล์มน้ำมันจากร้อยละ 0 เป็น 5, 10 และ 15 โดยน้ำหนัก เชื้อ *L. kefir* KF1 สามารถผลิตกรดทั้งหมดได้เพิ่มขึ้นจาก 23.54 เป็น 31.1, 36.3 และ 39.26 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่น้ำตาลทั้งหมดยังคงเหลือเท่ากับ 13.33, 16.01, 44.27 และ 58.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือเท่ากับ 0.54, 8.13, 16.56 และ 21.31 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำตัวอย่างหัวโมงสุดท้ายของการหมักไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดย HPLC พบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *L. kefir* KF1 ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักและมีผลพลอยได้คือ กรดอะซิติก และเอทานอล จากผลการทดลองที่แสดงใน Table 24 ในชุดควบคุมที่เติมเฉพาะ น้ำคั้นลำต้นปาล์มที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรและไม่เติมกากลำต้นปาล์ม ให้ปริมาณกรดแลคติก กรดอะซิติก และเอทานอล เท่ากับ 18.12 ± 0.20 , 1.64 ± 0.63 และ 1.25 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเติมกากลำต้นปาล์มร้อยละ 5, 10 และ 15 พบว่าเชื่อมีการผลิตกรดแลคติกได้ เท่ากับ 18.61 ± 1.31 , 27.20 ± 0.43 และ 32.40 ± 2.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบปริมาณ กรดอะซิติก และเอทานอลที่เพิ่มขึ้นด้วย โดยปริมาณกากลำต้นปาล์มร้อยละ 15 และร้อยละ 10 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากที่ปริมาณกากลำต้นปาล์มร้อยละ 15 เป็น ปริมาณที่สูงเกินไปทำให้การถ่ายโอนมวลได้น้อย ดังนั้นปริมาณกากลำต้นปาล์มที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์มด้วยวิธีการย่อยพร้อมการ หมักโดยเชื้อ *L. kefir* KF1 คือปริมาณกากลำต้นปาล์มน้ำมันร้อยละ 10 เช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้อง กับงานวิจัยของ Hama และคณะ (2015) ที่ผลิตกรดแลคติกจากเยื่อไม้เนื้อแข็งโดยวิธีการย่อยพร้อม การหมัก พบว่าที่ปริมาณเยื่อไม้เนื้อแข็งร้อยละ 10 เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Zhao และคณะ (2013) ที่ผลิตกรดแลคติกจากซังข้าวโพดโดยวิธีการ ย่อยพร้อมการหมักซึ่งพบว่าที่ปริมาณซังข้าวโพดร้อยละ 25 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดซึ่ง เป็นผลมาจากการใช้ถังหมักที่มีใบพัดกวนแบบกรวยที่เหมาะสมสำหรับการกวนผสมเพื่อลด ข้อจำกัดการถ่ายโอนมวลในกรณีที่มีปริมาณสับสเตรทที่สูงเกินไป

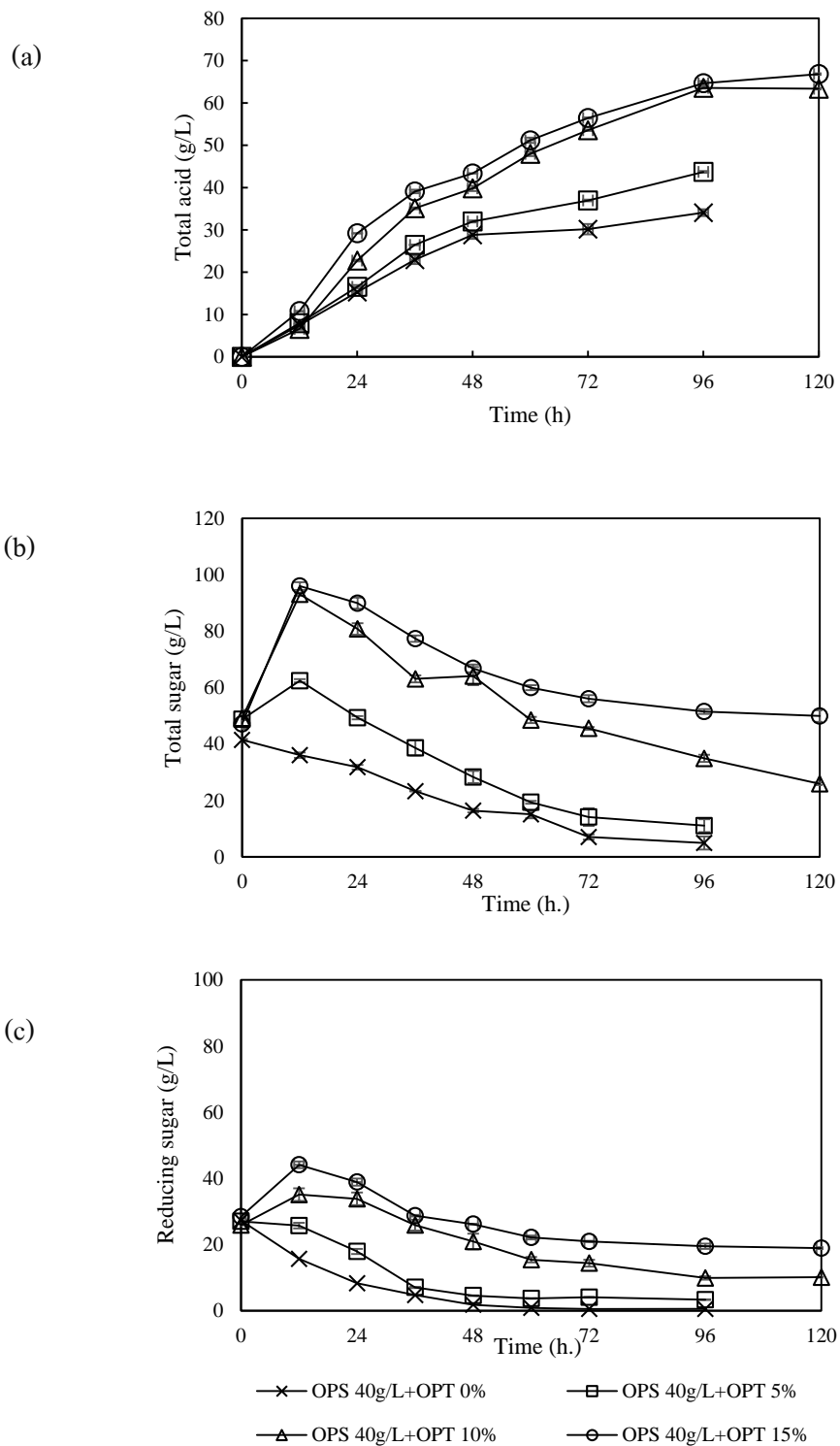


Figure 21 Lactic acid production by *L.acidophilus* TISTR 1338 at sap concentration of 40 g/L with difference substrate loading; (a) Total acid (g/L), (b) Total sugar (g/L) and (c) Reducing sugar (g/L)

Table 23 Effect of OPT loading on LA production, yield and productivity from SSF of OPS and OPT by *L. acidophilus* TISTR 1338

| OPS added with OPT | Lactic acid (g/L) | Acetic acid (g/L) | Lactic acid yield* (g/g) | Lactic acid productivity ** (g/L.h) |
|----------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------|---|
| OPS 40 g/L + 0% OPT | 22.85±0.47 ^c | 2.28±0.09 ^c | 0.57±0.01 ^{bc} | 0.32±0.01 ^c |
| OPS 40 g/L + 5% OPT | 39.81±1.61 ^b | 2.90±0.09 ^c | 0.59±0.02 ^b | 0.55±0.02 ^b |
| OPS 40 g/L + 10% OPT | 64.94±0.51 ^a | 3.77±0.09 ^b | 0.68±0.01 ^a | 0.90±0.01 ^a |
| OPS 40 g/L + 15% OPT | 66.61±0.63 ^a | 3.83±0.16 ^a | 0.54±0.01 ^b | 0.93±0.01 ^a |

Different superscript letters indicate significant differences between conditions in the same group.

* Based on total available sugar from OPS 40 g/L and OPT loadings at 5, 10 and 15%;

$$Y_{p/s} = (P_f - P_0) / (S_{OPS} + S_{OPT}); S_{OPT} = \text{available sugar from OPT based on cellulose content.}$$

** Overall rate of lactic acid production estimated at 96h.

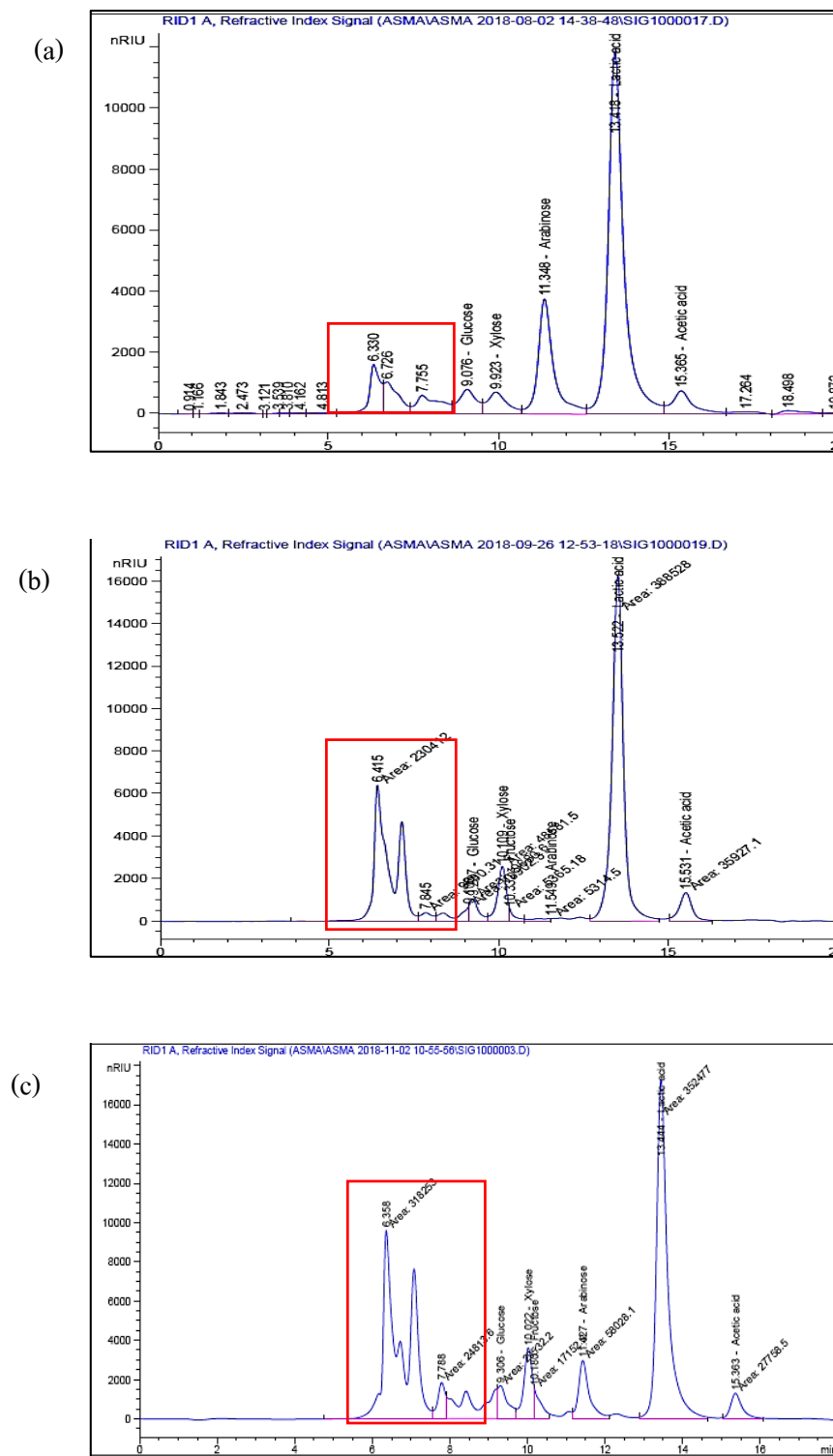


Figure 22 HPLC profiles of lactic acid production by *L. acidophilus* TISTR 1338 at sap concentration of 40 g/L with different OPT loadings; (a) 5%, (b) 10% and (c) 15%

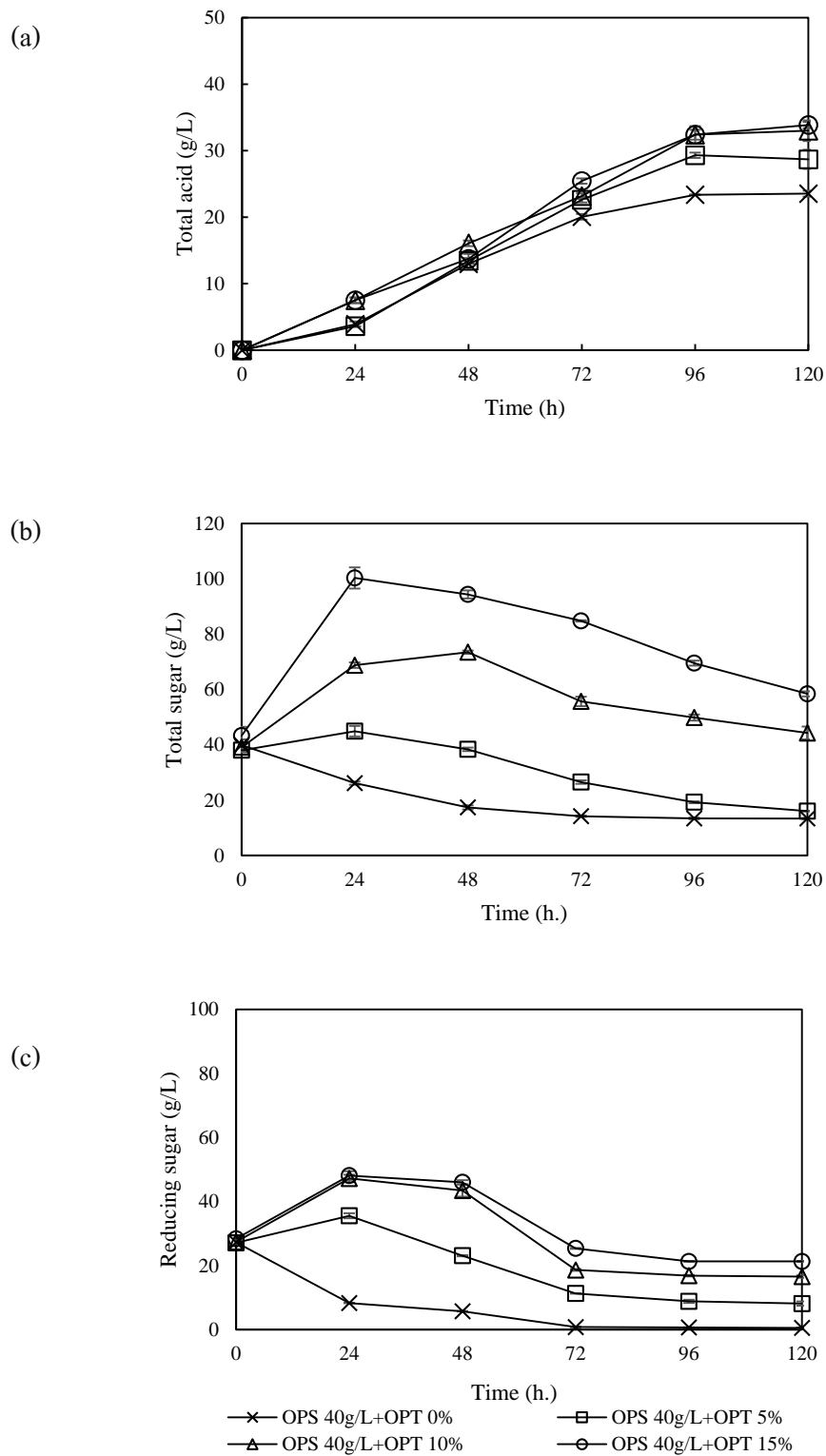


Figure 23 Lactic acid production by *L. kefir* KF1 at sap concentration of 40 g/L with difference substrate loading; (a) Total acid (g/L), (b) Total sugar (g/L), (c) Reducing sugar (g/L)

Table 24 Effect of OPT loading on LA production, yield and productivity from SSF of OPS and OPT by *L. kefir* KF1

| OPS added with OPT | Lactic acid (g/L) | Acetic acid (g/L) | Ethanol (g/L) | Lactic acid yield* (g/g) | Lactic acid productivity** (g/L.h) |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|--|
| OPS 40 g/L + 0%OPT | 18.12±0.20 ^c | 1.64±0.09 ^c | 6.38±0.19 ^b | 0.41±0.04 ^a | 0.23±0.02 ^b |
| OPS 40 g/L + 5%OPT | 18.61±1.31 ^c | 3.11±0.52 ^{bc} | 9.44±1.20 ^{ab} | 0.29±0.02 ^b | 0.26±0.02 ^b |
| OPS 40 g/L + 10%OPT | 27.20±0.43 ^b | 4.66±0.25 ^b | 12.1±1.00 ^a | 0.30±0.01 ^b | 0.38±0.01 ^a |
| OPS 40 g/L + 15%OPT | 32.40±2.10 ^a | 6.35±0.50 ^a | 11.1±0.48 ^a | 0.28±0.02 ^b | 0.45±0.03 ^a |

Different superscript letters indicate significant differences between conditions in the same group.

*Based on total available sugar from OPS 40 g/L and OPT loadings at 5, 10 and 15%;

$$Y_{p/s} = (P_f - P_0) / (S_{OPS} + S_{OPT}); S_{OPT} = \text{available sugar from OPT based on cellulose content.}$$

**Overall rate of lactic acid production estimated at 96h.

4.2 การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์

ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสนั้นจะต้องมีการย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนจึงจะได้น้ำตาลออกมาและสามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดแลกติกได้โดยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสนั้นจะประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส และเอนไซม์ไซลานเนส ซึ่งการย่อยโดยเอนไซม์เซลลูเลสเพียงอย่างเดียวจะทำให้ได้น้ำตาลเซลโลไบโอส และโอลิโกเมอร์ของน้ำตาล ในหลายงานวิจัยจึงนิยมใช้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสร่วมด้วยเพื่อให้สามารถย่อยต่อได้เป็นน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้น (ยุทธศักดิ์ สุกการี, 2552) งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์มด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักโดยทำการเติมเอนไซม์เซลลูเลส 15 ฟิลเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัม ร่วมกับการเติมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส 5 ยูนิตต่อกรัม ผลการทดลองพบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดได้ไม่แตกต่างกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกในงานวิจัยนี้สามารถใช้น้ำตาลเซลโลไบโอสหรือโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลได้โดยตรง ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุน ในการทดลองนี้จึงไม่มีการเติมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสร่วม และไม่ได้เติมเอนไซม์ไซลานเนสเพื่อย่อยเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ (Martinez *et al.*, 2013)

จากการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์มด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก โดยเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ซึ่งผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์แอลเป็นหลัก กำหนดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 5, 10, 15 และ 20 ฟิลเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์ม ในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 5 – 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ในน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตรและเติมกากลำต้นปาล์มร้อยละ 10 ที่มีปริมาณเอนไซม์ 5 ฟิลเตอร์เปเปอร์ต่อกรัมกากลำต้นปาล์ม ให้ปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับ 47.31 ± 0.71 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้มีค่ากิจกรรมเป็น 10, 15 และ 20 ฟิลเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์ม พบว่า ปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 53.82 ± 0.72 , 64.55 ± 0.60 และ 69.37 ± 1.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยที่ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 20 ฟิลเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์ม ทำให้เชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ผลิตกรดได้สูงสุด ดังแสดงใน Figure 24 นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ยังทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงเริ่มต้นของการหมัก เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสสามารถย่อยกากลำต้นปาล์มได้เร็วกว่าการใช้น้ำตาลของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338

ในช่วงเริ่มต้นของการหมัก ดังแสดงใน Figure 24b อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมที่สูงขึ้นทำให้แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตกรดแลคติกได้เพิ่มขึ้น แต่การใช้เอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมที่สูงเกินไปไม่ได้ทำให้ปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Qiu *et al.*, 2018) และพบว่าที่ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 15 และ 20 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์มให้ปริมาณกรดแลคติก ผลผลิตกรดแลคติก และอัตราการผลิตกรดแลคติกที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงใน Table 25 ดังนั้นปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 15 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์มจึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่ความเข้มข้นน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และกากลำต้นปาล์มปริมาณร้อยละ 10 โดยวิธีการย่อยพร้อมการหมักสำหรับแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* TISTR 1338 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lui และคณะ (2015) ที่พบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. acidilactici* TY112 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดโดยใช้ขังข้าวโพดที่มีปริมาณร้อยละ 10 และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 15 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท โดยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก ในขณะที่ Yi และคณะ (2016) พบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. acidilactici* ZP26 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดโดยใช้ขังข้าวโพดปริมาณร้อยละ 25 และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 15 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท

สำหรับผลการทดลองการผลิตกรดแลคติกโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *L. kefir* KF1 ซึ่งผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลัก พบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสทำให้เชื้อ *L. kefir* KF1 สามารถผลิตกรดทั้งหมดได้เพิ่มขึ้นโดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงเริ่มต้นการหมักแล้วจึงค่อยๆ ลดลง (Figure 25) จากผลการทดลองใน Table 26 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสจาก 5 ถึง 20 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์มทำให้เชื้อ *L. kefir* KF1 ผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 18.28 ± 0.84 , 23.45 ± 0.35 , 27.20 ± 0.43 และ 30.45 ± 2.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ไม่ได้ทำให้ปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Table 25) นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ยังทำให้ *L. kefir* KF1 ผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นเช่นกัน จะเห็นได้ว่าที่ปริมาณเอนไซม์ 15 และ 20 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์ม เป็นปริมาณเอนไซม์ที่ให้ปริมาณกรดแลคติก ผลผลิตกรดแลคติกและอัตราการผลิตกรดแลคติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรม 15 ฟิเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์ม จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. kefir* KF1 จากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ซึ่งผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอลเป็นหลักกับเชื้อ *L. kefir* KF1 ซึ่งผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลัก โดยใช้ น้ำคั้นลำต้นปาล์มที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตรและกากลำต้นปาล์มน้ำมันร้อยละ 10 จากผลการทดลองพบว่า *L. acidophilus* TISTR 1338 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่า *L. kefir* KF1 ประมาณสองเท่า ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ในการทดลองต่อไป

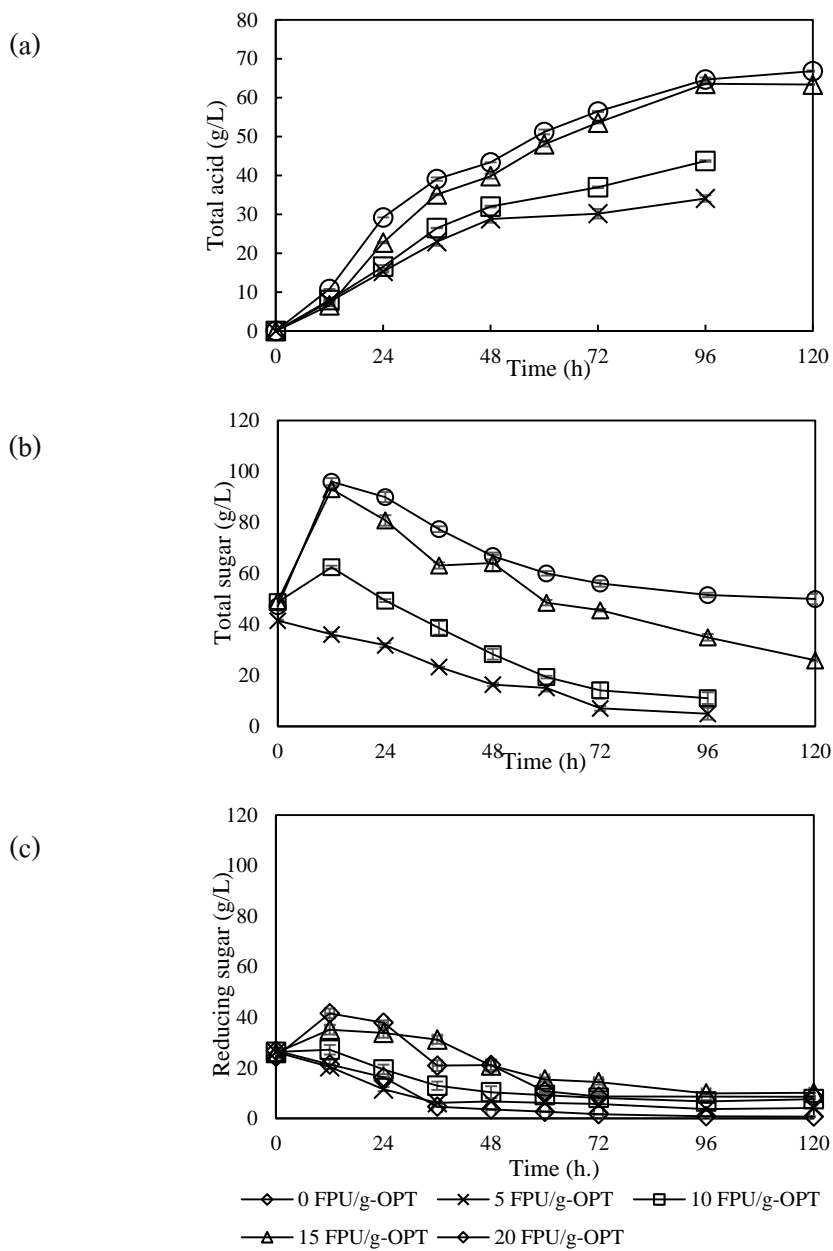


Figure 24 Effect of enzyme loading on lactic acid production from OPS and OPT through SSF by *L. acidophilus* TISTR 1338 (a) Total acid (g/L), (b) Total sugar (g/L) and (c) Reducing sugar (g/L).

Table 25 Effect of cellulase loading on LA production, yield and productivity from OPS and OPT through SSF by *L. acidophilus* TISTR 1338

| Enzyme loading (FPU/g-OPT) | Lactic acid (g/L) | Acetic acid (g/L) | Lactic acid yield* (g/g) | Lactic acid productivity** (g/L.h) |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|--|
| 5 | 50.27±0.09 ^c | 4.61±0.20 ^{bc} | 0.54±0.02 ^c | 0.70±0.02 ^c |
| 10 | 57.76±1.35 ^b | 5.74±0.19 ^b | 0.60±0.01 ^b | 0.76±0.01 ^b |
| 15 | 64.94±0.51 ^a | 3.77±0.09 ^c | 0.68±0.01 ^a | 0.90±0.01 ^a |
| 20 | 66.56±1.31 ^a | 7.67±1.02 ^a | 0.69±0.01 ^a | 0.92±0.01 ^a |

Different superscript letters indicate significant differences between conditions in the same group.

*Based on total available sugar from OPS 40 g/L and OPT loadings at 10%;

$$Y_{p/s} = (P_i - P_0) / (S_{OPS} + S_{OPT}); S_{OPT} = \text{available sugar from OPT at 10\% based on cellulose content.}$$

**Overall rate of lactic acid production estimated at 96h.

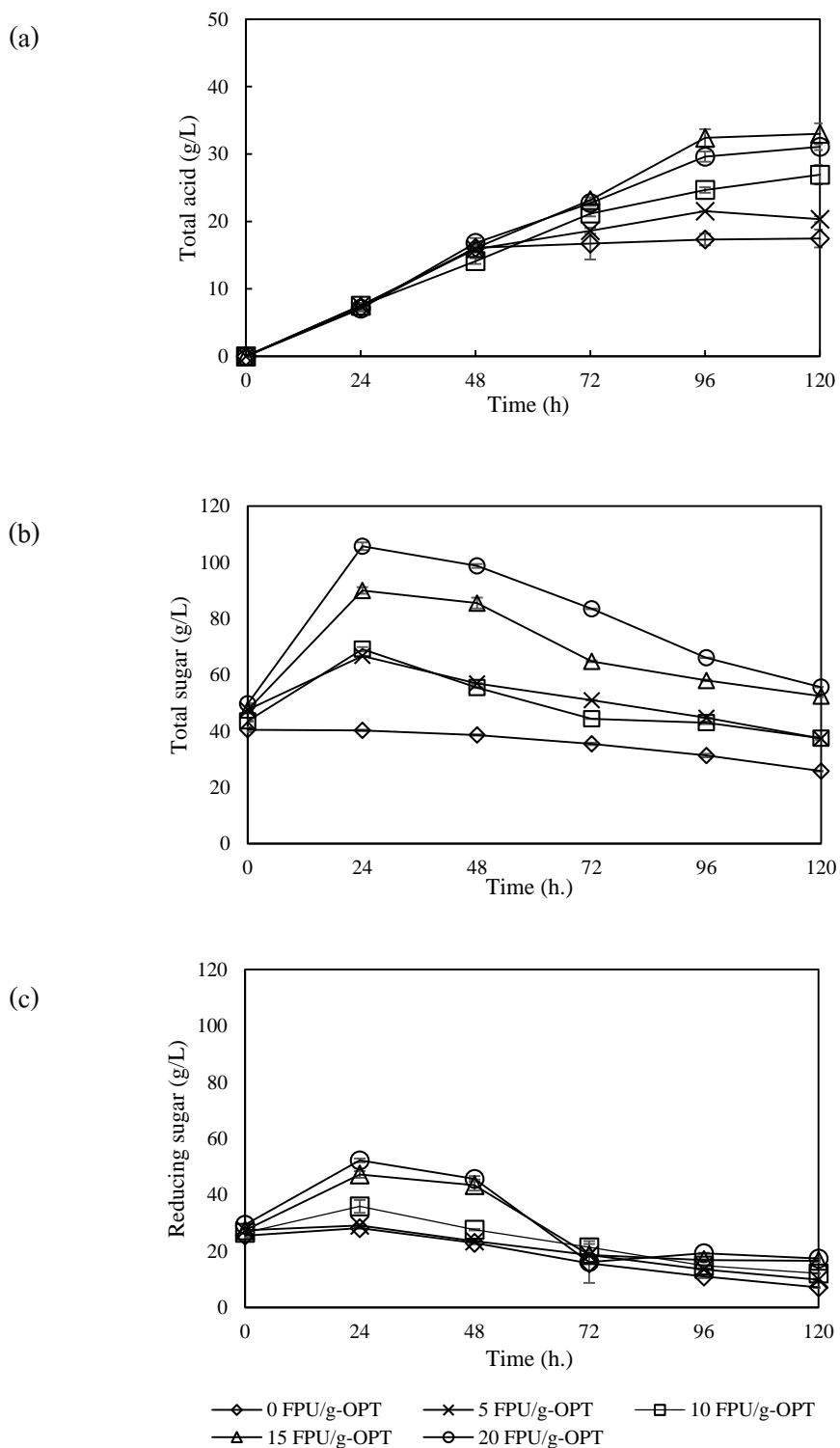


Figure 25 Effect of enzyme loading on lactic acid production from OPS and OPT through SSF by *L. kefir* KF1 (a) Total acid (g/L), (b) Total sugar (g/L) and (c) Reducing sugar (g/L).

Table 26 Effect of cellulase loading on LA production, yield and productivity from OPS and OPT through SSF by *L. kefir* KF1

| Enzyme loading (FPU/g-OPT) | Lactic acid (g/L) | Acetic acid (g/L) | Ethanol (g/L) | Lactic acid yield* (g/g) | Lactic acid Productivity** (g/L.h) |
|-------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------------|--|
| 5 | 18.28±0.84 ^c | 3.52±0.51 ^a | 6.39±0.19 ^b | 0.20±0.01 ^b | 0.25±0.01 ^c |
| 10 | 23.45±0.35 ^b | 4.61±0.21 ^a | 8.24±0.52 ^b | 0.31±0.06 ^a | 0.33±0.01 ^{bc} |
| 15 | 27.20±0.43 ^{ab} | 4.66±0.25 ^a | 12.15±1.00 ^a | 0.30±0.01 ^a | 0.38±0.03 ^{ab} |
| 20 | 30.45±2.35 ^a | 4.58±0.32 ^a | 12.52±0.93 ^a | 0.30±0.01 ^a | 0.42±0.03 ^a |

Different superscript letters indicate significant differences between conditions in the same group.

*Based on total available sugar from OPS 40 g/L and OPT loadings at 10%;

$Y_{p/s} = (P_i - P_0) / (S_{OPS} + S_{OPT})$; S_{OPT} = available sugar form OPT at 10% based on cellulose content.

**Overall rate of lactic acid production estimated at 96h.

4.3 การคำนวณต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นและกากลำต้นปาล์ม

กระบวนการผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์มน้ำมัน โดยลำต้นปาล์มน้ำมัน 1,600 กิโลกรัม สามารถคั้นน้ำออกมาได้ 752 กิโลกรัม และมีกากลำต้นปาล์มที่เหลือจากการคั้น 848 กิโลกรัม ทำแห้งโดยการผึ่งแดดจะสามารถลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการทำแห้งได้ ซึ่งในส่วนของน้ำคั้นลำต้นปาล์มมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 40 กรัมต่อลิตร เมื่อนำน้ำคั้นปริมาตร 1 ลิตร และกากลำต้นปาล์ม 100 กรัม มาเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 เพื่อผลิตกรดแลคติก ด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดแลคติกได้ประมาณ 65 กรัมต่อลิตร การคำนวณต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงใน Table 27 รวมต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.014 บาท คิดเป็นต้นทุนการผลิตกรดแลคติก 0.123 บาท ต่อกรัมของกรดแลคติก

Table 27 Medium cost of lactic acid from 1 L oil palm sap and 10% oil palm trunk through SSF

| Cost | List | Unit cost | Total cost (baht) |
|----------------------------------|------------------------|------------|----------------------|
| Chemicals | - NaOH 18 g | 59 baht/kg | 1.062 |
| | - Cellulase 15 mL | 450 baht/L | 6.750 |
| Materials | - Oil palm sap 1 L | 0.2 baht/L | 0.200 |
| | - Oil palm trunk 100 g | - | - |
| Total production cost for 65 g | | | 8.014 |
| Production cost of lactic acid/g | | | 0.123 |

* OPS (752 kg) and OPT (848 kg) calculated from labor cost at 150 baht/tree

4.4 การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักแบบกะช้า

โดยทั่วไปแล้วเมื่อแบคทีเรียแลคติกผลิตกรดแลคติกจะทำให้พีเอชของน้ำหมักลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงจุดที่พีเอชต่ำกว่าค่า pK_a ของกรดแลคติก การเจริญและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกจึงเริ่มลดลง ในกระบวนการผลิตกรดแลคติกจึงต้องมีการควบคุมพีเอช แต่อย่างไรก็ตามการควบคุมพีเอชเพื่อลดการยับยั้งการเจริญของเซลล์โดยกรดแลคติกสามารถทำได้ในระดับหนึ่ง เมื่อมีการสะสมของกรดแลคติกเพิ่มขึ้นอีกจะส่งผลให้แรงดันออสโมซิสภายในเซลล์เพิ่มขึ้นซึ่งจะทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโตในที่สุด (Cui *et al.*, 2016) ดังนั้นเพื่อลดผลการยับยั้งของกรดแลคติกต่อเซลล์แบคทีเรียในกระบวนการหมักจึงจำเป็นต้องแยกกรดแลคติกออก (Othman *et al.*, 2017) งานวิจัยนี้จึงใช้กระบวนการย่อยพร้อมการหมักแบบกะช้าในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตรและกากลำต้นเริ่มต้นร้อยละ 10 หลังการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการดึงน้ำหมักออกปริมาณร้อยละ 90 แล้วคงเชื้อส่วนหนึ่งไว้เป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักในกะต่อไป แล้วเติมน้ำคั้นลำต้นปาล์มน้ำมันที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 15 ฟิลเตอร์เปเปอร์ยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์มโดยไม่มีการเติมกากลำต้นปาล์มเพิ่ม โดยการหมักแบบกะช้าสามารถเพิ่มผลผลิตและมีข้อดีหลายประการเมื่อเทียบกับการหมักแบบกะเดียว ได้แก่ สามารถลดต้นทุนการเตรียมหัวเชื้อ สามารถลดระยะเวลาในการหมักได้เนื่องจากความเข้มข้นของเซลล์ที่สูงส่งผลให้สามารถเพิ่มอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ และสามารถลดการเกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ได้ (Dashti *et al.*, 2016) อีกทั้งยังสามารถใช้ประโยชน์กากลำต้นปาล์มอย่างคุ้มค่า

จากการทดลองการผลิตกรดแลกติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์มด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักแบบกะช้ำ โดยเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 26 พบว่าปริมาณกากลำต้นปาล์มลดลงต่ำกว่าร้อยละ 50 ในกะที่ 3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดในกะที่ 1 ในขณะที่กะที่ 2-5 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงซึ่งอาจเป็นผลมาจากการหมักแต่ละกะจะเติมเฉพาะน้ำคั้นลำต้นปาล์มและเอนไซม์เซลลูเลสโดยไม่มีการเติมกากลำต้นปาล์มลงไป ซึ่งปริมาณเซลลูโลสในกากลำต้นปาล์มที่ลดลงทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลในกะที่ 2-5 ต่ำกว่ากะที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณกากลำต้นปาล์ม ทำให้เชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ผลิตกรดทั้งหมดสูงสุดในกะที่ 1 และกะที่ 2 ในขณะที่กะที่ 3-5 เชื้อมีการผลิตกรดทั้งหมดลดลง เมื่อนำตัวอย่างหัวโม่งสุดท้ายของการหมักไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกโดย HPLC ผลการทดลองแสดงใน Table 28 พบว่าในกะที่ 1 *L. acidophilus* TISTR 1338 ผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติกได้เท่ากับ 63.05 ± 0.44 และ 4.42 ± 0.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.66 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อหมักต่อในกะที่ 2 พบว่ากรดแลกติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 71.41 ± 1.07 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.74 ± 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากในกะที่ 2 มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นสูงจึงทำให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเพิ่มสูงขึ้น (Dashfi *et al.*, 2016) และในกะที่ 3-5 พบว่าปริมาณกรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติกลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการลดลงของกากลำต้นปาล์มน้ำมันทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลง *L. acidophilus* TISTR 1338 จึงผลิตกรดแลกติกได้น้อยลง นอกจากนี้ยังเป็นผลมาจากการที่เซลล์แบคทีเรียมีกิจกรรมน้อยลงในระหว่างการหมักช้ำหลายรอบ อย่างไรก็ตามการผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักแบบกะช้ำสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยกากลำต้นปาล์มน้ำมันและผลิตกรดแลกติกได้ถึง 5 รอบการหมัก โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่าร้อยละ 80 จากกะที่ 1 ถึง กะที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tosungnoen และคณะ (2014) ที่ผลิตกรดแลกติกจากมันสำปะหลังด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักแบบกะช้ำ โดยพบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดในกะแรก หลังจากนั้นอัตราการผลิตกรดแลกติกเริ่มลดลงในกะที่ 2 ถึง กะที่ 5 นอกจากนี้ Okano และคณะ (2017) ที่ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากข้าวกล้องด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักแบบกะช้ำ โดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 ldhL1::amyA พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ถึง 10 รอบการหมัก โดยในแต่ละกะจะเติมสับสเตรทร้อยละ 20 และเอนไซม์ลงไปใหม่ พบว่ามีการผลิตกรดแลกติกในช่วง 118.4 - 129.8 กรัมต่อลิตร

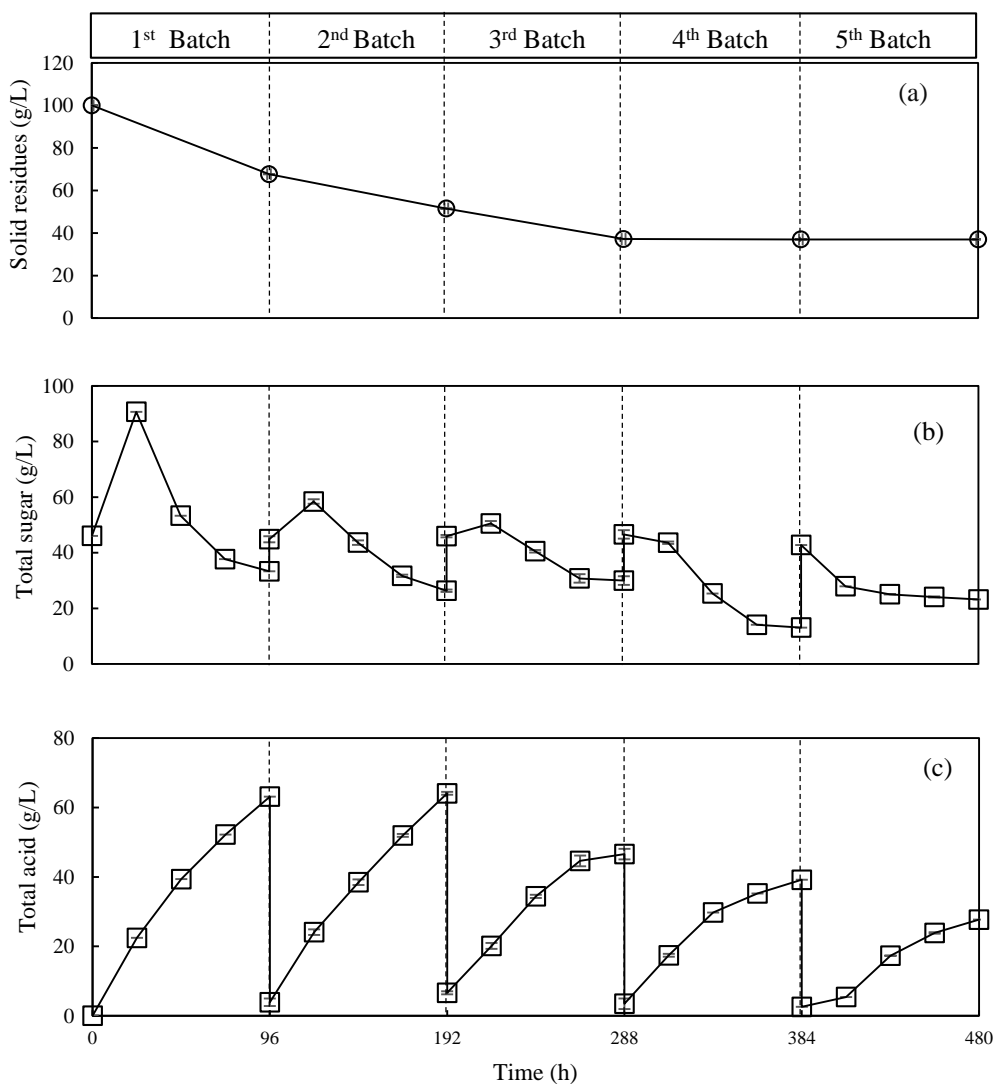


Figure 26 Repeated SSF of OPS and OPT by *L. acidophilus* TISTR 1338 using OPS with sugar concentration of 40 g/L, 10 % (w/v) OPT and 15 FPU/g cellulase loading of each batch. (a) Solid residues (g/L), (b) Total sugar (g/L) and (c) Total acid (g/L).

Table 28 Repeated SSF of OPS and OPT on LA production, yield and productivity by *L. acidophilus* TISTR 1338

| Batch number | Lactic acid (g/L) | Acetic acid (g/L) | Lactic acid productivity* (g/L.h) |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| 1 st | 63.05±0.44 ^c | 4.42±0.69 ^a | 0.66±0.00 ^c |
| 2 nd | 71.41±1.07 ^a | 4.46±0.08 ^a | 0.74±0.01 ^a |
| 3 rd | 67.21±1.71 ^b | 2.68±0.12 ^b | 0.70±0.01 ^b |
| 4 th | 56.21±1.67 ^d | 1.51±0.19 ^{bc} | 0.59±0.01 ^d |
| 5 th | 50.48±0.47 ^e | 1.22±0.15 ^d | 0.53±0.00 ^e |

Different superscript letters indicate significant differences between conditions in the same group.

*Overall rate of lactic acid production estimated at 96 h.

4.5 การผลิตกรดแลคติกแบบกะซ้ำในถังปฏิกรณ์ขนาด 1 ลิตร

จากการทดลองการผลิตกรดแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์มโดยใช้เชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ด้วยวิธีการย่อยพร้อมการหมักแบบกะซ้ำในถังปฏิกรณ์ขนาด 1.25 ลิตร ที่มีน้ำคั้นลำต้นปาล์มความเข้มข้นเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 ลิตร กากลำต้นปาล์มน้ำมันร้อยละ 10 และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่ากิจกรรม 15 ฟิลเตอร์เปอริยูนิตต่อกรัมกากลำต้นปาล์ม ในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 5 – 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 นอร์มอล หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ด้วยอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พบว่าการขยายขนาดการทดลองทำให้เชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ผลิตกรดแลคติกได้ 3 รอบการหมัก โดยให้ปริมาณกรดทั้งหมดในกะที่ 1 และกะที่ 2 ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และลดลงเล็กน้อยในกะที่ 3 ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ดังแสดงใน Figure 27 โดยปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้แต่ละรอบเท่ากับ 58.14±0.45, 58.14±0.45 และ 55.92±0.44 กรัมต่อลิตร และจากผลการทดลองดังแสดงใน Table 29 ในขณะที่อัตราการผลิตกรดแลคติกในกะที่ 1 ถึง กะที่ 3 มีค่าใกล้เคียงกันโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการขยายขนาดการทดลองเป็น 1 ลิตร ทำให้การผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ การผลิตกรดแลคติกขนาด 100 มิลลิลิตร เนื่องจากการขยายขนาดการทดลองเป็น 1 ลิตรนั้นจะใช้กากลำต้นปาล์ม 100 กรัมอาจทำให้การกวนผสมเกิดขึ้นได้ไม่ดีเท่าการทดลองขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่ง Qui และคณะ (2018) รายงาน

ว่าปริมาณสับสเตรทที่มากเกินไปจะส่งผลให้การผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ลดลงซึ่งเป็นผลมาจากข้อจำกัดการถ่ายโอนมวลในระบบ

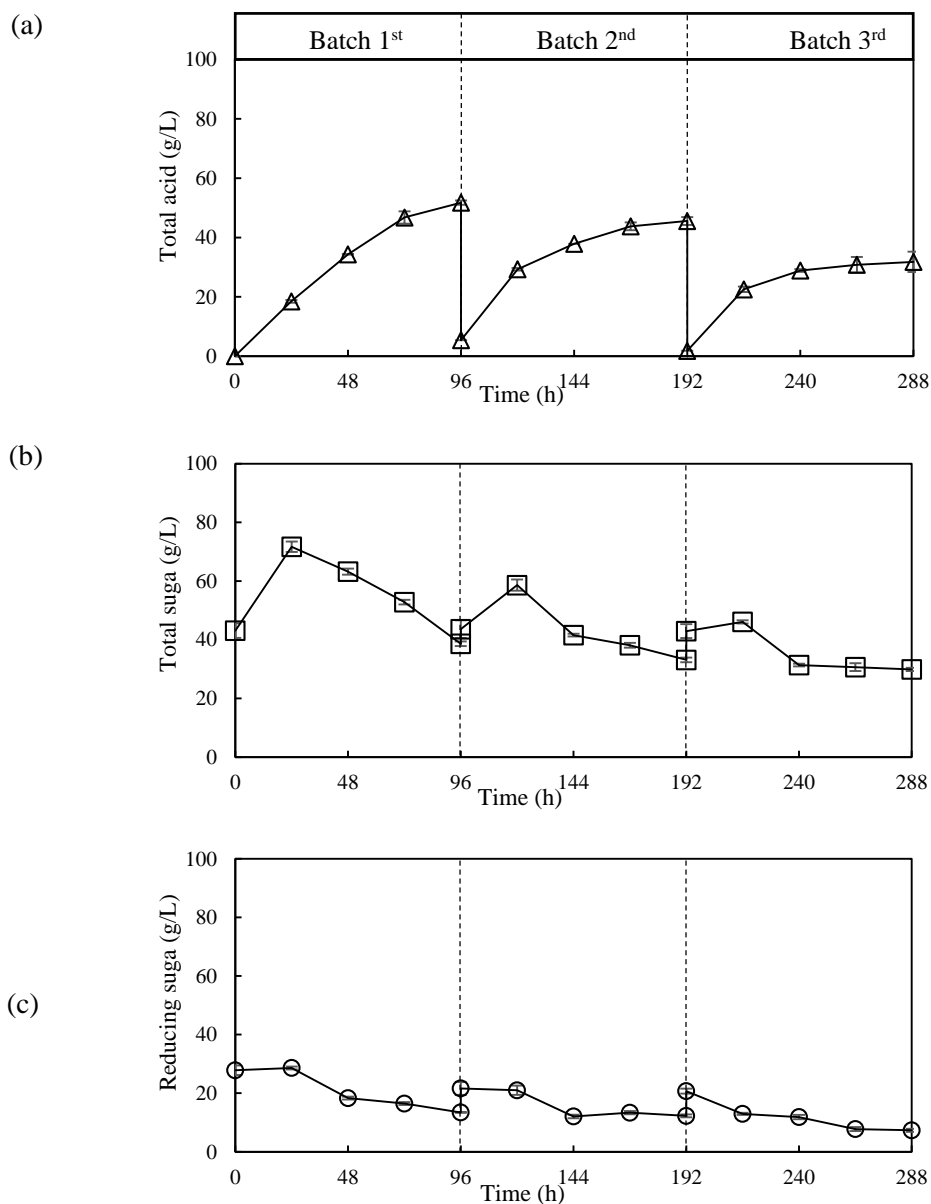


Figure 27 1 L of repeated-SSF of OPT fermentation by *L. acidophilus* TISTR 1338 at sap concentration of 40 g/L, 10 % (w/v) oil palm trunk loading and 15 FPU/g cellulase loading of each batch ; (a) Total acid (g/L), (b) Total suga (g/L) and (c) Reducing suga (g/L).

Table 29 Scale up to 1 L of the repeated-OPT of *L. acidophilus* TISTR 1338 cultivation in sap and oil palm trunk residues through SSF process detected by HPLC

| Batch number | Lactic acid (g/L) | Acetic acid (g/L) | LA productivity* (g/L/h) |
|-----------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|
| 1 st | 58.14±0.45 ^a | 4.70±0.21 ^a | 0.61±0.00 ^a |
| 2 nd | 58.72±1.17 ^a | 4.34±0.11 ^a | 0.61±0.01 ^a |
| 3 rd | 55.92±0.44 ^b | 1.91±0.50 ^b | 0.58±0.00 ^a |

Different superscript letters indicate significant differences between conditions in the same group.

*Overall rate of lactic acid production estimated at 96 h.

5. การเก็บเกี่ยวกรดแลกติกโดยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

5.1 การศึกษาผลของปริมาณเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

จากการทดลองแยกกรดแลกติกแบบกะ โดยใช้วิธีการดูดซับด้วยเรซินแลกเปลี่ยนประจุลบแบบเบสแก่ Amberlite IRA-402 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของสารละลายกรดแลกติก 100 กรัมต่อลิตร พีเอช 5 โดยใช้เรซินในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ 20, 10, 6.4 และ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 28 พบว่าการเพิ่มปริมาณเรซินจะทำให้ค่าการดูดซับกรดแลกติกเพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณเรซินร้อยละ 20 สามารถดูดซับกรดแลกติกได้สูงสุด คือ ร้อยละ 42.24 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ กนกอร ประยูรพันธ์ (2549) ที่ศึกษาผลของปริมาณเรซิน IRA-96 ซึ่งเป็นเรซินประจุลบแบบเบสอ่อนต่อจลนศาสตร์การดูดซับกรดแลกติก โดยพบว่าการเพิ่มปริมาณเรซินช่วยเพิ่มปริมาณการดูดซับและอัตราการดูดซับแต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณเรซินที่สูงเกินไปทำให้ประสิทธิภาพของเรซินลดลง ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกปริมาณเรซินที่ร้อยละ 20 ไปใช้ในการทดลองต่อไป

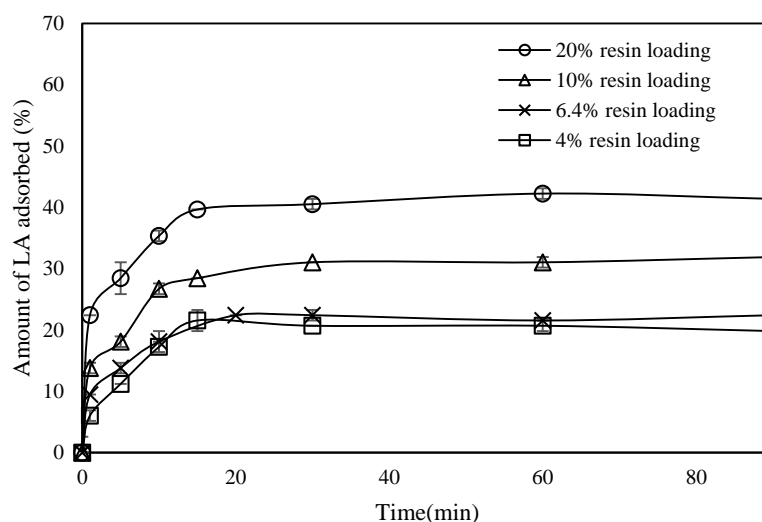


Figure 28 Batch adsorption of LA on anion exchange resin Amberlite IRA-402 at 30°C, 150 rpm.

Different resin amounts were added in 2.5 mL of 100 g/L lactic acid solution (pH 5).

5.2 การศึกษาไอโซเทอมการดูดซับของเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

ไอโซเทอมการดูดซับคือสมการทางคณิตศาสตร์ที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักของกรดแลกติกที่ถูกดูดซับต่อน้ำหนักของสารดูดซับหรือเรซิน ซึ่งจะบ่งบอกถึงความสามารถในการดูดซับของเรซินชนิดนั้นๆ (อิทธิชัย นพแก้ว, 2539) นอกจากนี้รูปร่างของไอโซเทอมจะบ่งบอกถึงลักษณะของกระบวนการดูดซับและปริมาณสารที่ถูกดูดซับบนพื้นผิวสารดูดซับ (Rouqurol *et al.*, 1999) ซึ่งไอโซเทอมที่นิยมใช้ในการอธิบายกระบวนการดูดซับโดยทั่วไปคือ ไอโซเทอมแบบ Langmuir และไอโซเทอมแบบ Freundlich โดยที่ไอโซเทอมแบบ Langmuir จะเป็นไอโซเทอมที่บ่งบอกว่าการดูดซับของโมเลกุลนั้นๆ เป็นการดูดซับแบบชั้นเดียวบนพื้นผิวของตัวดูดซับ ในขณะที่ไอโซเทอมแบบ Freundlich จะบ่งบอกถึงลักษณะการดูดซับของโมเลกุลนั้นๆ บนผิวตัวดูดซับเป็นแบบหลายชั้นที่ตัวถูกดูดซับเรียงซ้อนกันหลายชั้นด้วยพันธะอ่อนๆ (Zhang *et al.*, 2008) จากการศึกษาไอโซเทอมการดูดซับของเรซินแลกเปลี่ยนประจุลบแบบเบสแก่ Amberlite IRA-402 ที่ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่แตกต่างกัน คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดแลกติกเพิ่มขึ้นค่าการดูดซับกรดแลกติกของเรซินก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ดังแสดงใน Figure 29a เมื่อนำค่าการดูดซับในจุดที่เรซินอิ่มตัวของแต่ละความเข้มข้นมาพล็อตกราฟไอโซเทอม ดังแสดงใน Figure 29b พบว่ารูปร่างของไอโซเทอมที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกับไอโซเทอมแบบ Freundlich ซึ่งมีค่า $R^2=0.9851$ และไอโซเทอมแบบ Langmuir ที่มีค่า $R^2 = 0.9793$ (Figure 30) โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆของไอโซเทอมแบบ Langmuir และ Freundlich ดังแสดงใน Table 30 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าลักษณะการดูดซับกรดแลกติกของเรซิน Amberlite IRA-402 เป็นไปได้ว่าเป็นการดูดซับทั้งแบบชั้นเดียวและแบบหลายชั้นที่ตัวถูกดูดซับเรียงซ้อนกันหลายชั้นด้วยพันธะอ่อนๆ นอกจากนี้ผลการทดลองยังอธิบายได้ว่าในช่วงแรกเกิดการดูดซับได้น้อยและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแลกติกทำให้เกิดการดูดซับเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chooklin และคณะ (2011) ที่แยกกรดแลกติกโดยใช้เรซินแลกเปลี่ยนประจุลบแบบเบสแก่ Amberlite IRA-402 พบว่าลักษณะการดูดซับสามารถทำนายได้ดีด้วยไอโซเทอมแบบ Freundlich นอกจากนี้ Liu และคณะ (2013) รายงานว่าค่าคงที่ n ในสมการของไอโซเทอมแบบ Freundlich บ่งบอกถึงความสามารถในการดูดซับของเรซินโดยถ้ามีค่า n ในช่วง 1-15 แสดงว่าเรซินมีประสิทธิภาพในการดูดซับได้ดี ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าค่าคงที่ n ในไอโซเทอมแบบ Freundlich มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าเรซิน Amberlite IRA-402 มีความสามารถในการดูดซับได้ดี

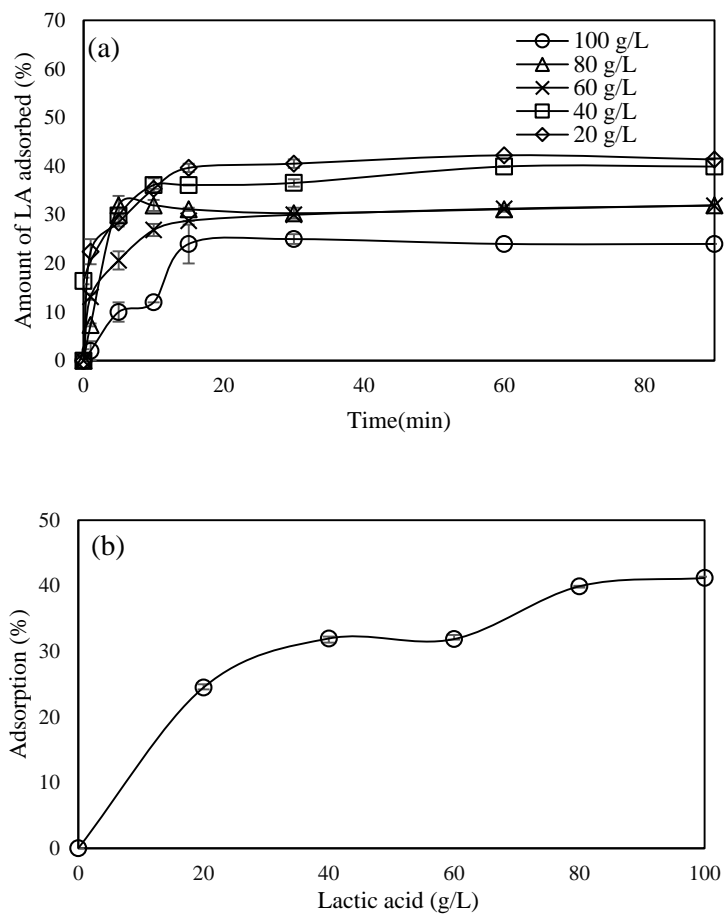


Figure 29 Adsorption equilibrium data of lactic acid on to Amberlite IRA-402 at 30 °C, pH 5 and 150 rpm. The resin of 20% loading added in LA solution with different LA concentrations (a), the adsorption isotherm at equilibrium (b).

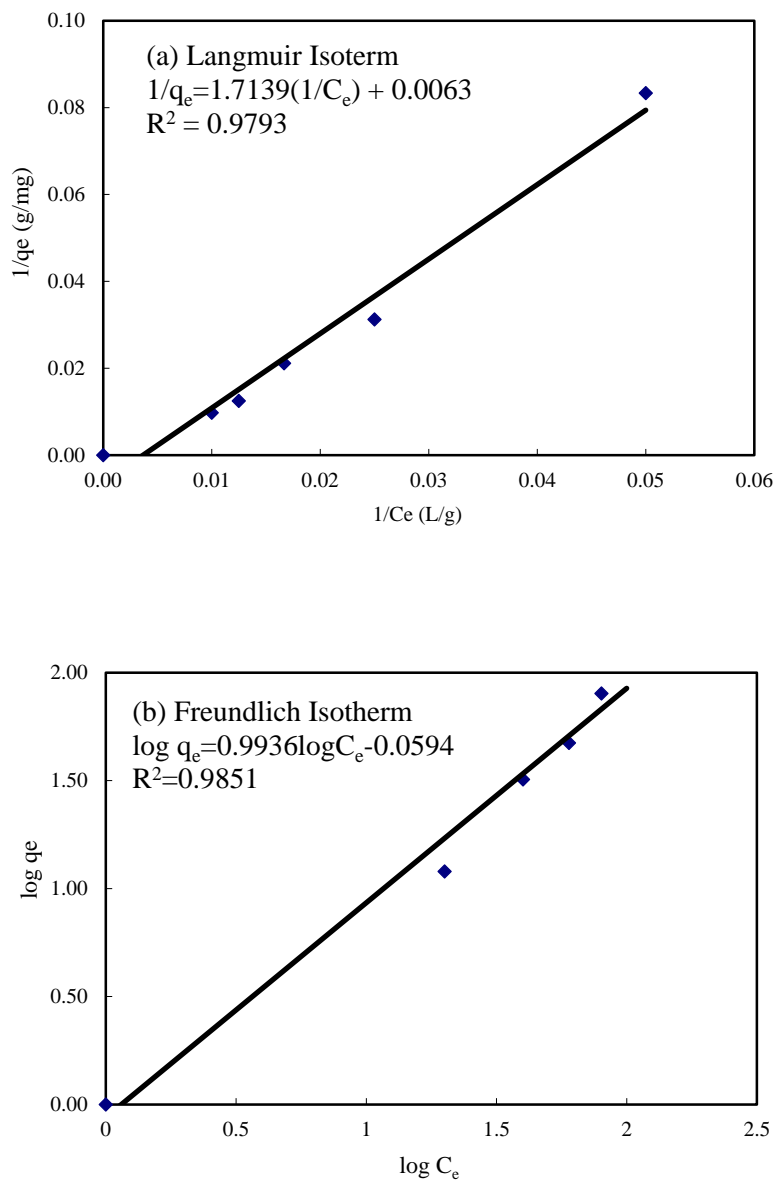


Figure 30 Adsorption isotherm of lactic acid on Amberlite IRA-400. (a) Langmuir and (b) Freundlich.

Table 30 Fitting parameters of model

| Langmuir model | k_L (mg/g) | a_L (L/mg) | R^2 |
|------------------|--------------|--------------|--------|
| | -158.73 | -3.68E-03 | 0.9793 |
| Freundlich model | k_F (mg/g) | $1/n$ (mg/L) | R^2 |
| | 1.14 | 0.9936 | 0.9851 |

5.3 การศึกษาการชะกรดแลคติกออกจากเรซิน

ในกระบวนการเก็บเกี่ยวกรดแลคติกโดยเรซินแลกเปลี่ยนประจุนี้้นนอกจากกระบวนการดูดซับแล้วกระบวนการคายซับก็มีความสำคัญเช่นกัน จากผลการทดลองในข้อ 5.2 พบว่าการดูดซับกรดแลคติกของเรซิน Amberlite IRA-402 จะอึดตัวที่ความเข้มข้นของกรดแลคติก 80 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำเรซินไปศึกษาการคายซับของกรดแลคติกโดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในการชะกรดแลคติกออกจากเรซิน ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 31 พบว่าสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ สามารถชะกรดแลคติกออกจากเรซินได้ร้อยละ 98.1 ภายในระยะเวลา 20 นาที ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ฐานภาวรินทร์ รำพาย (2558) ที่ศึกษาการเก็บเกี่ยวกรดแลคติกโดยวิธีการดูดซับด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออนแบบเบสแก่ Amberlite IRA-400 พบว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในการชะกรดแลคติกออกจากเรซินสามารถชะกรดแลคติกออกหมดภายในระยะเวลา 30 นาที

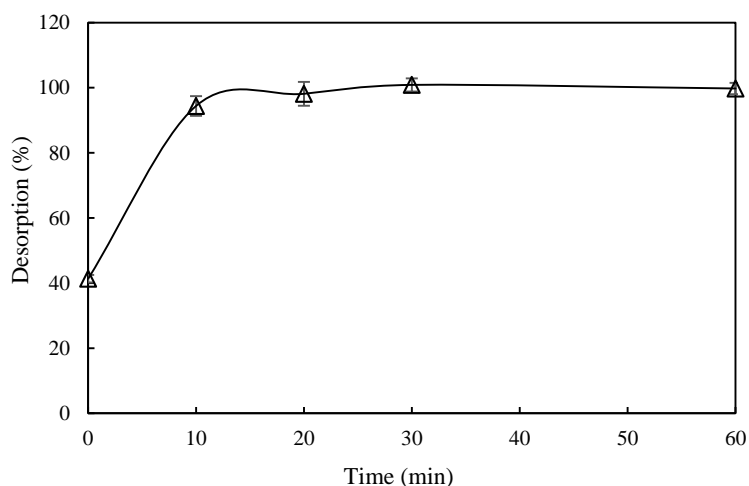


Figure 31 Desorption of lactate species from Amberlite IRA-402 resins. Equilibrated resins were soaked in 100 g/L solutions at the ratio of 0.5 g resin to 2.5 mL solution at 30 °C, 200 rpm.

5.4 การศึกษาการดูดซับและการชะกรดแลคติกผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเรซิน

จากการศึกษาไอโซเทอมการดูดซับกรดแลคติกของเรซิน Amberlite IRA-402 พบว่าค่าการดูดซับกรดแลคติกของเรซินเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้นของกรดแลคติก 80 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาการดูดซับสารละลายกรดแลคติกผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเรซินที่ความเข้มข้น 85 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยคอลัมน์ที่มีขนาด 1.0×46 เซนติเมตร บรรจุเรซิน 20 กรัม แล้วไหลคสารละลายกรดแลคติกลงคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าค่าการดูดซับกรดแลคติกจะคงที่ที่ร้อยละ 40 จนกระทั่งถึงจุดอิ่มตัวอัตราการดูดซับจึงเริ่มลดลง ดังแสดงใน Figure 32 หลังจากนั้นจึงทำการชะกรดแลคติกออกจากเรซินโดยการล้างด้วยน้ำก่อนแล้วตามด้วยการชะกรดแลคติกออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสารละลายกรดไฮโดรคลอริกสามารถชะกรดแลคติกได้หมด

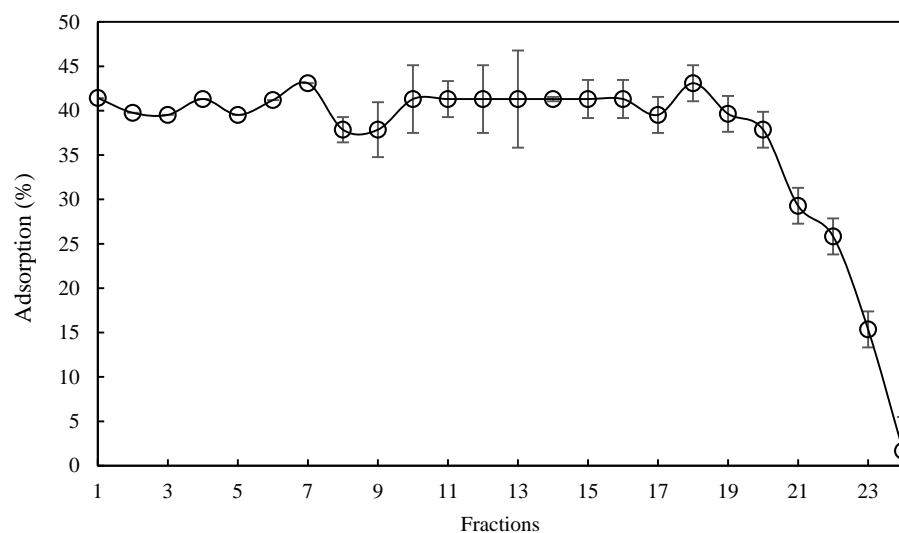


Figure 32 Column adsorption of LA solution of 85 g/L and pH 5.43 with flow rate 2.0 mL/min.

5.5 การศึกษาการเก็บเกี่ยวกรดแลคติกจากน้ำหมักผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเรซิน

น้ำหมักกรดแลคติกภายหลังจากการแยกเซลล์ออกมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้ม ดังแสดงใน Figure 33a และมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.3 ไปกำจัดสีด้วยถ่านกัมมันต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 ภายหลังจากการกำจัดสี พบว่าน้ำหมักกรดแลคติกมีสีใสขึ้น ดังแสดงใน Figure 33b ซึ่งการใช้ถ่านกัมมันต์ในการกำจัดสีนั้นมีผลทำให้กรดแลคติกและสารอินทรีย์อื่นๆ ในน้ำหมักลดลงด้วยเช่นกัน ดังแสดงใน Table 31 โดยกรดแลคติกมีความเข้มข้นลดลงประมาณร้อยละ 12 จากนั้นนำน้ำหมักกรดแลคติกที่มีความเข้มข้น 85.2 กรัมต่อลิตร มาศึกษาการดูดซับกรดแลคติกด้วยเรซินแบบกะ ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 34 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการดูดซับเพิ่มขึ้นทำให้ค่าการดูดซับเพิ่มขึ้น โดยมีค่าการดูดซับสูงสุดเท่ากับร้อยละ 35 และเมื่อทำการศึกษาการเก็บเกี่ยวกรดแลคติกจากน้ำหมักผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเรซิน Amberlite IRA-402 ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 35 พบว่าค่าการดูดซับกรดแลคติกอยู่ที่ร้อยละ 30-33 จนกระทั่งถึงจุดอิ่มตัวค่าการดูดซับจึงเริ่มลดลง และเมื่อชะกรดแลคติกออกจากเรซินด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ พบว่าสามารถชะกรดแลคติกได้ร้อยละ 98 (Table 32) โดยกรดอินทรีย์ที่หลุดออกจากเรซินประกอบด้วยกรดแลคติกและมีกรดอะซิติกเล็กน้อย (Figure 36) ซึ่งการเก็บเกี่ยวกรดแลคติกโดยเรซินแลกเปลี่ยนประจุสามารถดูดซับกรดแลคติกเฉลี่ยร้อยละ 24.5 และให้ผลการเก็บเกี่ยวเฉลี่ยร้อยละ 24.1 ดังแสดงใน Table 32 เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดซับกรดแลคติกจากน้ำหมักกับจากสารละลายกรดแลคติกมาตรฐานที่ความเข้มข้นเดียวกันทั้งการดูดซับแบบกะและการดูดซับผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเรซิน พบว่าค่าการดูดซับของกรดแลคติกในน้ำหมักมีค่าน้อยกว่าเนื่องจากในน้ำหมักนั้นมีองค์ประกอบของอินทรีย์ที่ซับซ้อนมากกว่าในสารละลายกรดแลคติกมาตรฐานจนทำให้เกิดการแย่งจับกับเรซินระหว่างกรดแลคติกและองค์ประกอบอื่นๆ (กนกอร ประชุมพันธ์, 2549)

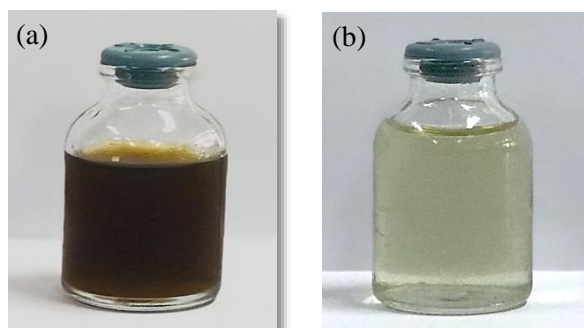


Figure 33 Fermentation broth before (a) and after (b) decolorization by 4% activated carbon.

Table 31 Characteristics of fermentation broth before and after decolorization

| Major organic acid in fermentation broth | Before decolorization | After decolorization | % Loss |
|--|-----------------------|----------------------|--------|
| Lactic acid (g/L) | 97.5±0.82 | 85.2±0.41 | 12.6 |
| Acetic acid (g/L) | 5.97±0.22 | 3.73±0.61 | 37.5 |
| pH | 5.34±0.06 | 5.31±0.02 | 0.56 |
| Total sugar (g/L) | 40.7±0.58 | 31.7±1.34 | 22.1 |

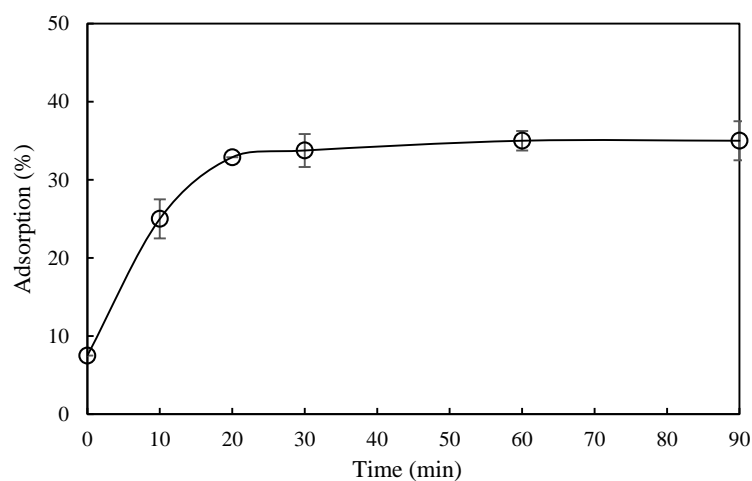


Figure 34 Batch adsorption of lactic acid from fermentation broth.

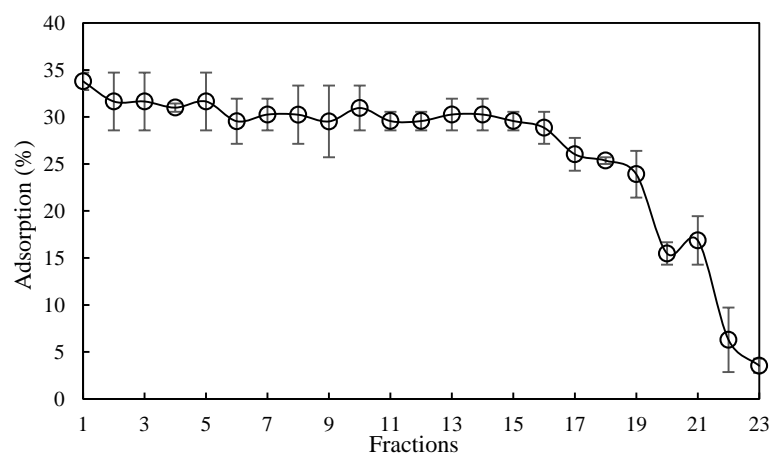


Figure 35 Column adsorption of lactic acid from fermentation broth.

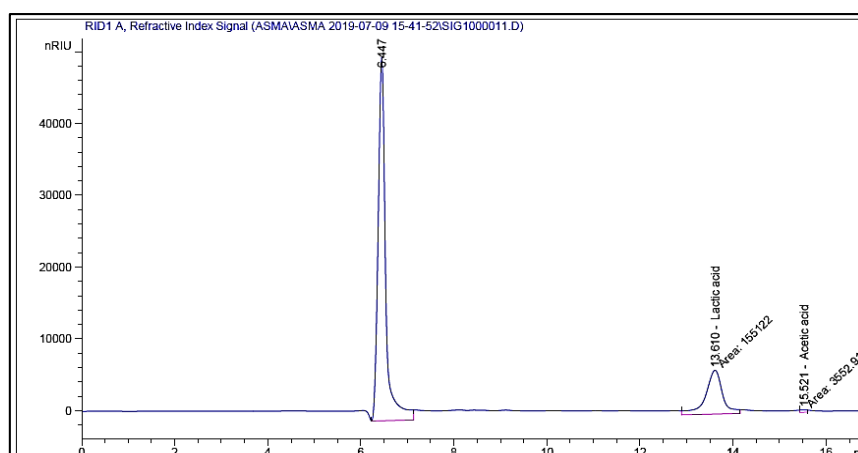


Figure 36 Chromatogram of desorption of lactic acid from saturated lactic acid on resins.

Table 32 Column separation of organic acid from fermentation broth

| Parameters | (%) |
|---------------------------------|-----------|
| Average adsorption ^a | 24.5±1.06 |
| Average desorption ^b | 98.2±0.17 |
| Average recovery ^c | 24.1±0.47 |

^aAverage adsorption (%) = amount of LA adsorbed onto resin/amount of loaded LA×100.

^bAverage desorption (%) = amount of LA desorbed into the elution/amount of LA adsorbed onto resin×100.

^cAverage recovery (%) = collected LA/amount of loaded LA×100.

6. การประยุกต์ใช้ผงลำต้นปาล์มน้ำมันในการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลส

6.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของผงไม้ลำต้นปาล์ม

ลำต้นปาล์มน้ำมันจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อส่วนต่อลำเลียง OPT-VB และผงลำต้นปาล์ม OPT-PA โดยที่ส่วนของ OPT-VB จะมีลักษณะเป็นเส้นใยในขณะที่ส่วน OPT-PA จะมีลักษณะเป็นผงละเอียด เมื่อนำตัวอย่างผงไม้ไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 500 เท่า พบว่าเนื้อเยื่อส่วน OPT-VB จะมีลักษณะเป็นผิวเรียบและมีเม็ดซิลิกา (silica body) ฝังตัวอยู่ และมีส่วนของเซลล์พารังกมาเกาะอยู่รอบนอก ดังแสดงใน Figure 37b และ 37d ส่วนเนื้อเยื่อ OPT-PA เมื่อนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 200 เท่า จะเห็นได้ว่าผงไม้ OPT-PA มีลักษณะเป็นรูพรุน ดังแสดงใน Figure 37a และ 37c ซึ่งเอนไซม์สามารถผ่านเข้าสู่รูพรุนของผงไม้ OPT-PA ได้จึงเป็นคุณลักษณะที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวพองสำหรับการผลิตเอนไซม์ตรึงรูปได้ ซึ่งวัสดุที่มีคุณสมบัติเป็นรูพรุนนี้จะทำให้เอนไซม์สามารถเคลื่อนที่ได้ง่ายและถูกตรึงอยู่ภายในรูพรุน (Buntic *et al.*, 2018)

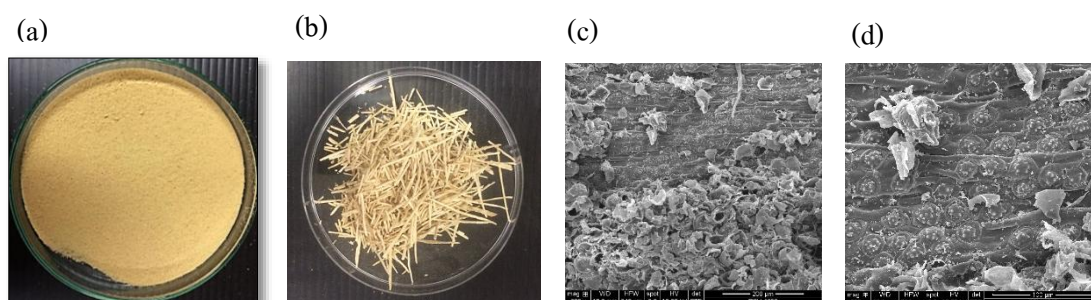


Figure 37 Fiber surface of oil palm wood (a): vascular bundle (OPT-VB), (b): SEM image of vascular bundle (OPT-VB) (500X), (c): parenchyma cell (OPT-PA), (d): SEM image of parenchyma) (OPT-PA) (200X).

6.2 การศึกษาการตรึงเอนไซม์เซลลูเลสบนผงลำต้นปาล์ม

จากการทดลองตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสบนตัวพองผงลำต้นปาล์ม (OPT-PA) ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสอิสระเริ่มต้น 1000 ยูนิตต่อกรัมตัวพอง พบว่า การตรึงเอนไซม์เซลลูเลสบนตัวพอง OPT-PA ให้ค่า Immobilized yield ร้อยละ 79.06 และ Immobilized efficiency ร้อยละ 100 จะเห็นได้ว่าตัวพอง OPT-PA มีความสามารถในการตรึงรูปเอนไซม์ โดย Mubarak และคณะ (2014) รายงานว่าในระหว่างกระบวนการตรึง

เอนไซม์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพจะอาศัยแรงดึงดูดทางไอออน พันธะไฮโดรเจน แรงไฮโดรโฟบิกและแรงแวนเดอร์วาลส์ ระหว่างตัวพุงกับเอนไซม์ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรึงรูปโดยวิธีเชื่อมไขว้ทางเคมีพบว่า การตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพสามารถทำได้ง่ายกว่า เนื่องจากไม่จำเป็นต้องปรับสภาพของตัวพุงด้วยสารเคมีก่อนซึ่งอาจจะมีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมได้ จากงานวิจัยของ Buntic และคณะ (2018) ที่ศึกษาการตรึงเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้กากกาแฟโดยเปรียบเทียบวิธีการตรึงโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพและการเชื่อมไขว้ทางเคมีโดยใช้กลูตารอลดีไฮด์ คลอรีนไดออกไซด์ และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ พบว่าค่า Immobilized yield ของวิธีการดูดซับทางกายภาพสูงกว่าการตรึงโดยใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นสารเชื่อมไขว้ แต่มีค่าใกล้เคียงกับการเชื่อมไขว้โดยกลูตารอลดีไฮด์และคลอรีนไดออกไซด์ ในขณะที่ Zhu และ คณะ (2018) ศึกษาการตรึงเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้ไบโอชาร์ (biochar) ที่ผลิตจากลิกโนเซลลูโลสเป็นตัวพุง โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ พบว่าไบโอชาร์มีพื้นที่ผิวเท่ากับ 413.7 ตารางเมตรต่อกรัม ปริมาตรรูพรุนเท่ากับ 0.480 ตารางเซนติเมตรต่อกรัม และมีขนาดรูพรุนเท่ากับ 9.5 นาโนเมตร และเนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 3-7 นาโนเมตร จึงสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ตัวพุงและถูกตรึงไว้ภายในรูพรุน และเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีกิจกรรมที่สูงกว่าเอนไซม์อิสระ

6.3 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูป

6.3.1 การศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูป

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสอิสระที่พีเอชที่แตกต่างกัน คือ 3, 4, 5, 5.5, 6, 7 และ 8 โดยใช้ซิเตรทบัฟเฟอร์ในช่วงพีเอช 3-6 และเปลี่ยนเป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 6-8 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 38 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสอิสระมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) สูงในช่วงพีเอช 4-6 โดยเอนไซม์เซลลูเลสอิสระที่พีเอช 5 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุด ในขณะที่กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปสูงสุดที่พีเอช 5 และค่อนข้างคงที่ทางพีเอช 5.5 ซึ่งอาจเกิดจากการตรึงรูปมีผลต่อโครงสร้างและบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้เกิดความต่างต่อความคงตัวของพีเอช (Ahmed *et al.*, 2017) อย่างไรก็ตามพีเอชที่เหมาะสมต่อทั้งเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสอิสระยังเป็นพีเอช 5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu และคณะ (2018) ที่ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปบนไบโอชาร์และเอนไซม์เซลลูเลสอิสระ พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 5 เป็นพีเอชที่มีค่า

กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์สูงสุด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ahmed และคณะ (2017) ที่ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปบน PAA nanogel และเอนไซม์เซลลูเลสอิสระพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปและเอนไซม์เซลลูเลสอิสระมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 5

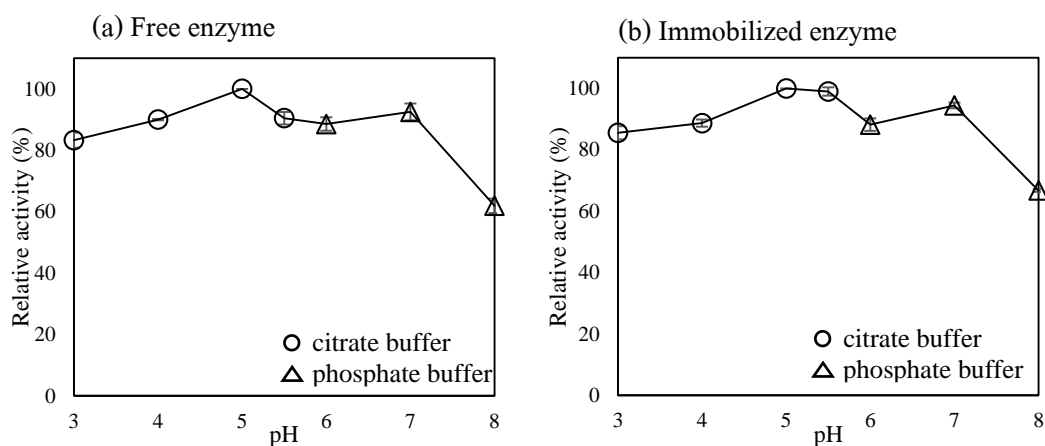


Figure 38 Effect of pH on immobilized cellulase and free cellulase at different pH of 3, 4, 5, 5.5, 6 and 7 incubated at 50°C for 10 min; (a) free enzyme (b) immobilized enzyme.

6.3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูป

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปและเอนไซม์เซลลูเลสอิสระ ที่พีเอช 5 โดยบ่มในอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 39 พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปและเอนไซม์เซลลูเลสอิสระมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดร้อยละ 100 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเริ่มสูญเสียกิจกรรมเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส โดยค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปและเอนไซม์เซลลูเลสอิสระลดลงเหลือร้อยละ 83 และร้อยละ 81 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเสถียรภาพของโปรตีนเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปฏิสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มในโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำลายจึงนำไปสู่การสูญเสียการทำงานของเอนไซม์ (Zhao *et al.*, 2006) เช่นเดียวกับการทดลองของ Zhu และคณะ (2018) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปบนไบโอโอสอาร์และเอนไซม์เซลลูเลสอิสระ โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่มีกิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดและ กิจกรรมสัมพัทธ์ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส

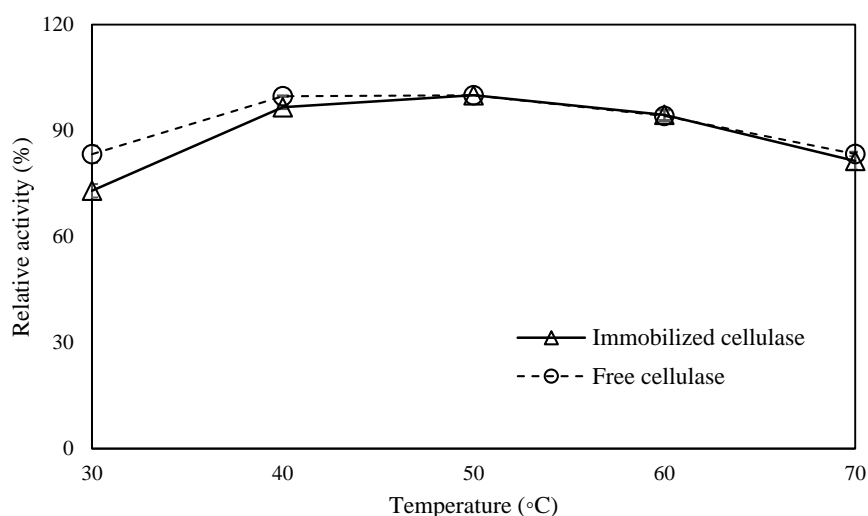


Figure 39 Effect of temperature on immobilized cellulase and free cellulase at pH 5 incubated at with different temperature of 30, 40, 50 60 and 70 °C.

6.3.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูป

จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปโดยการนำเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปมาบ่มที่อุณหภูมิ 50 และ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสอิสระที่บ่มในสภาวะเดียวกัน พบว่าการบ่มเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปและเอนไซม์เซลลูเลสอิสระที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที ทำให้กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปลดลงเหลือร้อยละ 83.83 และเอนไซม์เซลลูเลสอิสระลดลงเหลือร้อยละ 76.7 ดังแสดงใน Figure 40a และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเวลาในการบ่ม 30 นาที ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 79.39 และเมื่อบ่มต่อจนถึง 180 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 52.58 ในขณะที่ในการบ่มเป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์เซลลูเลสอิสระมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ลดลงเหลือร้อยละ 49.23 และ ร้อยละ 13.77 ที่ระยะเวลาในการบ่ม 180 นาที ดังแสดงใน Figure 40b จะเห็นได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปมีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มากกว่าเอนไซม์เซลลูเลสอิสระ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kirupa และคณะ (2018) ที่พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปร่วมกับเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสและเอนไซม์แลคเคสโดยวิธีห่อหุ้มด้วยอัลจินต์มีความคงตัวทางความร้อนที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส มากกว่าเอนไซม์อิสระ โดยเอนไซม์ตรังรูปยังคงสามารถรักษากิจกรรมสัมพัทธ์ได้มากกว่าร้อยละ 80 ที่ระยะเวลาการบ่ม 180 นาที และงานวิจัยของ Zdarta และคณะ (2017) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปบน TiO₂-lignin hybrid material มีความคง

ตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มากกว่าเอนไซม์เซลลูเลสอิสระและยังคงค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ไว้ถึงร้อยละ 75 ที่ระยะเวลาการบ่ม 180 นาที และเมื่อพิจารณาอัตราการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์หรือค่า k_d ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสของเอนไซม์เซลลูเลสอิสระและเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูป ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 38c พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูป k_d เท่ากับ 0.003 ต่อนาที ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสอิสระมีค่า k_d เท่ากับ 0.011 ต่อนาที จะเห็นได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสอิสระมีค่า k_d ที่มากกว่าเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูป นั้นแสดงว่าเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปมีความคงตัวทางความร้อนมากกว่าเอนไซม์เซลลูเลสอิสระ

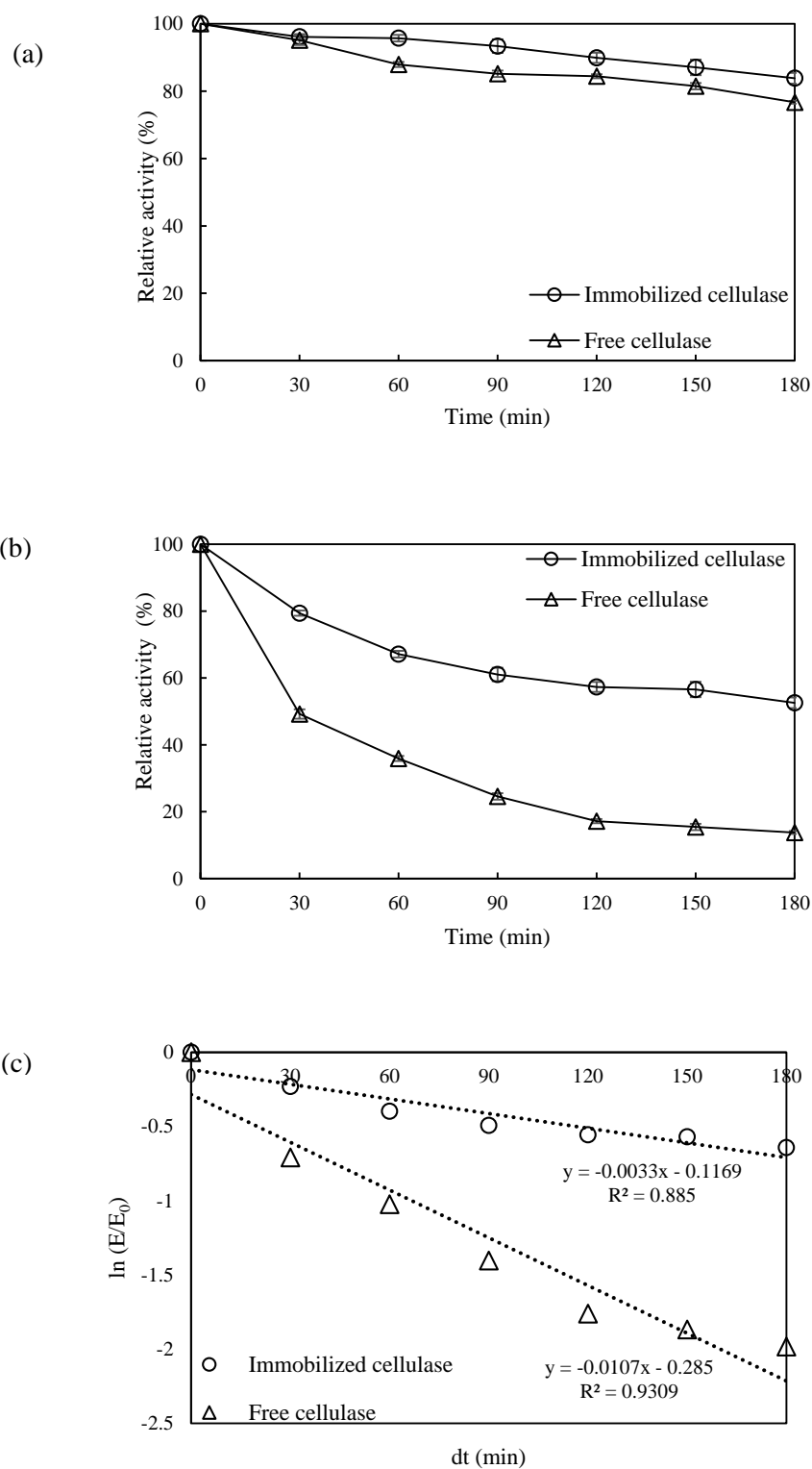


Figure 40 Thermal stability of free and immobilized cellulase after incubation for 3 h at (a) 37°C (b) 50°C and (c) k_d determination at 50°C.

6.3.4 การศึกษาการนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงรูป

จากการศึกษาความสามารถในการนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูป พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ตรึงบนตัวพวงงวงไม้เมื่อมีการใช้ซ้ำ 4 รอบ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงจากร้อยละ 100 ลดลงเหลือเพียงประมาณร้อยละ 55 ดังแสดงใน Figure 41 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่เอนไซม์เซลลูเลสถูกปลดปล่อยออกจากตัวพวงงวงในระหว่างการใช้ซ้ำทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมและวิธีการเก็บเกี่ยว โดยการปั่นเหวี่ยงซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสหลุดออกจากตัวพวงงวงเช่นกัน Abdel-Naby (1998) รายงานว่าการตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพจะอาศัยแรงดึงดูดทางไอออน พันธะไฮโดรเจน แรงแบบไฮโดรโฟบิกและแรงแวนเดอร์วาลส์ซึ่งเป็นแรงดึงดูดค่อนข้างอ่อน ไม่มีการเกิดพันธะเคมีทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวพวงงวงได้ง่าย ซึ่งในงานวิจัยของ Zhu และคณะ (2018) ที่ศึกษาการตรึงเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ไบโอชาร์เป็นตัวพวงงวงโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ พบว่าเมื่อมีการใช้ซ้ำ 5 รอบ กิจกรรมของเอนไซม์จากร้อยละ 100 ลดลงเหลือร้อยละ 74.8 ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เอนไซม์หลุดออกจากตัวพวงงวง และจากรายงานของ Ahmed และคณะ (2017) ที่ศึกษาการตรึงเอนไซม์เซลลูเลสบนพอลิเมอร์ Poly acrylic acid (PAA) nanogel โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ เมื่อใช้ซ้ำไปเพียง 3 รอบ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงจากร้อยละ 100 ลดลงเหลือประมาณร้อยละ 80 เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสถูกปลดปล่อยออกจาก PAA นาโนเจลเช่นกันในระหว่างการใช้ซ้ำทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรม เช่นเดียวกับรายงานของ Kirupa และคณะ (2018) ที่ตรึงเอนไซม์ร่วมระหว่างแลคเคส เซลลูเลส และเบต้ากลูโคซิเดสโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยอัลจินต พบว่าเมื่อใช้ซ้ำ 4 รอบ กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 80 และเมื่อใช้ซ้ำ 6 รอบ กิจกรรมเอนไซม์ลดลงต่ำกว่าร้อยละ 60 ซึ่งเป็นผลจากการรั่วไหลของเอนไซม์ออกจากตัวพวงงวง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Ladole และคณะ (2017) ที่ตรึงเอนไซม์เซลลูเลสบนอนุภาคแม่เหล็กและมีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมด้วยในการตรึงเอนไซม์ซึ่งพบว่าสามารถใช้ซ้ำได้ถึง 6 ครั้ง ค่ากิจกรรมจึงลดลงเหลือร้อยละ 80 ดังนั้นเพื่อลดการสูญเสียของเอนไซม์เซลลูเลสในระหว่างการทำปฏิกิริยาอาจจะทำได้โดยใช้สารเชื่อมโยงไว้เพื่อป้องกันเอนไซม์หลุดออกจากตัวพวงงวง หรือผสมผสานวิธีการตรึงร่วมกับตัวพวงงวงที่เป็นอนุภาคแม่เหล็กอาจเป็นประโยชน์ต่อเสถียรภาพและกิจกรรมของเอนไซม์รวมไปถึงความง่ายในการเก็บเกี่ยว

อย่างไรก็ตามกระบวนการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสโดยทั่วไปจะใช้ตัวพวงงวงที่แตกต่างกัน ทั้งตัวพวงงวงที่มีคุณสมบัติละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ที่ต้องผ่านกระบวนการทำให้เกิดรูพรุนก่อน ซึ่งจะเป็นการเพิ่มต้นทุนของกระบวนการด้วยเช่นกัน (Sinegani *et al.*, 2012) แต่การประยุกต์ใช้วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่มีความเป็นรูพรุนอยู่แล้ว เช่น ฝงไม้ลำต้นปาล์ม มาใช้เป็นตัวพวงงวงสำหรับตรึงรูปเอนไซม์ สามารถลดขั้นตอนการทำให้เกิดรูพรุนได้ และเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือ

ลำต้นปาล์มน้ำมันอย่างคุ้มค่า นอกจากนี้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของผงไม้ลำต้นปาล์มในการทดลองที่ 1 พบว่า ผงไม้ลำต้นปาล์มมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักถึงร้อยละ 37 ถ้านำเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปด้วยผงไม้ลำต้นปาล์ม ไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตสารเมตาบอไลต์ต่างๆ จากวัสดุลิกโนเซลลูโลสอาจทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นได้

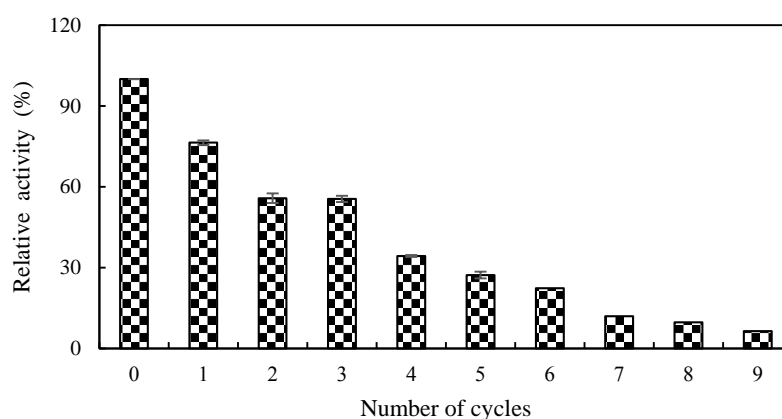


Figure 41 Reusability study of immobilized cellulase.

6.3.5 การศึกษาผลของการเก็บรักษาของเอนไซม์ตรังรูป

จากการศึกษาการเก็บรักษาของเอนไซม์เซลลูเลสที่ตรังรูปบนผงไม้จากลำต้นปาล์มโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ เปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสอิสระ ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดัง Figure 42 พบว่าจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 10 สัปดาห์ เอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปยังคงมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงถึงร้อยละ 77.75 ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสอิสระที่มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 73.63 จะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมสัมพัทธ์คงเหลือของเอนไซม์เซลลูเลสตรังรูปและเอนไซม์เซลลูเลสอิสระมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนั้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ เกิดขึ้นได้ช้าจึงทำให้ช่วยลดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ลงได้

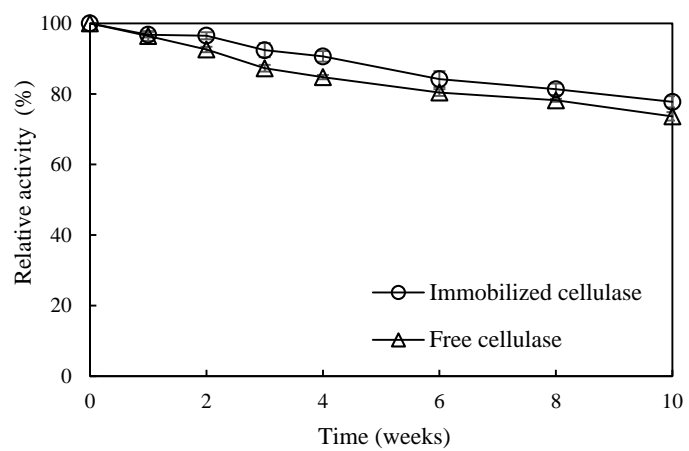


Figure 42 Storage stability of immobilized cellulase for 10 weeks at 4°C.

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

จากการทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและคีเฟอร์เกรน ได้แบคทีเรียแลคติกจากทั้ง 2 แหล่งทั้งหมด 34 ไอโซเลท จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตกรดทั้งหมดได้สูงเบื้องต้นจาก 34 ไอโซเลท และแบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ 3 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338, *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985 พบสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอลเป็นหลัก 4 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338, *Lactobacillus casei*, ไอโซเลทรหัส F16 และ ไอโซเลทรหัส F19 ซึ่งมีความบริสุทธิ์เชิงแสง (optical purity) มากกว่าร้อยละ 60 และพบสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลักมี 2 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985 และ ไอโซเลทรหัส KF1 ซึ่งมีความบริสุทธิ์เชิงแสงมากกว่าร้อยละ 70 จากนั้นนำแบคทีเรียแลคติกที่ยังไม่ทราบสายพันธุ์ คือ ไอโซเลทรหัส KF1, F16 และ F19 ไปจัดจำแนกสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่า แบคทีเรียแลคติกไอโซเลท KF1 มีลำดับเบสที่เหมือนกับ *Lactobacillus kefir* ร้อยละ 99.93 จึงจัดจำแนกเป็น *Lactobacillus kefir* KF1 ส่วนแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท F16 และ F19 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Lactobacillus paracasei* R094 ร้อยละ 100 จึงจัดจำแนกเป็น *Lactobacillus paracasei* F16

จากการนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 สายพันธุ์มาเลี้ยงในน้ำคั้นลำต้นปาล์มและศึกษาผลของการควบคุมพีเอช พบว่าการควบคุมพีเอชที่ 5.5 ตลอดการทดลองทำให้เชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 ที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์แอลเป็นหลัก ผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 21.98 กรัมต่อลิตร และ *L. kefir* KF1 ที่ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ดีเป็นหลัก ผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุดเท่ากับ 19.31 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก จากน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์มโดยวิธีการย่อยพร้อมการหมัก พบว่าปริมาณกากลำต้นปาล์มร้อยละ 10 และการเติมเอนไซม์เซลลูเลส 15 ฟิเตอร์เปปเปอร์ยูนิตต่อกรัมเป็นสภาวะที่ผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 64.9 ± 0.51 และ 27.2 ± 0.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้การหมักแบบกะซ้าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ถึง 5 รอบการหมัก โดยปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ในช่วง 50-71 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาการเก็บเกี่ยวกรดแลคติกโดยเรซินแลกเปลี่ยนประจุ Amberlite IRA-402 พบว่าไอโซโทมการดูดซับสามารถทำนายได้ดีด้วยแบบจำลองแบบ Freundlich และเมื่อทำการเก็บเกี่ยวกรดแลคติกจากน้ำหมักผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเรซิน พบว่าการใช้เรซินปริมาณร้อยละ 20 สามารถ

เก็บเกี่ยวกรดแลคติกจากน้ำหมักสูงสุด และการชะกรดแลคติกจากเรซินด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ให้ผลการเก็บเกี่ยวเท่ากับร้อยละ 24.1

นอกจากนี้ยังพบว่าผงถ้ำต้นปาล์ม (OPT-PA) สามารถใช้เป็นตัวพองสำหรับตรึงเอนไซม์ เซลลูเลส ที่ให้ประสิทธิภาพการตรึงร้อยละ 79.06 และมีความคงตัวทางความร้อนที่สูงกว่าเอนไซม์ เซลลูเลสอิสระ

ข้อเสนอแนะ

1. ในกระบวนการผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีการย่อยด้วยการหมัก จากการทดลองจะมีน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่เชื้อไม่สามารถใช้ได้ควรหาวิธีการแยกและวิเคราะห์องค์ประกอบเพื่อนำกลับมาใช้ประโยชน์ต่อ
2. กากถ้ำต้นปาล์มน้ำมันที่เหลือจากการทดลองการผลิตกรดแลคติกแบบกะจะ้าจะเป็นกากถ้ำต้นปาล์มที่เซลลูโลสถูกย่อยหมดแล้ว ซึ่งองค์ประกอบหลักจะเป็นกลุ่มของเฮมิเซลลูโลสสามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่อได้โดยการย่อยต่อด้วยเอนไซม์ไซลานเนสเพื่อผลิตเป็นสารเมตาบอไลซ์อื่นๆ เช่น น้ำตาลไซโลส ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ หรือไซลิตอล
3. การเก็บเกี่ยวกรดแลคติกด้วยเรซินแลกเปลี่ยนประจุ Amberlite IRA-402 สามารถเก็บเกี่ยวกรดแลคติกจากน้ำหมักได้สูงสุดร้อยละ 30 ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวกรดแลคติกจากน้ำหมักได้หมดโดยการทดลองไหลตัวอย่างในเรซินอย่างต่อเนื่อง 3-4 คอลัมน์ไปพร้อมๆกัน
4. เรซินภายหลังจากการเก็บเกี่ยวกรดแลคติกควรศึกษาการใช้ซ้ำต่อว่าสามารถใช้ได้สูงสุดกี่รอบ เพื่อความคุ้มค่าของต้นทุน

เอกสารอ้างอิง

- กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. สถิติการเกษตรของประเทศ ไทย ปี 2552 [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อ 15 ตุลาคม 2560 เข้าถึงได้จาก https://www.moac.go.th/ewt_news.php?nid=13824
- กนกอร ประยูรพันธ์. 2549. การประเมินค่าพารามิเตอร์พื้นฐานของการดูดซับกรดแลคติกด้วยเรซินแบบเบสอ่อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี. มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.
- จตุพร ปานทอง. 2557. การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุในกระบวนการปรับสภาพและย่อยเส้นใยปาล์มด้วยเอนไซม์เพื่อการผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิศวกรรมเคมี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ฐานภวารินทร์ รำพาย. 2558. การหมักควบคู่กับการแยกกรดแลคติกโดยการแลกเปลี่ยนไอออน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ณัฐฐิยา วัฒนกิจจานุกูล. 2552. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากทะเลาะปาล์มเปล่าโดยใช้การย่อยสลายร่วมกับการหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นิธิยา รัตนานพนธ์ และ พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2560. Cellulose / เซลลูโลส [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อ 15 ตุลาคม 2560 เข้าถึงได้จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0612/Cellulose>.
- บุษกร อุดรรักษาดี. 2548. บทความทางวิชาการ เรื่อง แบบที่เรียกกรดแลคติก วารสารวิทยาศาสตร์ ทักษิณ ปีที่ 2 ฉบับที่ 2. (ออนไลน์) สืบค้นจาก: vlib.stkc.go.th/bitstream/handle/.pdf (1 กันยายน 2560).
- เบญจวรรณ ชิตมณี. 2534. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยใช้เชื้อราที่แยกได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พูนสุข ประเสริฐสรทรัพย์. 2542. การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. คณะวิศวกรรมศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- ยุทธศักดิ์ สุบการี. 2552. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเส้นใยปาล์มโดยใช้วิธี Silmultaneous saccharification and fermentation (SSF). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สมพงษ์ โอทอง และอิสรา เรืองแสง. 2552. การพัฒนากระบวนการผลิตพลังงานชีวภาพจากลำต้นปาล์มอย่างมีประสิทธิภาพ. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง.
- สมคิด ดีจิ่ง และ อรุณี คงดี. 2555. การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยตรง เพื่อลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพ. รายงานผลการวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- สมใจ สิริโชค. 2544. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ศูนย์หนังสือกรุงเทพ.
- สาโรจน์ สิริสันตนิยกุล, วรสิทธิ์ โตจำปา และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2544. วิศวกรรมเคมีชีวภาพ พื้นฐาน 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สุณิษา พลรักษ์. 2557. การผลิตกรดแลคติกจากเชื้อรา *Rhizopus* sp. โดยวิธีการหมักแบบแข็งบนเปลือกมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุภามิต ชุกกลิ่น. 2553. ศักยภาพการใช้ของน้ำตาลโตนดและน้ำบีบแกนในปาล์มน้ำมันสำหรับผลิตกรดแลคติกโดย *Lactobacillus casei* TISTR 1500. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาเคมี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วรรณภา ขงสุวรรณไพศาล. 2546. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวัสดุเศษทิ้งจากกล้วยโดย *Aspergillus niger*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- อรรณู หันพงษ์กิตติกุล. 2556. เทคโนโลยีเอนไซม์. 2560. พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้าที่ 247-260. สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- อภิชัย นพแก้ว. 2539. การใช้ถ่านกัมมันต์ในการดูดติดผิวโลหะหนักจากน้ำชะมูลฝอยที่ผ่านบ่อเก็บกัก. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. ๕ คณะวิศวกรรมศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อภิชาติ บุญทาวัน. 2551. การเก็บเกี่ยวกรด L-แลคติกจากน้ำหมักด้วยระบบอิเล็กโตรไดออนไนเซชัน.
- อิสรา โกมลเกียรติ. 2556. การคัดเลือกแบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอะซิโตน บิวโนล เอทานอลจากลำต้นปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

- ไชยวัฒน์ นพเก้า. 2553. การศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะการหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยแบคทีเรียกรดแลคติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., and Sonomoto, K. 2011. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *J. Biotechnol.* 56: 286-301.
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., and Sonomoto, K. 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol. Adv.* 31: 877-902.
- Abdel-Naby, M. A., Ismail, A. S., Ahmed, S. A., and Fattah, A. F. A. 1998. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. *Bioresour. Technol.* 64(3): 205-210.
- Adachi, E., Torigoe, M., Sugiyama, M., Nikawa, J. I., and Shimizu, K. 1998. Modification of Metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. *J. Ferment. Bioeng.* 86: 284-289.
- Ahmed, I. N., Chang, R., and Tsai, W. B. 2017. Poly (acrylic acid) nanogel as a substrate for cellulase immobilization for hydrolysis of cellulose. *Colloid. Surface. B.* 152: 339-343.
- Amoa-Awua, W. K., Sampson, E., and Tano-Debrah, K. 2007. Growth of yeasts, lactic and acetic acid bacteria in palm wine during tapping and fermentation from felled oil palm. *Elaeis guineensis* in Ghana. *J. Appl. Microbiol.* 102 (2): 599-606.
- A.O.A.C. 1990. Method 973. 18, fiber (acid detergent) and lignin in animal feed. Arlington. In: Official method of analysis of AOAC international. 16th ed.: 28-29.
- A.O.A.C. 2000. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17th. Ed. The Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Arslan, S. 2015. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CyTA. J. Food.* 13(3): 340-345.
- Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria Classification and Physiology in Lactic Acid Bacteria; Microbiology and Functional Aspects. (Salminen, S. and Wright A.V. eds.) p. 1-72.

- Bilal, M., Iqbal, H. M., Hu, H., Wang, W., and Zhang, X. 2017. Enhanced bio-catalytic performance and dye degradation potential of chitosan-encapsulated horseradish peroxidase in a packed bed reactor system. *Sci. Total Environ.* 575: 1352-1360.
- Boonsawang, P., Subkaree, Y., and Srinorakutara, T. 2012. Ethanol production from palm pressed fiber by prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation (SSF). *Biomass. Bioenerg.* 40: 127-132.
- Boontawan, P., Kanchanathawee, S., and Boontawan, A. 2011. Extractive fermentation of L-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using electrodeionization (EDI) technique. *Biochem. Eng. J.* 54(3): 192-199.
- BuntiĆ, A., PavloviĆ, M., AntonoviĆ, D., PavloviĆ, V., VrućiniĆ, D., Šiler-MarinkoviĆ, S., and DimitrijeviĆ-BrankoviĆ, S. 2018. Customizing the spent coffee for *Trichoderma reesei* cellulase immobilization by modification with activating agents. *Int. J. Biol. Macromol.* 107: 1856-1863.
- Cao, X., Yun, H. S., and Koo, Y. M. 2002. Recovery of L-(+)-lactic acid by anion exchange resin Amberlite IRA-400. *Biochem. Eng. J.* 11(2-3): 189-196.
- Cao, Y. and Tan, H. 2002. Effect of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydr. Res.* 337: 1291-1296.
- Carr, F. J., Chill, D., and Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28(4): 281-370.
- Cheirsilp, B., Shimizu, H., and Shioya, S. 2003. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 100(1): 43-53.
- Cingadi, S., Srikanth, K., Arun, E. V. R., and Sivaprakasam, S. 2015. Statistical optimization of cassava fibrous waste hydrolysis by response surface methodology and use of hydrolysate based media for the production of optically pure d-lactic acid. *Biochem. Eng. J.* 102: 82-90.
- Chen, C., Boldor, D., Aita, G., and Walker, M. 2012. Ethanol production from sorghum by a microwave-assisted dilute ammonia pretreatment. *Bioresour. Technol.* 110: 190-197.
- Chooklin, S., Kaewsichan, L., and Kaewsrichan, J. 2013. Potential use of oil palm sap on lactic acid production and product adsorption on Dowex™ 66 resin as adsorbent. *Asia-Pacific J. Chem. Eng.* 8(1): 23-31.

- Cui, S., Zhao, J., Zhang, H., and Chen, W. 2016. High-density culture of *Lactobacillus plantarum* coupled with a lactic acid removal system with anion-exchange resins. *Biochem. Eng. J.* 115: 80–84.
- 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., and Henry, M. 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies a review. *Bioresour. Technol.* 81: 1119–1129.
- Datta, S., Christena, L. R., and Rajaram, Y. R. S. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.* 3(1): 1-9.
- Djukić-Vuković, A. P., Jokić, B. M., Kocić-Tanackov, S. D., Pejin, J. D., and Mojović, L. V. 2016. Mg-modified zeolite as a carrier for *Lactobacillus rhamnosus* in L (+) lactic acid production on distillery wastewater. *J. Taiwan. Ins. Chem. E.* 59: 262-266.
- Dey, P., and Pal, P. 2012. Direct production of L (+) lactic acid in a continuous and fully membrane-integrated hybrid reactor system under non-neutralizing conditions. *J. Membrane. Sci.* 389: 355–362.
- De Figueroa, R. M., Oliver, G., and de Cádiz, I. B. 2001. Influence of temperature on flavour compound production from citrate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Microbiol Res.* 155(4): 257-262.
- Egüés, I., Eceiza, A., and Labidi, J. 2013. Effect of different hemicelluloses characteristics on film forming properties. *Ind. Crop. Prod.* 47: 331-338.
- Garrote G.L., Serradell M.A., Abraham A.G., Añón M.C., Fossati C.A., de Antoni G.L. 2005. Development of an immunochemical method to detect *Lactobacillus kefir*. *Food Agric. Immunol.* 16(3): 221–233.
- Ge, X. Y., Qian, H., and Zhang, W. G. 2010. Enhancement of L-lactic acid production in *Lactobacillus casei* from Jerusalem artichoke tubers by kinetic optimization and citrate metabolism. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(1): 101-109.
- Geankoplis, C.J. 1995. *Transport Process and Unit Operations*, 3rd edition. Prentice-Hall International, Inc., Singapore.

- Geankoplis, C.J. 2004. Transport Process and separation process principles (includes unit operation) 4th edition. Prentice-Hall International. Inc. India.
- Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activity. *Pure and Appl. Chem.* 59: 257-268.
- Gullón, B., Alonso, J. L., and Parajó, J. C. 2010. Ion-exchange processing of fermentation media containing lactic acid and oligomeric saccharides. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49(8): 3741-3750.
- Guyot, J. P., Calderon, M., and Morlon-Guyot, J. 2000. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. *J. Appl. Microbiol.* 88: 176-182.
- Hama, S., Mizuno, S., Kihara, M., Tanaka, T., Ogino, C., Noda, H., and Kondo, A. 2015. Production of D-lactic acid from hardwood pulp by mechanical milling followed by simultaneous saccharification and fermentation using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. *Bioresour. Technol.* 187: 167-172.
- Hashim, R., Said, N., Lamaming, J., Baskaran, M., Sulaiman, O., Sato, M. and Sugimoto, T. 2011. Influence of press temperature on the properties of binderless particleboard made from oil palm trunk. *Mater. Design.* 32(5): 2520-2525.
- Hetényi, K., Gál, K., Németh, Á., and Sevela, B. 2010. Use of sweet sorghum juice for lactic acid fermentation: preliminary steps in a process optimization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85: 872-877.
- Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 87-107.
- Holzappel, W.H. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75: 197-212.
- Hu, J., Lin, Y., Zhang, Z., Xiang, T., Mei, Y., Zhao, S., Liang, Y., and Peng, N. 2016. High-titer lactic acid production by *Lactobacillus pentosus* FL0421 from corn stover using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresour. Technol.* 214: 74-80
- Iwasawa, S., Ueda, M., Miyata, N., Hirota, T., and Ahiko, K. 1982. Identification and fermentation character of kefir yeast. *Agr. Biol. Chem.* 46: 2631-2636.
- Iyer, P. V., and Lee, Y. Y. 1999. Product inhibition in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose into lactic acid. *Biotechnol. Lett.* 21: 371-373.

- Jesionowski, T., Zdarta, J., and Krajewska, B. 2014. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*. 20(5-6): 801-821.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., and Pandey, A. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 524-534.
- Jeong, D., Kim, D. H., Kang, I. B., Kim, H., Song, K. Y., Kim, H. S., and Seo, K. H. 2017. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control*. 78: 436-442.
- Kosugi, A., Tanaka, R., Magara, K., Murata, Y., Arai, T., Sulaiman, O., Rokiah, H., Zubaidah, A. A. H., Mohd, K. A. Y., Mohd, N. M. Y., Wan, A. I., and Yutaka, M. 2010. Ethanol and lactic acid production using sap squeezed from old oil palm trunks felled for replanting. *J. Biosci. Bioeng.* 110: 322-325.
- Ladole, M. R., Mevada, J. S., and Pandit, A. B. 2017. Ultrasonic hyperactivation of cellulase immobilized on magnetic nanoparticles. *Bioresour. Technol.* 239: 117-126.
- Lee, E. G. 1998. Recovery of lactic acid from fermentation broth using electrodialysis. Doctoral dissertation. PhD Thesis. Department of Chemical Engineering. Korea Advanced Institute of Science and Technology.
- Leite, A. M. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M. F., Mayo, B. and Delgado S. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *J. Dairy Sci.* 98:3622–3632.
- Li, J., Sun, J., Wu, B., and He, B. 2017. Combined utilization of nutrients and sugar derived from wheat bran for d-Lactate fermentation by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5. *Bioresour. Technol.* 229: 33-38.
- Lui, 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, S. Q. 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 115-131.
- Liu, B., Ouyang, J., Yuan, X., Wang, L., and Zhao, B. 2013. Adsorption properties and preparative separation of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by use of macroporous resins. *J. Chromatogr. B.* 937: 84-90.

- Liu, G., Sun, J., Zhang, J., Tu, Y., and Bao, J. 2015. High titer l-lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen plus modeling. *Bioresour. Technol.* 198: 803-810.
- Lokesh B. E., Hamid Z. A. A., Arai T., Kosugi A., Murata Y., Hashim R., and Sudesh K. 2012. Potential of oil palm trunk sap as a novel inexpensive renewable carbon feedstock for polyhydroxyalkanoate biosynthesis and as a bacterial growth medium. *Clean. Soil. Air. Water.* 40(3): 310-317.
- Lunt, J. 1998. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polym. Degrad. Stabil.* 59: 145-152.
- Manel, Z., Nedja, K., Moktar, H., and Ali, F. 2011. Microbiological analysis and screening of lactic acid bacteria from Tunisian date palm sap. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5: 2929-2935.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., and de Souza Oliveira, R. P. 2013. Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 30: 70-83.
- Mercel Dekker, Inc. New York. Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., and Ramakrishnan, S. 2011. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Res.* 1: 1-17.
- Meussen, B. J., de Graaff, L. H., Sanders, J. P., and Weusthuis, R. A. 2012. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *App. Microbiol. Biot.* 94(4): 875-886.
- Miguel, M.G.P.C., Cardoso, P.G., Lago, L.A., and Schwan, R.F. 2010. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Res. Int.* 43: 1523-1528.
- Min, D. J., Choi, K. H., Chang, Y. K., and Kim, J. H. 2011. Effect of operating parameters on precipitation for recovery of lactic acid from calcium lactate fermentation broth. *Korean J. Chem. Eng.* 28: 1969.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.* 31: 426-428.

- Moldes, A. B., Alonso, J. L., and Parajo, J. C. 2003. Recovery of lactic acid from simultaneous saccharification and fermentation media using anion exchange resins. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 25(6): 357-363.
- Mubarak, N. M., Wong, J. R., Tan, K. W., Sahu, J. N., Abdullah, E. C., Jayakumar, N. S., and Ganesan, P. 2014. Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 107: 124-131.
- Murray, R.M., Li, Z., and Sastry, S.S. 1994. Determination and Cytological Light Microscopy. In *Method for General and Molecular Bacteriological*. (Murray, R.E.G., Wood, W.A. and Krieg, N.R., eds.) p. 21-41. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Mancilha, I. M., and Roberto, I. C. 2008. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *Biochem. Eng. J.* 40(3): 437-444.
- Nurul Nadia Ummira Abu Bakkar. 2011. Isolation of microorganism from oil palm sap. Master of Chemical Engineering. University Malaysia Pahang.
- Narayanan, N., Roychoudhury, PK. And Srivastava, A. 2004. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electron. J. Biotechnol.* 7: 167-175.
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F., Shigematsu, T., Morimura, S., and Kida, K. 2002. Influence of broth exchange ratio on bacterial cellulose production by repeated batch culture. *Process Biochem.* 38: 41-47.
- Noparat, P., Prasertsan, P., Sompong, O., and Pan, X. 2017. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose for enzymatic hydrolysis of oil palm trunk. *Energy Procedia.* 138: 1122-1127.
- Nguyen, C. M., Kim, J. S., Nguyen, T. N., Kim, S. K., Choi, G. J., Choi, Y. H., and Kim, J. C. 2013. Production of L-and D-lactic acid from waste *Curcuma longa* biomass through simultaneous saccharification and cofermentation. *Bioresour. Technol.* 146: 35-43.
- Nguyen, T. Y., Cai, C. M., Osman, O., Kumar, R., and Wyman, C. E. 2016. CELF pretreatment of corn stover boosts ethanol titers and yields from high solids SSF with low enzyme loadings. *Green. Chem.* 18(6): 1581-1589.

- Okafor, N. 1978. Microbiology and biochemistry of oil-palm wine. *Adv. App. Microbiol.* 24: 237-256.
- Okano, K., Hama, S., Kihara, M., Noda, H., Tanaka, T., and Kondo, A. 2017. Production of optically pure d-lactic acid from brown rice using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(5): 1869-1875.
- 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.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., and Lidén, G. 2008. A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol. Biofuels.* 1(1): 7.
- Oliveira, R. A., Komesu, A., Rossell, C. E. V., and Maciel Filho, R. 2018. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design From economic to production aspects. *Biochem. Eng. J.* 133: 219-239.
- Othman, M., Ariff, A. B., Rios-Solis, L., and Halim, M. 2017. Extractive fermentation of lactic acid in lactic acid bacteria cultivation: A review. *Front. Microbiol.* 8: 2285.
- Ouoba, L., Kando, C., Parkouda, C., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., and Sutherland, J. P. 2012. The microbiology of Bandji, palm wine of *Borassus akeassii* from Burkina Faso: identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 113 (6): 1428-1444.
- Pan, L., Hu, X. and Wang, X. 2011. Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. *Food Control.* 22: 1316-1321.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G. 2002. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial derivative of animal fat in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 308-312.
- Parte, A.C. 2014. LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 42: 613-616.
- Patel, A., Shah, N., Ambalam, P., Prajapati, J.B., Holst, O. and Ljungh, A. 2013. Antimicrobial profile of lactic acid bacteria isolated from vegetable and indigenous fermented food of India against clinical pathogens using microdilution method. *Biomed. Environ. Sci.* 26: 759-764.

- Prawitwong, P., Kosugi, A., Arai, T., Deng, L., Lee, K. C., Ibrahim, D., and Ibrahim, W. A. B. 2012. Efficient ethanol production from separated parenchyma and vascular bundle of oil palm trunk. *Bioresour. Technol.* 125: 37-42.
- Piskin, E., Tuncle, A., Denizil, A., Demkbas, E. B., Ayhan, H., Cicek, H. and Xu, K. 1994. Non-degradable and biodegradable polymeric particles: Preparation and some selected biomedical application. American Chemical Society, Washington, DC. Chapter. 12: 302-330.
- Pauley, P. M., and Emmers-Sommer, T. M. 2007. The impact of internet technologies on primary and secondary romantic relationship development. *Communication studies.* 58: 411-427.
- Pleissner, D., Demichelis, F., Mariano, S., Fiore, S., Gutiérrez, I. M. N., Schneider, R., and Venus, J. 2017. Direct production of lactic acid based on simultaneous saccharification and fermentation of mixed restaurant food waste. *J. Clean. Prod.* 143: 615-623.
- Qiu, J., Tian, D., Shen, F., Hu, J., Zeng, Y., Yang, G., and Zhang, J. 2018. Bioethanol production from wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) pretreatment via simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at high solid loadings. *Bioresour. Technol.* 268: 355-362.
- Reddy, L. V., Kim, Y. M., Yun, J. S., Ryu, H. W., and Wee, Y. J. (2016). l-Lactic acid production by combined utilization of agricultural bioresources as renewable and economical substrates through batch and repeated-batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Bioresour. Technol.* 209: 187-194.
- Rouquerol, J., Rouquerol, F., Llewellyn, P., Maurin, G., and Sing, K. S. 2013. Adsorption by powders and porous solids: principles, methodology and applications. Academic press.
- Roberto, I. C., Mussatto, S. I., Fernandes, M., and Mancilha, I. M. 2008. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *Biochem. Eng. J.* 40: 437-444.
- Sankar, M. K., Ravikumar, R., Kumar, M. N., and Sivakumar, U. 2018. Development of co-immobilized tri-enzyme biocatalytic system for one-pot pretreatment of four different perennial lignocellulosic biomass and evaluation of their bioethanol production potential. *Bioresour. Technol.* 269: 227-236.

- Scouten, W. H., Luong, J. H., and Brown, R. S. 1995. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends. Biotechnol.* 13(5): 178-185.
- Shen, Q., Yang, R., Hua, X., Ye, F., Zhang, W., and Zhao, W. 2011. Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization. *Process Biochem.* 46(8): 1565-1571.
- Shi, S., Li, J., and Blersch, D. M. 2018. Utilization of solid catfish manure waste as carbon and nutrient source for lactic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(11): 4765-4772.
- Silverstein, R.A. 2004. A Comparison of Chemical Pretreatment Method for Converting Cotton Stalks to Ethanol. M.S. Thesis, North Carolina State University.
- Sinegani, A. A. S., and Sinegani, M. S. 2012. The effects of carbonates removal on adsorption, immobilization and activity of cellulase in a calcareous soil. *Geoderma.* 173: 145-151.
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., and Srivastava, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 32: 713-728.
- Sun, Y., Chang, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production : a review. *Bioresour. Technol.* 83: 1-11.
- Sun, Y., Li, Y. L. and Bai, S. 1999. Modelling of continuous L(+) lactic acid production with immobilized *Rhizopus oryzae* in an airlift bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 3: 87-90.
- Tejayadi, S., and Cheryan, M. 1995. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *App. Microbiol. Biotechnol.* 43: 242-248.
- Thang, V. H., and Novalin, S. 2008. Green Biorefinery: Separation of lactic acid from grass silage juice by chromatography using neutral polymeric resin. *Bioresour. Technol.* 99(10): 4368-4379.
- Thomas, TD. 1987. Acetate production from lactate and citrate by non-starter bacteria in Cheddar cheese. *Dairy Sci. Technol.* 22: 25-38.
- Tong, W. Y., Fu, X. Y., Lee, S. M., Yu, J., Liu, J. W., Wei, D. Z., and Koo, Y. M. 2004. Purification of L (+)-lactic acid from fermentation broth with paper sludge as a cellulosic feedstock using weak anion exchanger Amberlite IRA-92. *Biochem. Eng. J.* 18(2): 89-96.
- Tosungnoen, S., Chookietwattana, K., and Dararat, S. 2014. Lactic acid production from repeated-batch and simultaneous saccharification and fermentation of cassava starch wastewater by amyolytic *Lactobacillus plantarum* MSUL 702. *APCBEE procedia.* 8: 204-209.

- Wang, C. C., Chang, S. C., and Chen, B. H. 2009. Chromatographic determination of polysaccharides in *Lycium barbarum* Linnaeus. *Food. Chem.* 116(2): 595-603.
- Wang, Y., Chen, C., Cai, D., Wang, Z., Qin, P., and Tan, T. 2016. The optimization of l-lactic acid production from sweet sorghum juice by mixed fermentation of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus rhamnosus* under unsterile conditions. *Bioresour. Technol.* 218: 1098-1105.
- Wang, Y., Chang, J., Cai, D., Wang, Z., Qin, P., and Tan, T. 2017. Repeated-batch fermentation of L-lactic acid from acid hydrolysate of sweet sorghum juice using mixed neutralizing agent under unsterilized conditions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 7: 1481–1854.
- Wang, Y., Meng, H., Cai, D., Wang, B., Qin, P., Wang, Z., and Tan, T. 2016. Improvement of L-lactic acid productivity from sweet sorghum juice by repeated batch fermentation coupled with membrane separation. *Bioresour. Technol.* 211: 291-297.
- Wee, Y. J. and Ryu, H. W. 2006. Biotechnological production of lactic acid its recent Application. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 163-172.
- Wee, JY., Kim, JN., Yun, JS. and Ryu, HW. 2004. Utilization of sugar molass for enomical L-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme Microb. Tech.* 35: 568-573.
- Wu, J. 2009. Recovery of citric acid from fermentation broth using simulated moving bed technology. Ph.D. Dissertation, Universitat Erlangen-Nurnberg.
- Yi, X., Zhang, P., Sun, J., Tu, Y., Gao, Q., Zhang, J., and Bao, J. 2016. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L-and D-lactic acid production from corn stover feedstock. *J. Biotechnol.* 217: 112-121.
- Yinghuai, Z., Yuanting, K. T., and Hosmane, N. S. 2013. Applications of ionic liquids in lignin chemistry. In *Ionic Liquids-New Aspects for the Future*. InTech.
- Yoichi, T. 1992. Chemical characteristics and utilization of oil palm trunks. *Bull. For and For. Prod. Res. Inst.* 362: 133-142.
- Yoon, S. Y., Han, S. H., and Shin, S. J. 2014. The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. *Energy.* 77: 19-24.
- Zajsek, K., Gorsek, A. and Kolar, M. 2013. Cultivating conditions effects on kefir production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chem.* 139: 970-977.

- Zdarta, J., Jędrzak, A., Kłapiszewski, L., and Jesionowski, T. 2017. Immobilization of cellulase on a functional inorganic–organic hybrid support: Stability and kinetic study. *Catalysts*. 7(12): 374.
- Zhang, B., Yang, R., Zhao, Y., and Liu, C. Z. 2008. Separation of chlorogenic acid from honeysuckle crude extracts by macroporous resins. *J. Chromatogr. B*. 867(2): 253-258.
- Zhang, Z. Y., Jin, B. and Kelly, J. M. 2007. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochem. Eng. J.* 35: 251-263.
- Zhang, Y., Vadlinani, P.V., Kumar, A., Hardwidge, P.R., Govind, R., T., and Kondo, A. 2016. Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 279-288.
- Zhao, X. S., Bao, X. Y., Guo, W., and Lee, F. Y. 2006. Immobilizing catalysts on porous materials. *Mater. Today*. 9(3): 32-39.
- Zhao, B., Wang, L., Li, F., Hua, D., Ma, C., Ma, Y., and Xu, P. 2010. Kinetics of D-lactic acid production by *Sporolactobacillus* sp. strain CASD using repeated batch fermentation. *Bioresour. Technol.* 101: 6499-6505.
- Zhao, K., Qiao, Q., Chu, D., Gu, H., Dao, T. H., Zhang, J. and Bao, J. 2013. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresour. Technol.* 135: 481-489.
- Zhu, S., Wu, Y., Z., Liao, J. and Zhange, Y. 2005. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. *Proc Biochem.* 40: 3082-3086.
- Zhu, C. H., Fang, Z., Su, T. C., Li, X. K., and Liu, Q. Y. 2018. Cellulase immobilized on mesoporous biochar synthesized by ionothermal carbonization of cellulose. *Cellulose*. 25(4): 2473-2485.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์ผล

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกากลำต้นปาล์มน้ำมัน

1.1 การหาปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 1990)

วิธีการ

1) อบภาชนะสำหรับหาความชื้น ในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นอุณหภูมิภาชนะลดลง เท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2) ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-2 มิลลิกรัม

3) ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 1-2 กรัม ใส่ในภาชนะหาความชื้น ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ แล้วใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

4) นำไปอบซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม นำค่าไปคำนวณหาความชื้น

$$\text{ร้อยละปริมาณความชื้น} = (A \times (B - A) \times 100) / A$$

โดยที่

A = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

B = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

C = น้ำหนักภาชนะ

1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน (A.O.A.C., 1990)

สารเคมี

- 1) สารละลาย Acid detergent
- 2) decahydronaphthalene
- 3) อะซิโตน
- 4) กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 72

วิธีการ

1) ชั่งตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Acid detergent 100 มิลลิลิตร และ decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร

2) ให้ความร้อนจนเดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นลดความร้อนลงให้เดือดเบาๆ เป็นเวลา 60 นาที

3) กรองผ่านครุชชีเบลที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว (W_1) โดยใช้แรงดูดสุญญากาศดูดเบาๆ จากนั้นล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ในบีกเกอร์ลงครุชชีเบลด้วยน้ำร้อน 3-5 ครั้ง

4) จากนั้นจึงดูดด้วยสุญญากาศให้แห้ง และล้างด้วยอะซิโตนปริมาณเล็กน้อย 2-3 ครั้ง

5) ใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูดให้แห้ง นำครุชชีเบลไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หรืออบจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (W_2)

6) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 72 (แช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียส) ลงในครุชชีเบล 15 มิลลิลิตร เติมกรดเพิ่มลงไปทุก 1 ชั่วโมง และคนอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

7) นำครุชชีเบลไปกรองเอากรดออก โดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศแล้วล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด นำครุชชีเบลอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8) ทำให้เย็นลงโดยโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก (W_3) นำครุชชีเบลไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าไม่มีคาร์บอน ทำให้เย็นโดยโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก (W_4)

การคำนวณ

$$\% \text{ Acid detergent fiber} = (W_2 - W_1) \times 100 / \text{น้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่าง (กรัม)}$$

$$\text{ร้อยละปริมาณลิกนิน} = (W_3 - W_4) \times 100 / \text{น้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่าง (กรัม)}$$

$$\text{ร้อยละปริมาณเซลลูโลส} = \text{Acid detergent fiber} - \text{ปริมาณลิกนิน}$$

โดยที่

$$W_1 = \text{น้ำหนักครุชชีเบลเปล่า}$$

$$W_2 = \text{น้ำหนักครุชชีเบลและตัวอย่างหลังผ่านสารละลาย Acid detergent (กรัม)}$$

$$W_3 = \text{น้ำหนักครุชชีเบลและตัวอย่างหลังผ่านกรดซัลฟูริก (กรัม)}$$

$$W_4 = \text{น้ำหนักครุชชีเบลและตัวอย่างหลังเผา (กรัม)}$$

1.3 การหาปริมาณเฮมิเซลลูโลส (Lin *et al.*, 2010)

นำตัวอย่างมาชั่ง 1 ส่วน (0.5 กรัม) ผสมกับ NaOH (เข้มข้น 0.5 โมลาร์) 10 ส่วน โดยปริมาตร (5 มิลลิลิตร) ใส่ในหลอดทดลองที่มีแท่งแก้ว เพื่อใช้ในการคนและบดตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที บ่มไว้ในอ่างน้ำ 80 °C เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการกรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจน

น้ำหนักคงที่ นำกระดาษกรองใส่ในตู้ดูดความชื้นนาน 1 ชั่วโมง ก่อนชั่งน้ำหนัก ปริมาณ เฮมิเซลลูโลส (% Hemicellulose: % H) ในตัวอย่าง ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\% H = \left(\frac{W_{Sample} - (W_{FP+Filtrate} - W_{FP})}{W_{Sample}} \right) \times 100$$

| | | |
|-------|-------------------|------------------------------------|
| เมื่อ | W_{Sample} | คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม) |
| | $W_{FP+Filtrate}$ | คือ น้ำหนักกระดาษกรองหลังอบ (กรัม) |
| | W_{FP} | คือ น้ำหนักกระดาษกรองก่อนอบ (กรัม) |

2. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในน้ำคั้นลำต้นปาล์มโดยวิธีเอลคาห์ล (AOAC)

สารเคมี

- 1) กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 98
- 2) กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 3
- 3) Kjeltabs
- 4) อินดิเคเตอร์ผสม เตรียมจาก bromocresol green 0.22 กรัม ผสมกับ methyl red 0.075 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 96 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 5) สารละลายกรดเกลือมาตรฐานเข้มข้น 1 โมลาร์

วิธีการ

1. การย่อยสลาย

- 1) ตวงตัวอย่างปริมาตร 2-5 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl flask เติม HgO 0.7 กรัม
- 2) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตรลงใน Kjeldahl flask
- 3) ทำแบลนด์และตัวอย่างอ้างอิงโดยวิธีเดียวกัน
- 4) นำไปย่อยใน Kjeldahl digestion apparatus ที่อุณหภูมิ 100-400 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงจนสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

2. การกลั่น

- 1) เครื่อง Kjeldahl: เติมสารละลายกรดบอริกปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ผสม 4-5 หยด นำไปวางรองรับ distillate จากเครื่องกลั่น โดยให้ปลายหลอดแก้วจุ่มอยู่ในสารละลายกรดบอริก แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยอัตราส่วน

1:1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl flask ที่มีสารละลายตัวอย่าง ทำการกลั่นประมาณ 1 ชั่วโมง จนได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรต

2) เครื่องกลั่นสำหรับ block: ใส่สารละลายกรดบอริกปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หมกอินดิเคเตอร์ผสม 4-5 หยด แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ลงในหลอดแก้วที่มีสารตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตรจากเครื่อง ทำการกลั่นจนได้ปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรต

3. การไทเทรต

1) ไทเทรตของเหลวที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีม่วง

2) ไทเทรตแบบลงค์เช่นเดียวกับตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\%N = (a-b)c \times 1.401/g$$

โดยที่ a = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

b = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไทเทรตแบบลงค์ (มิลลิลิตร)

c = ความเข้มข้นของกรด (โมลาร์)

g = ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ข.

กราฟมาตรฐาน

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ชั่งน้ำตาลกลูโคสจำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางสารละลายน้ำตาลกลูโคส 100 เท่า จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการดูดสารละลายกลูโคสที่ทำการเจือจางแล้วปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 มิลลิลิตร ใส่หลอดที่เตรียมไว้ จากนั้นทำการเติมน้ำกลั่นลงในแต่ละหลอดปริมาตรสุดท้ายรวมในหลอด 1 มิลลิลิตร ทำการเติมสารละลายฟีนอลร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้ผสมเข้ากัน ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วจึงทำการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดอย่างรวดเร็วผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที สำหรับแบลงค์ใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และทำทุกอย่างเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

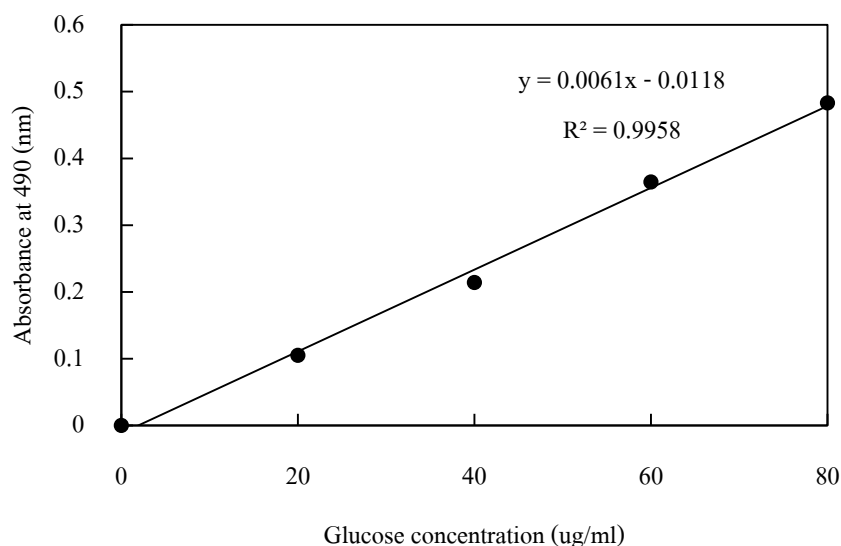


Figure 43 Standard curve of glucose by phenol-sulphuric method.

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแลกติก กรดอะซิติก และเอทานอลโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เตรียมกราฟมาตรฐานกรดแลกติก กรดอะซิติก และเอทานอลโดยเทคนิค HPLC โดยดัดแปลงตามวิธีของ Olano-Maetin และคณะ (2000)

สารเคมี

1. สารมาตรฐานกรดแลกติก
2. สารมาตรฐานกรดอะซิติก
3. สารมาตรฐานเอทานอล
4. กรดซัลฟูริก

เครื่องมือ

| | |
|--------------------|---|
| Column | : Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column 300 x 7.8 มิลลิเมตร |
| Mobile phase | : กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.005 M |
| Flow rate | : 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที |
| Detector | : Refractive Index |
| Column Temperature | : 65 องศาเซลเซียส |
| Injection volume | : 20 ไมโครลิตร |

วิธีการ

เตรียมสารมาตรฐาน กรดแลกติก กรดอะซิติก และเอทานอลที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร กรองผ่านกระดาษกรองไนลอนขนาด 0.22 ไมโครเมตร และฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่คอลัมน์ จากนั้นแปลผลและวิเคราะห์ข้อมูลการทดลองจากค่ารีเทนชันไทม์ (retention time) และค่าพื้นที่พีค (area) ของสารมาตรฐาน กรดแลกติก กรดอะซิติก และเอทานอล แล้วสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน

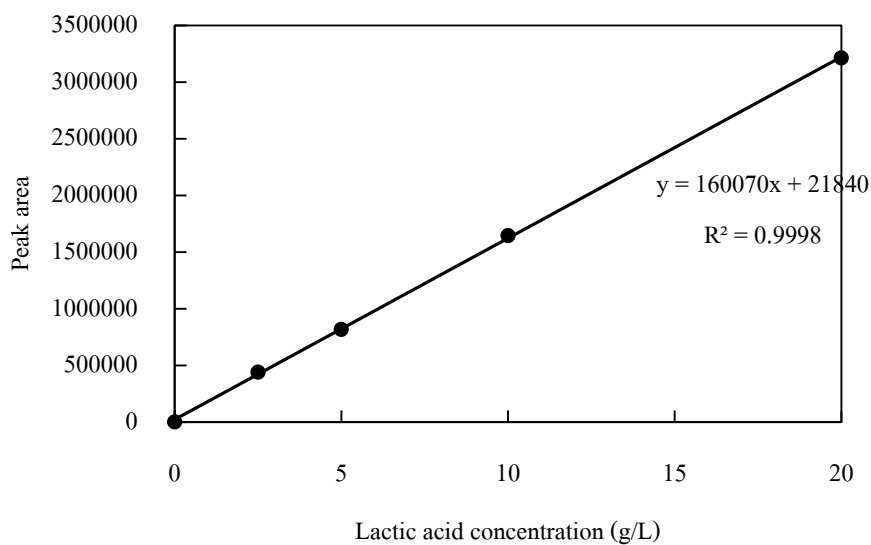


Figure 44 Standard curve of lactic acid analyzed by HPLC.

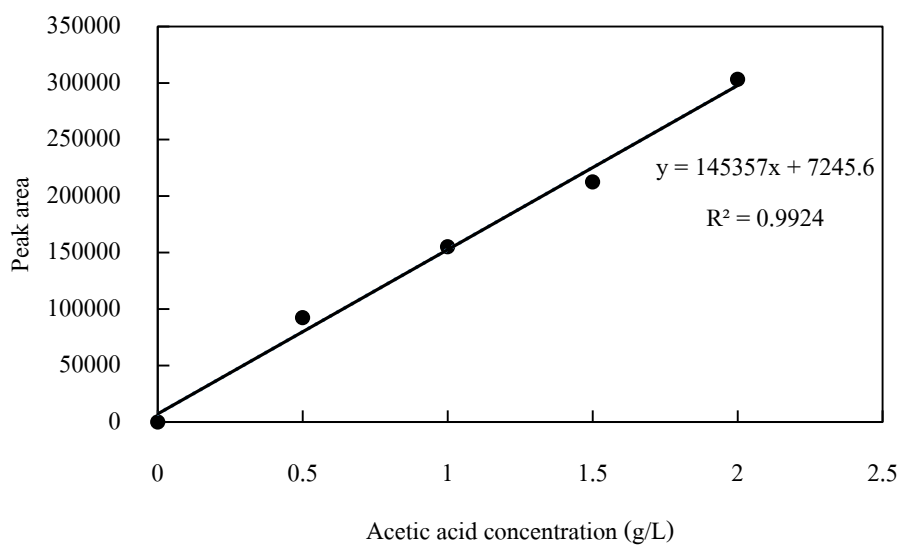


Figure 45 Standard curve of acetic acid analyzed by HPLC.

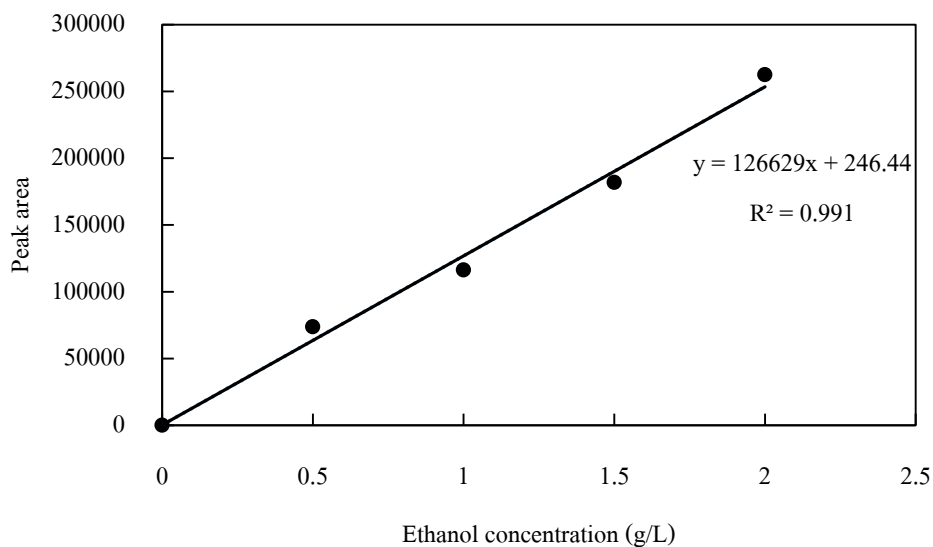


Figure 46 Standard curve of ethanol analyzed by HPLC.

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลในน้ำคั้นลำต้นปาล์มและกากลำต้นปาล์ม

เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลไซโลส และและน้ำตาลอะราบีโนส ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตรโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Egüés และคณะ, 2010)

สารเคมี

1. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส
2. สารมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตส
3. สารมาตรฐานน้ำตาลไซโลส
4. สารมาตรฐานน้ำตาลอะราบีโนส
5. กรดซัลฟูริก

เครื่องมือ

| | | |
|--------------------|---|--|
| Column | : | Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column 300 x 7.8 มิลลิเมตร |
| Mobile phase | : | 0.005 M Sulfuric acid |
| Flow rate | : | 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที |
| Detector | : | Refractive Index |
| Column Temperature | : | 65 องศาเซลเซียส |
| Injection volume | : | 20 ไมโครลิตร |

วิธีการ

เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลไซโลส และและน้ำตาลอะราบิโนส ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร กรองผ่านกระดาษกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร และฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่คอลัมน์ จากนั้นแปลผลและวิเคราะห์ข้อมูลการทดลองจากค่ารีเทนชันไทม์ (retention time) และค่าพื้นที่พีค (area) ของสารมาตรฐาน น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลไซโลส และและน้ำตาลอะราบิโนสแล้วสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน

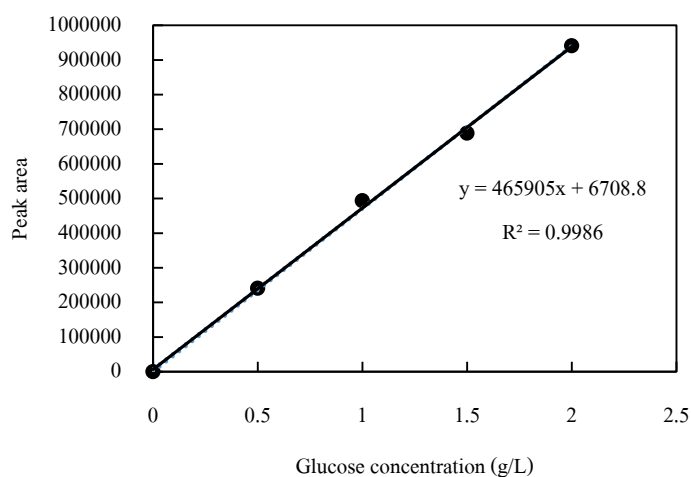


Figure 47 Standard curve of glucose analyzed by HPLC.

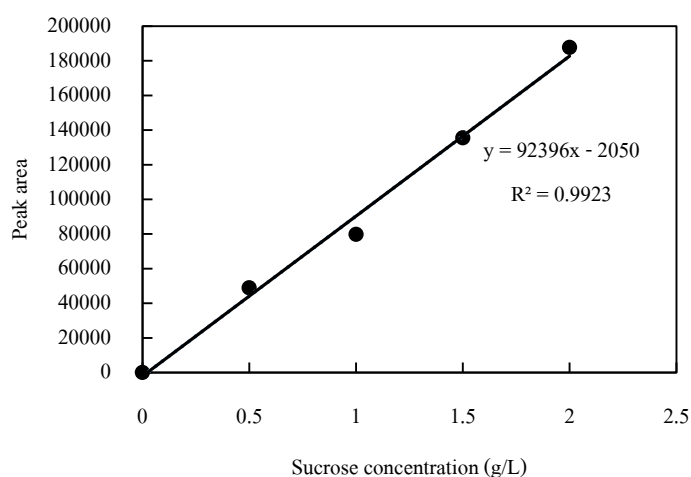


Figure 48 Standard curve of sucrose analyzed by HPLC.

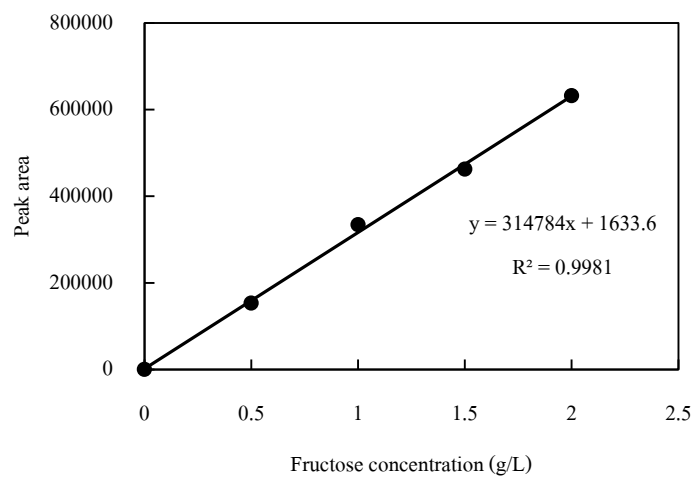


Figure 49 Standard curve of fructose analyzed by HPLC.

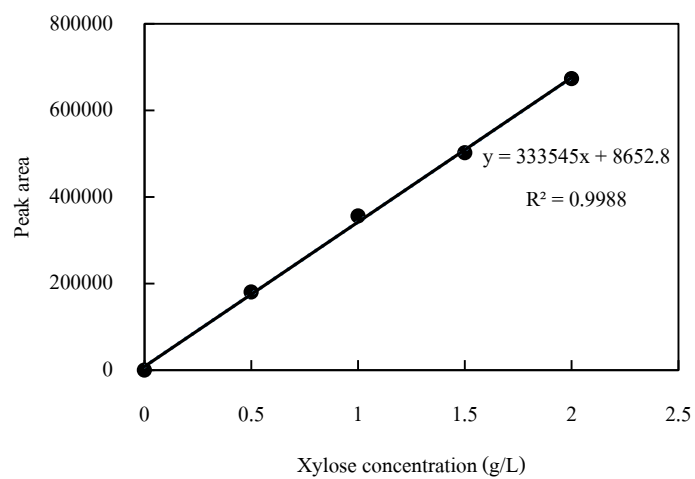


Figure 50 Standard curve of xylose analyzed by HPLC.

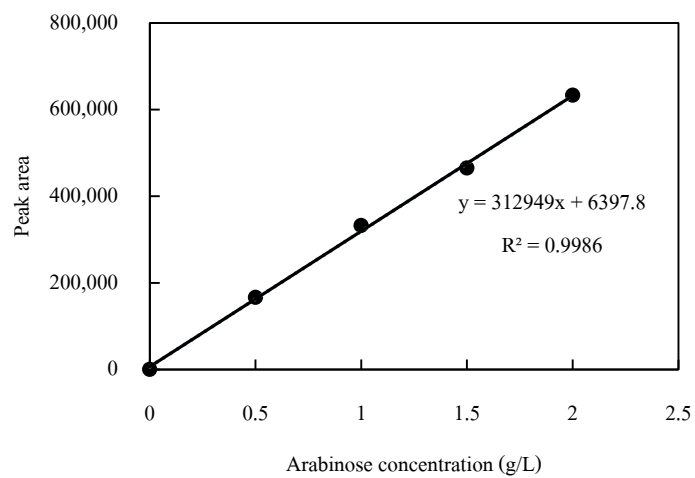


Figure 51 Standard curve of arabinose analyzed by HPLC.

4. กราฟมาตรฐานปริมาณแป้ง

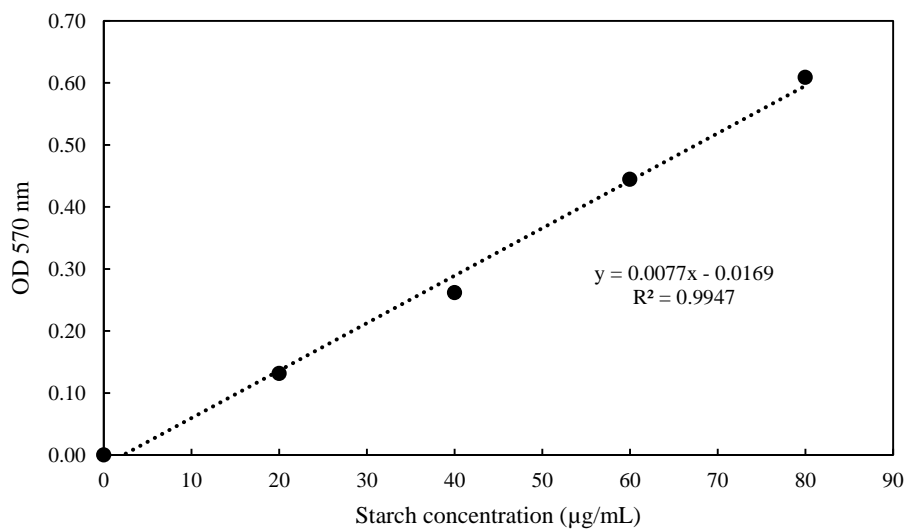


Figure 52 Standard curve of starch concentrations.

5. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานน้ำตาลชนิดต่างๆ และสารเมตาบอไลต์ต่างๆ

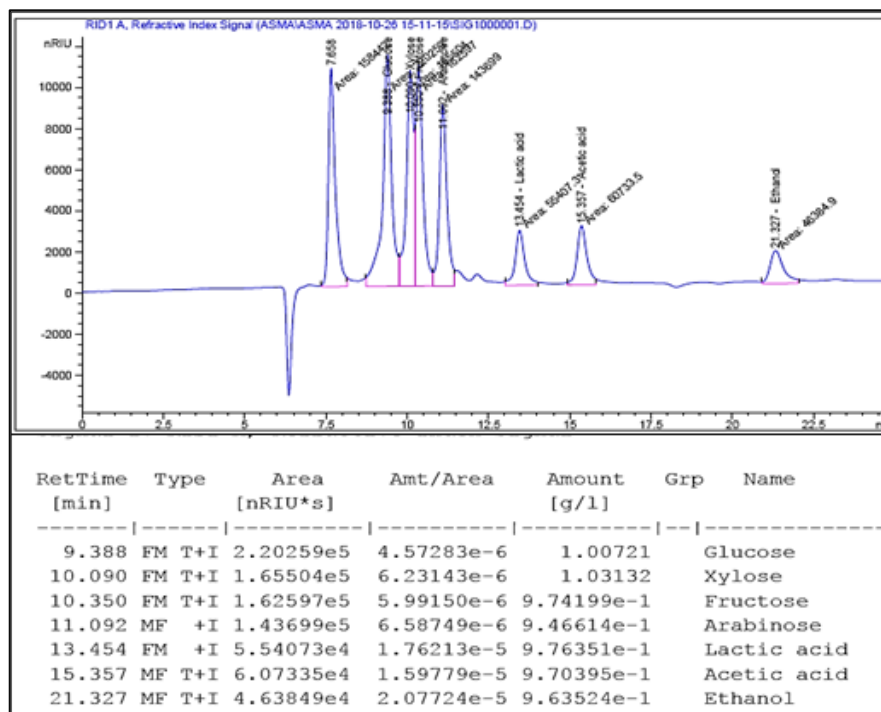


Figure 53 Chromatogram of standard sugar and metabolite products at concentration of 1 g/L

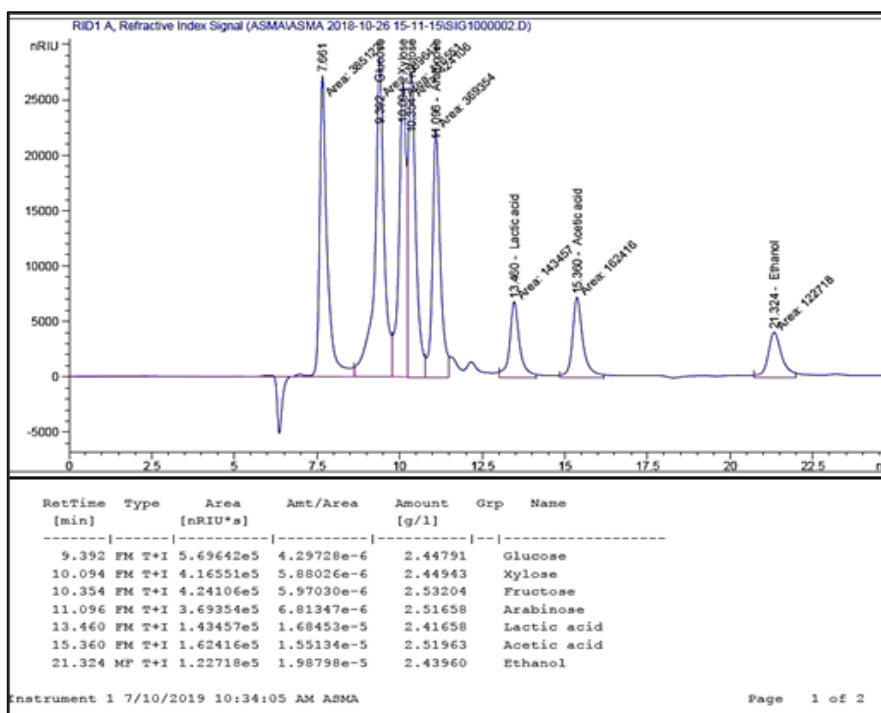


Figure 54 Chromatogram of standard sugar and metabolites product at concentration of 2.5 g/L

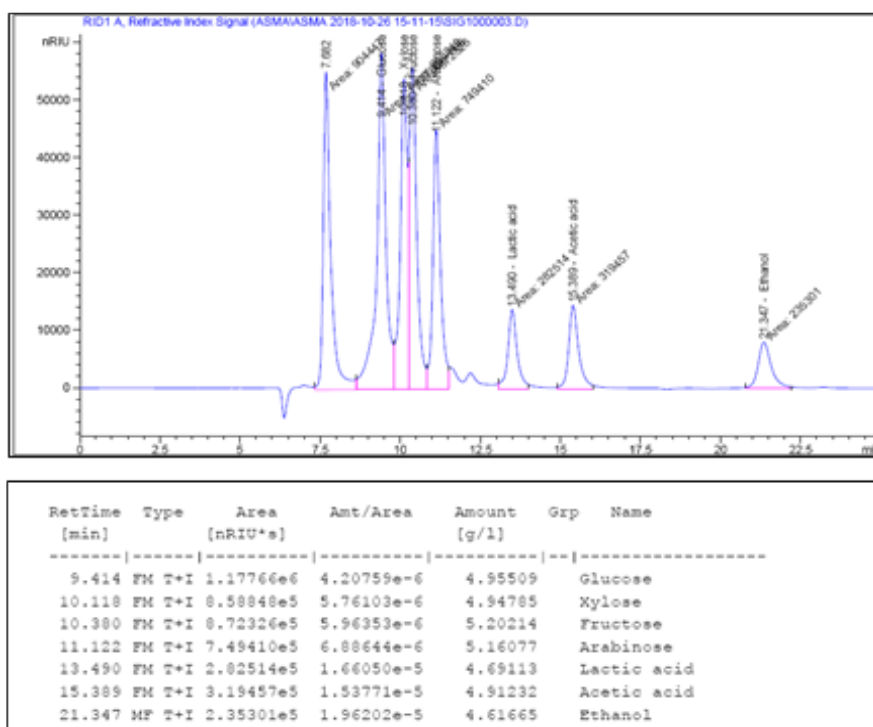


Figure 55 Chromatogram of standard sugar and metabolites product at concentration of 5 g/L

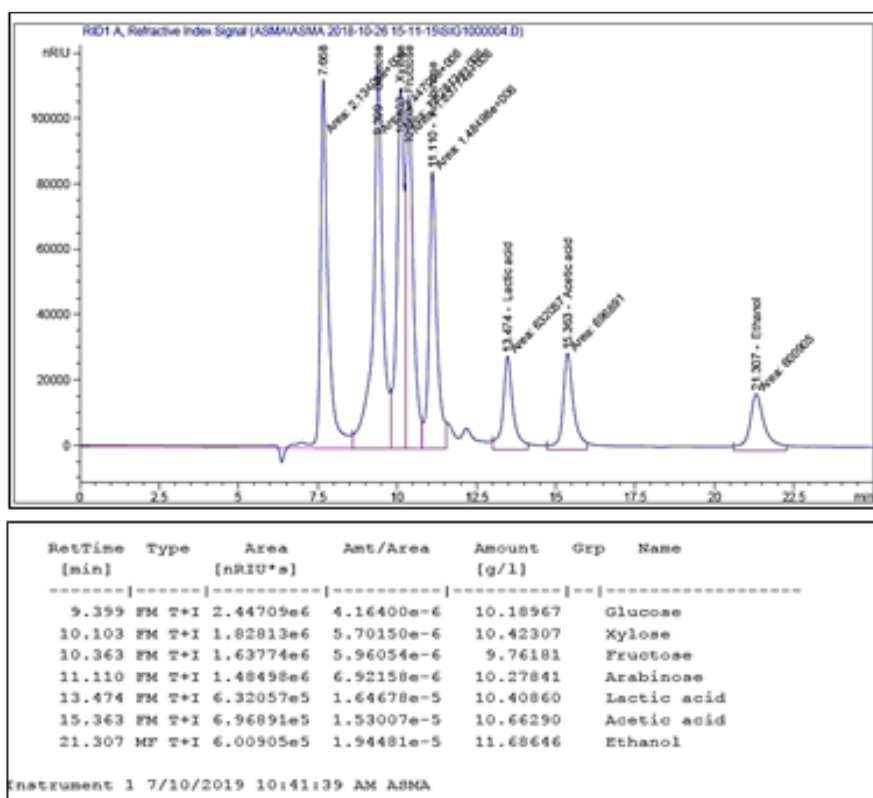


Figure 56 Chromatogram of standard sugar and metabolites product at concentration of 10 g/L.

ภาคผนวก ค.

รูปภาพการทดลอง

1. แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำคั้นลำต้นปาล์ม

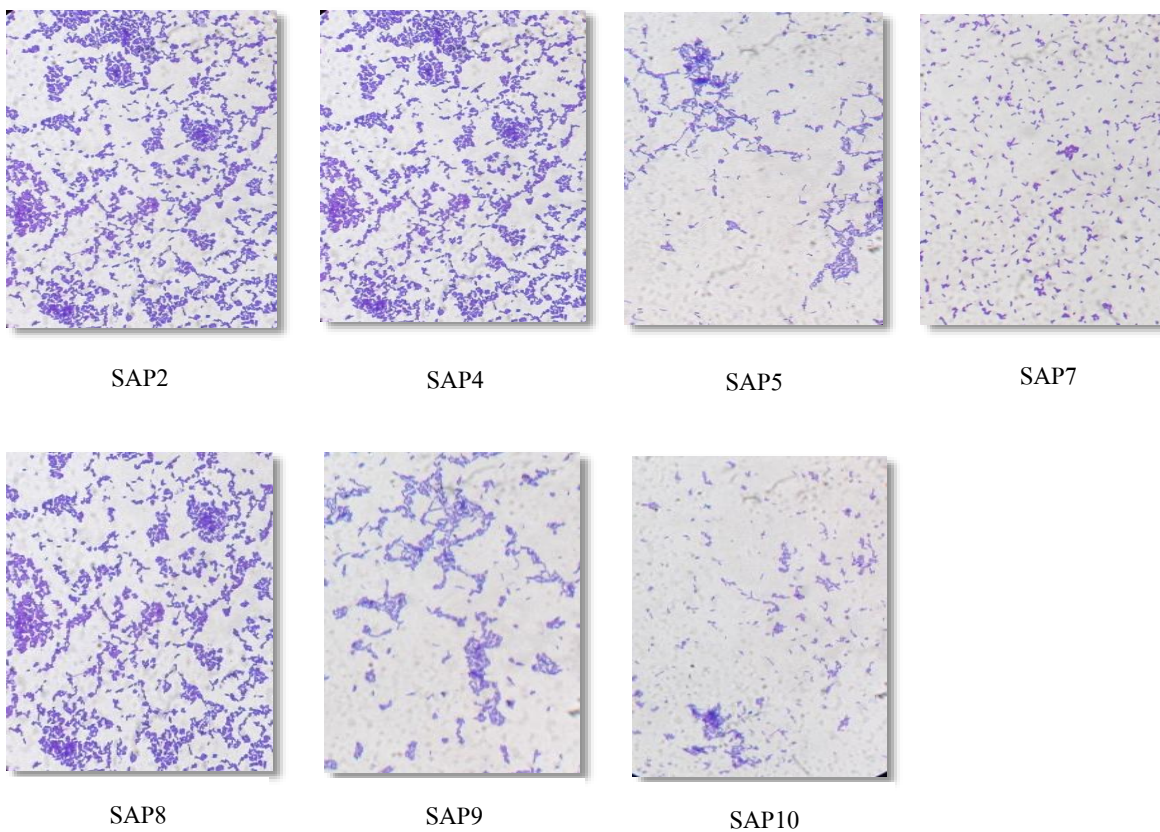
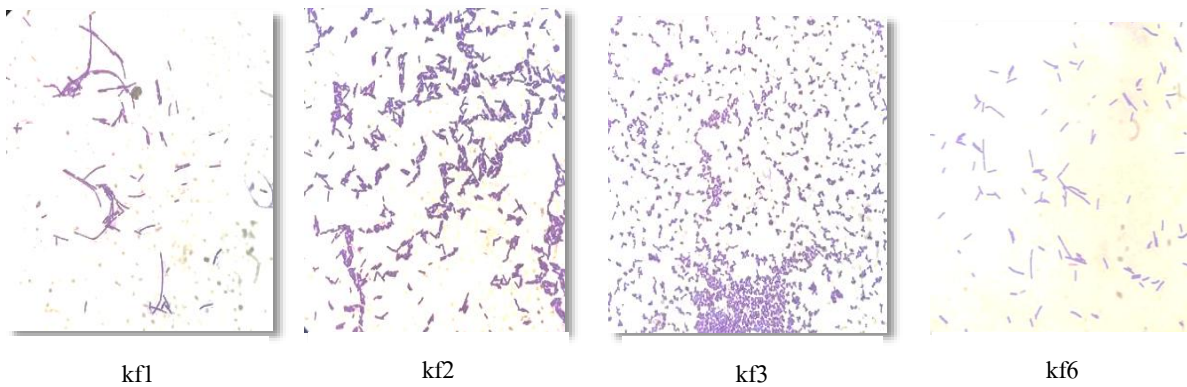
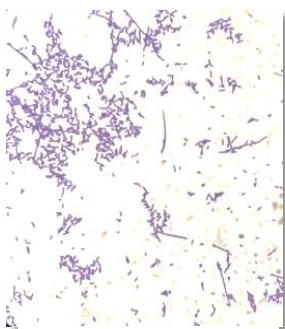


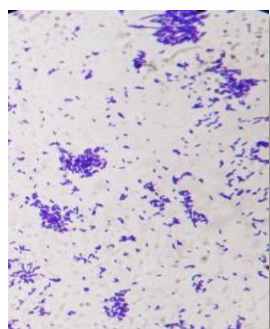
Figure 57 LAB obtained from OPS isolation.

2. แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกีเฟอร์เกรน

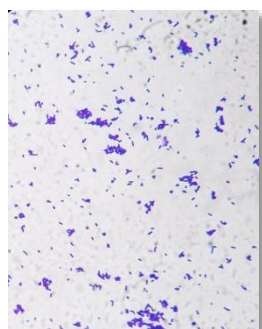




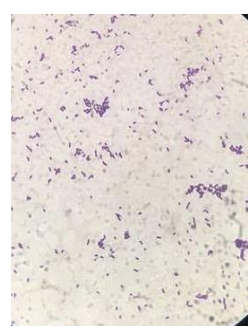
kf7



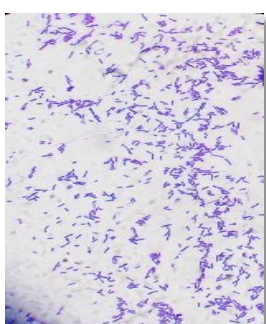
kf10



kf17



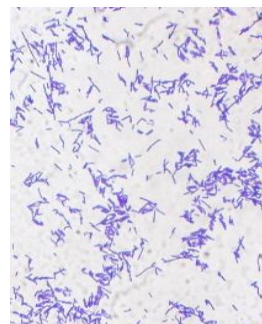
f3



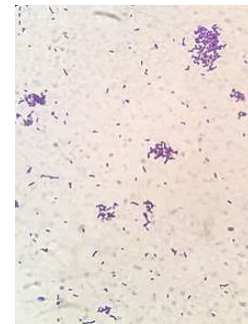
f4



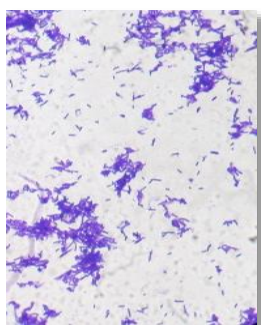
f5



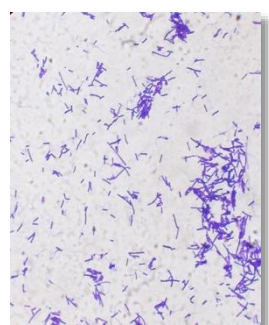
f6



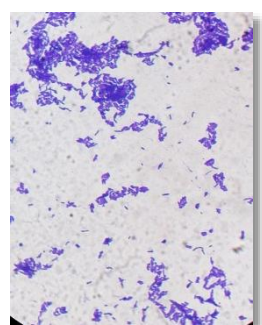
f10



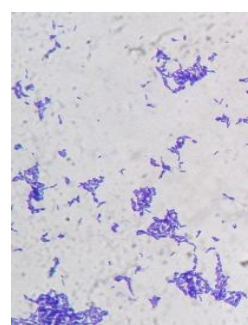
f12



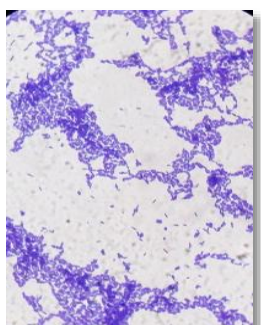
f15



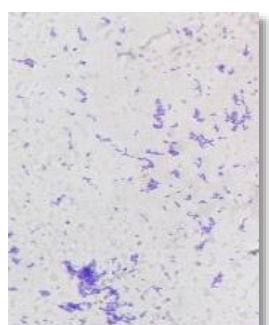
f16



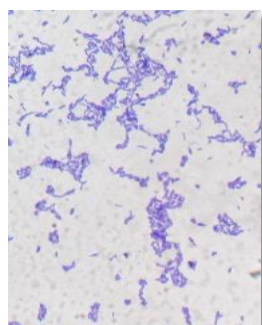
f19



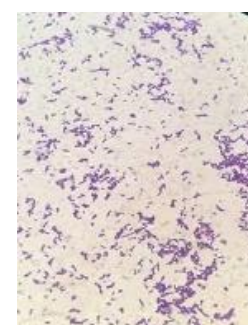
f20



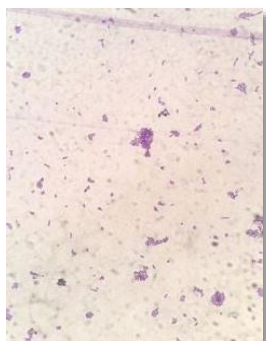
f22



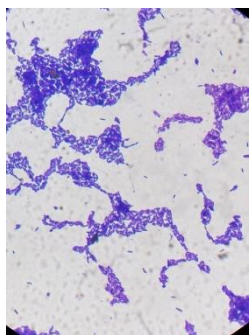
f23



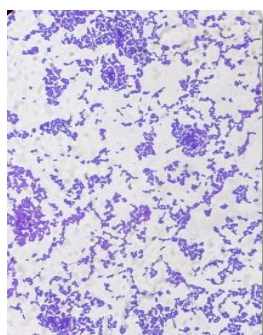
f25



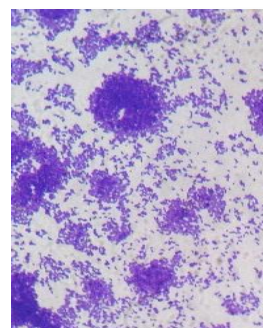
f26



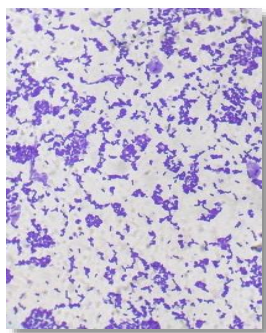
f27



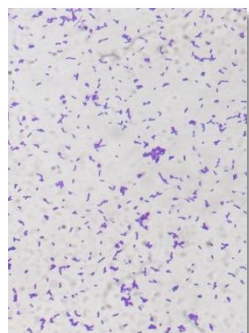
f29



f30



f32



f35

Figure 58 LAB obtained from kefir grains isolation.

3. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้

3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus paracasei* F16

Table 33 16S rDNA sequence of *Lactobacillus paracasei* F16

GCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAA
 CGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAA
 CATTGGAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCT
 GAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGG
 CCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
 CTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTT
 TCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTTCGGCAGAGTAACTGTTGTCTG
 GCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
 GGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAA
 CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT
 GCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGT
 ACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 TGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGC
 TAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGG
 AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGC
 GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCC
 TTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATG
 TTGGGTTAAGTCCCACAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTT
 GGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
 AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAC
 GAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACT
 GTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
 CGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGAGAG
 TTTGTAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAAC

3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus kefir* KF1

Table 34 16S rDNA sequence of *Lactobacillus kefir* KF1

GATTTAACACGAAACGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT
 TGAAGTAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACCAAAC
 CACATGGTTTTGGTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGG
 CGTATTAGCTTGTGGTAAGGTAATGGCCTACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACC
 TGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGT
 GAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACAGGTGTC
 AGAGTAACTGTTGACATCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT
 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGG
 AGAAGTGCATCGGAAACCAGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTC
 ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
 TGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTA
 GATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCG
 CCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGAA
 GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
 TAATTCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAA
 GAGATTAGGCGTTCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
 GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTA
 GTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
 AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
 ACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG
 CCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTTGGAATCGCTA
 GTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
 CCGTCACACCATGAGAG

4. ขั้นตอนการเตรียมน้ำคั้นและกากลำต้นปาล์ม



Figure 59 Preparation of oil palm sap and oil palm trunk



Figure 60 Column adsorption of lactic acid from fermentation broth

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวอัสมา บิลละเต๊ะ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6011020010

วุฒิการศึกษา

| วุฒิ | ชื่อสถาบัน | ปีที่สำเร็จการศึกษา |
|---|--------------------------|---------------------|
| วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร) | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ | 2558 |

ทุนการศึกษา

ทุนอุดหนุนการศึกษาวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Billateh, A., Cheirsilp, B., Lojananan, N. and Chaiyaphum, M. The Use of Sap from Felled Oil Palm Trunk as Low-cost Nutrient Source for Lactic Acid 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).

Billateh, A. and Cheirsilp, B. Lactic acid production from felled oil palm trunk through simultaneous saccharification and fermentation. National conference “The 11th National Science Research Conference 2019” at Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand on 23 -24th (Good oral presentation award).