บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของการใช้แป้งสาคูเป็นสารตั้งต้นในการผลิตคีเฟอรัน โดยเชื้อ *L. kefiranofaciens*

1.1 ผลของการให้ความร้อนแก่แป้งสาคู

จากการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในอาหาร MRS-sago starch (ความเข้มข้นแป้งสาคูร้อยละ 2) ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 100 ยูนิตต่อกรัมแป้ง ที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 120 รอบต่อนาที และทำการเปรียบเทียบระหว่างการใช้แป้งที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน พบว่าแป้งสาคูที่ผ่านการให้ความร้อนจะให้การเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อได้ดีกว่าแป้งสาคูที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน (ดังแสดงในภาพที่ 7a และ 7b) โดยจะพบว่าแป้งสาคูที่ผ่านการให้ความร้อนจะสามารถผลิตคีเฟอรันได้0.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่แป้งที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนผลิตได้ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การผลิตคีเฟอรันจากแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนจะมีลักษณะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเป็นเส้นตรง ในขณะที่การผลิตคีเฟอรันของแป้งที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนจะมีลักษณะคงที่และเพิ่มปริมาณขึ้นเพียงเล็กน้อยในช่วงปลายของการเลี้ยงเชื้อ

ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งสาคู (ภาพที่ 7c) พบว่าชุดการทดลองของแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อสูงกว่าแป้งที่ไม่ผ่านความร้อน (6.66 และ 4.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) โดยการให้ความร้อนแก่แป้งสาคู (121 องศาเซลเซียส 15 นาที) เป็นการ pretreat แป้งก่อนนำมาทำการย่อย ซึ่งเม็ดแป้งจะเกิดการแตกตัว ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปจับและเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้เร็วและง่ายขึ้น ในขณะที่แป้งที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนจะอาศัยการย่อยจากภายนอกเม็ดแป้งเพียงอย่างเดียว ซึ่งปฏิกิริยาการย่อยจะเกิดขึ้นได้ช้ากว่าแป้งที่ผ่านการให้ความร้อน หรือผ่านกระบวนเจลาทิไนซ์ (Gelatinization) มาแล้ว (Maaruf *et al*., 2001)

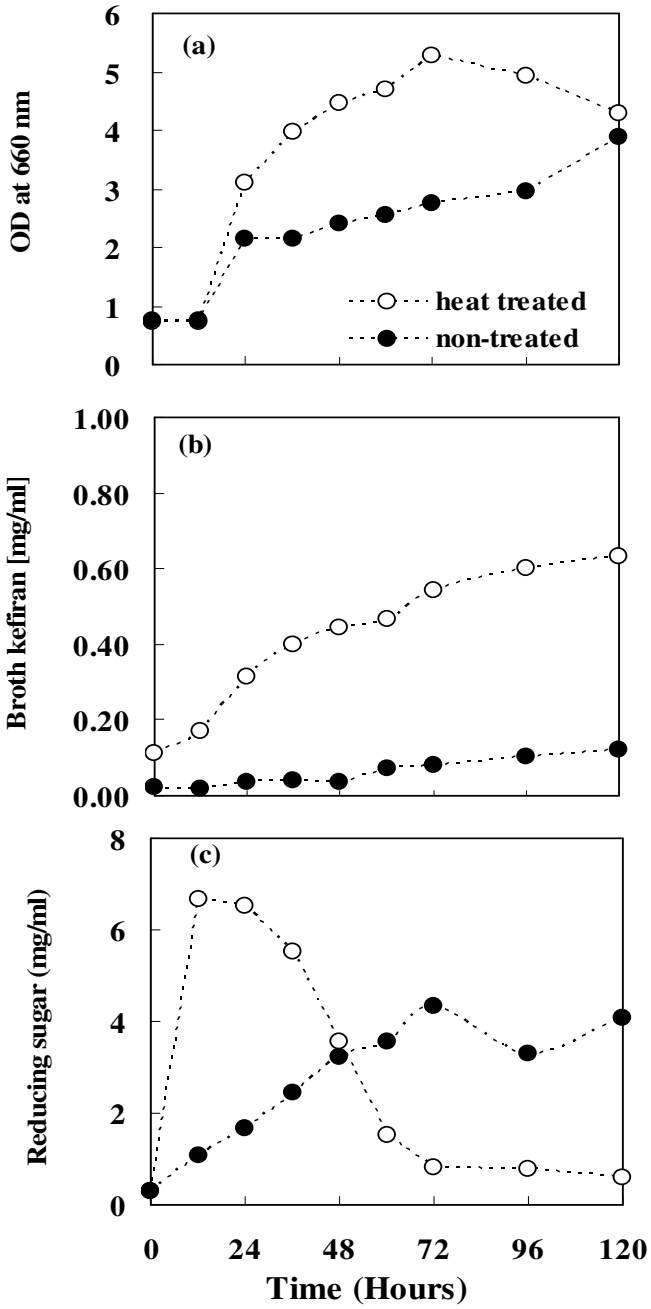
โดยผลผลิตที่ได้จากการย่อยแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยเอนไซม์และยังไม่มีการเลี้ยงเชื้อมีปริมาณเท่ากับ 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 45 ของแป้งสาคูทั้งหมด สำหรับชุดการทดลองเลี้ยงเชื้อของแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 6.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะน้อยกว่าผลผลิตจากการย่อยแป้งเพียงอย่างเดียว เนื่องจากเชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และมีการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น ทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ในระบบลดลง ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของแป้งที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นที

ละน้อยและมีปริมาณน้อยกว่าแป้งที่ผ่านการให้ความร้อน (ภาพที่ 7c) ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยเชื้อในชุดการทดลองของแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่า และมีการผลิตคีเฟอรันที่สูงกว่าตามมา เพราะเอนไซม์อะไมเลสสามารถย่อยแป้งที่ผ่านการให้ความร้อน ให้กลายเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่า และเชื้อจะสามารถนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ได้ต่อไป เช่นเดียวกันกับผลการทดลองของ Hofvendahl และ Hahn-Hagerdal (2000) และ Roy และคณะ (2001)

Roy และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 โดยใช้แป้งมันฝรั่งเป็นสารตั้งต้น พบว่าเมื่อใช้แป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 30 และนำไปผ่านการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ร่วมกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ก่อนนำไปเลี้ยงเชื้อด้วยกระบวนการ SSF พบว่าจะมีน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ทันทีและสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 163 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราเร็วในการผลิตสูงขึ้นร้อยละ 20

นอกจากการนี้ Choteborska และคณะ (2002) ศึกษาผลของการ pretreat แป้งสาลีด้วยกรดซัลฟิวริก (ที่ความเข้มข้นของกรดร้อยละ 1-4 ต่อปริมาตรสารละลายแป้ง) และการให้ความร้อนสูง (110-180 องศาเซลเซียส) ก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า พบว่าการให้ความร้อนแก่สารละลายแป้งที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาทีร่วมกับกรดซัลฟิวริกร้อยละ 1 จะให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยต่อด้วยเอนไซม์อะไมเลสในปริมาณที่สูงสุด 52.1 กรัมต่อ100 กรัมแป้ง

Mohamad และคณะ (2002) ศึกษาการผลิต Kojic acid โดยใช้เชื้อ *Aspergillus flavus* Link 44-1 และใช้แป้งสาคูที่ผ่านกระบวนการเจลาติไนเซชั่น โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ร่วมกับการปรับพีเอชของสารละลายแป้งให้เท่ากับ 3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 8 ลิตร มีการกวนตลอดเวลา ใช้ความเข้มข้นของแป้งสาคูเริ่มต้น 140 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิต Kojic acid ได้เข้มข้นสูง 16.43 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 2 วันหลังการหมัก



ภาพที่ 7 การผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน โดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในกระบวนการ SSF

(a) การเจริญเติบโตของเชื้อ (b) ปริมาณคีเฟอรัน (c) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Figure7 Kefiran production by *L. kefiranofaciens* from heat treated and non-treated sago starch in SSF mode

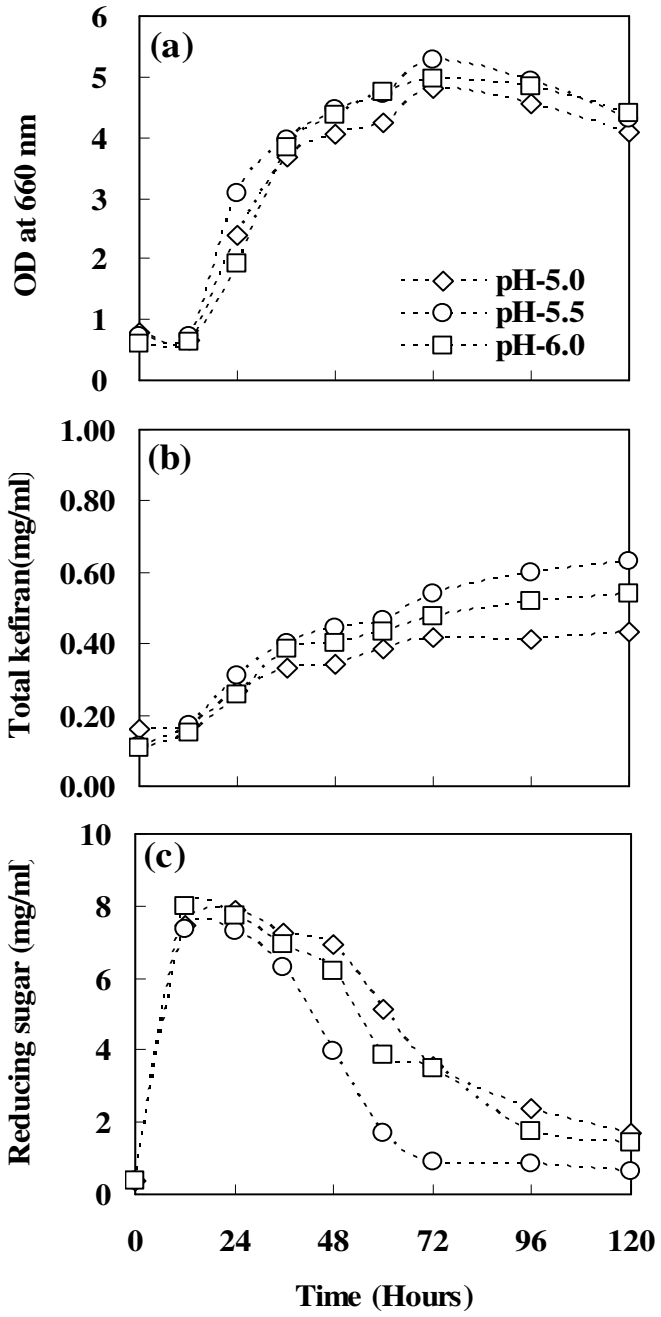
(a) cell growth (b) total kefiran (c) reducing sugar

1.2 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น

จากการทดลองเพื่อศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมทั้งต่อการย่อยแป้งและการผลิตคีเฟอรันด้วยกระบวนการ SSF จากเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในอาหาร MRS-sago starch ที่ใช้แป้งที่ผ่านการให้ความร้อน(ความเข้มข้นแป้งสาคูร้อยละ 2) ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 100 ยูนิตต่อกรัมแป้ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 120 รอบต่อนาที โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นต่างกัน (5.0, 5.5 และ 6.0) ในภาพที่ 8(a, b และ c) แสดงค่าการเจริญเติบโตของเชื้อ ปริมาณคีเฟอรัน และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการเลี้ยงเชื้อ พบว่าที่ค่าพีเอชเริ่มต้นทั้ง 3 ระดับ (5.0, 5.5 และ 6.0) ให้การเจริญเติบโตของเชื้อไปในทิศทางเดียวกัน สำหรับปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ พบว่าที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 เชื้อจะสามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด รองลงมาคือที่พีเอชเริ่มต้น 6.0 และ 5.0 (0.63, 0.54 และ 0.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) โดยที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 เชื้อจะมีการผลิตคีเฟอรันอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ซึ่งจะสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (พีเอชเริ่มต้น 5.5) ที่เริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เช่นกัน (ดังแสดงในภาพที่ 8b และ 8c)

คีเฟอรันที่ได้จากการผลิตที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 ให้ปริมาณคีเฟอรันสูงสุด เนื่องจากที่พีเอชดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* มากที่สุด (Cheirsilp *et al*., 2001) ที่พีเอชเริ่มต้นต่ำกว่า 5.0 แบคทีเรียแลคติกจะเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อย และจะผลิตสารในกลุ่มพอลีแซคคาไรด์ได้น้อย เช่นเดียวกับแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* C2 (Yokota *et al*., 1995; Gassem *et al*., 1997)

ในภาพที่ 9 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยงเชื้อของทั้ง 3 ชุดการทดลอง ซึ่งจะพบว่า ชุดทดลองที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 จะมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชที่ลดลงต่ำกว่า 4.0 เร็วกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งพีเอชที่ลดลงนี้ จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ และทำให้เชื้อผลิตคีเฟอรันได้น้อยกว่าชุดการทดลองอื่น (ภาพที่ 8a และ b) นอกจากนี้ระหว่างการเจริญเติบโตเชื้อ *L. kefiranofaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกจะมีการผลิตกรดแลคติกออกมาเป็นผลผลิตพลอยได้ ซึ่งกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวลดค่าพีเอชของสภาวะการเลี้ยงเชื้อ และจะเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของตัวเชื้อเองด้วย (Vancanneyt *et al*., 2004)

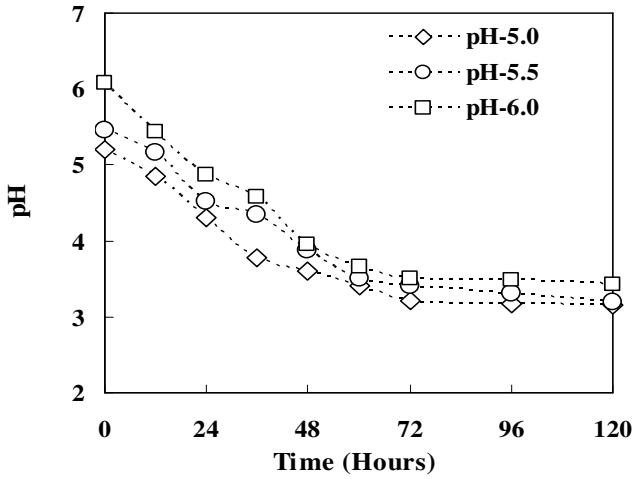


ภาพที่ 8 การผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในกระบวนการ SSF ที่พีเอชเริ่มต้นต่างกัน

(a) การเจริญเติบโตของเชื้อ (b) ปริมาณคีเฟอรัน (c) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Figure 8 Kefiran production by *L. kefiranofaciens* from sago starch at various initial pH in SSF mode

(a) cell growth (b) total kefiran (c) reducing sugar



ภาพที่ 9 การลดลงของค่าพีเอชในการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในอาหาร MRS-sago starch ที่พีเอชเริ่มต้นต่างกัน

Figure 9 Reduction of pH in the cultivation of *L. kefiranofaciens* in MRS-sago starch at various initial pH

ในการเลี้ยงเชื้อโดยการรวมกระบวนการย่อยแป้งและการเลี้ยงเชื้อเข้าด้วยกัน (SSF) หากพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งและการเลี้ยงเชื้อเป็นพีเอชที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องศึกษาพีเอชที่เหมาะสมของกระบวนการ SSF ในการทดลองนั้นๆ จากการทดลองของ Ohkouchi และ Inoue (2006) ที่ศึกษาการผลิตกรดแลคติก (L+) จากแป้งและวัสดุเศษเหลือจากอาหารด้วยกระบวนการ SSF โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011 ผลการทดลองที่ได้พบว่า ที่พีเอชสูงกว่า 6.0 หรือ ต่ำกว่า 4.0 เชื้อจะไม่สามารถใช้แป้งเพื่อผลิตกรดแลคติกได้ เนื่องจากที่พีเอชสูงกว่า 6.0 เอนไซม์อะไมเลสจะเกิดปฏิกิริยาได้ต่ำ ในขณะที่พีเอชต่ำกว่า 4.0 เชื้อจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกในการทดลองนี้อยู่ในช่วง 5.0-5.5 เช่นเดียวกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่า การเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* เกิดได้สูงสุดที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งด้วย

Anuradha และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 และใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยแป้ง จากผลการทดลองพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 4.0-4.5 ในขณะที่พีเอชดังกล่าวเชื้อจะสามารถเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งพีเอชที่

เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจะอยู่ในช่วง 5.0-6.0 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยกระบวนการ SSF พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกดังกล่าวจะเท่ากับ 5.6 ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ร้อยละ 87 โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ1.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ในตารางที่ 5 แสดงอัตราการผลิตคีเฟอรันเริ่มต้น (initial production rate) ที่พีเอชเริ่มต้นทั้ง 3 ค่า พบว่าที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 จะให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เท่ากับ 8.50 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่พีเอชเริ่มต้น 5.0 และ 6.0 ให้อัตราการผลิตคีเฟอรันเท่ากับ 5.05 และ 6.60 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 5 อัตราการผลิตคีเฟอรันจากเชื้อ *L.kefiranofaciens* ที่พีเอชเริ่มต้นต่างกัน

Table 5 Initial production rate of kefiran by *L.kefiranofaciens* at various initial pH

Initial pH	Initial production rate(mg/L/h)
5	5.05 ± 0.07^{a}
5.5	8.50 ± 0.14^{b}
6	6.60 ± 0.28^{c}

a, b and c : Statistically significantly different ($p < 0.05$)

1.3 ผลของอุณหภูมิ

จากการทดลองเพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งและการผลิตคีเฟอรันด้วยกระบวนการ SSF จากเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในอาหาร MRS-sago starch ที่ใช้แป้งที่ผ่านการให้ความร้อน (ความเข้มข้นแป้งสาคูร้อยละ 2) ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 100 ยูนิตต่อกรัมแป้ง พีเอชเริ่มต้น 5.5 อัตราการกวนที่ 120 รอบต่อนาที โดยมีอุณหภูมิต่างกัน (28, 30, 32 และ 35 องศาเซลเซียส) ในภาพที่ 10 a, b และ c แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ ปริมาณคีเฟอรัน และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้พบว่า การเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อลดลง เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญเติบโตได้สูงสุดและมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญเติบโตต่ำสุด (ภาพที่ 10a) การผลิตคีเฟอรันจะมีปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่าเท่ากับ 0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่อุณหภูมิ 28, 32 และ35 องศาเซลเซียส สามารถผลิตคีเฟอรันได้เท่ากับ 0.52, 0.46 และ 0.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

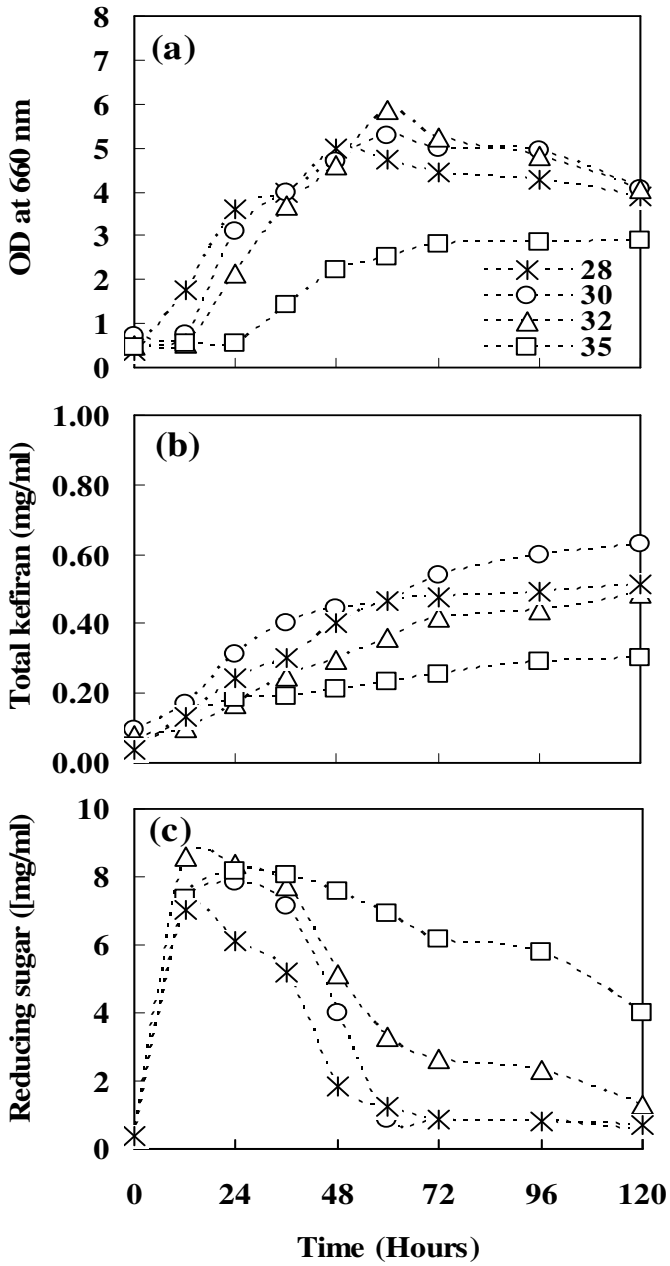
เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาพที่ 10c) พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะแปรผันกลับกับการเจริญของเชื้อและการผลิตคีเฟอรัน โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียสมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือต่ำ โดยที่อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่ 28 องศาเซลเซียสจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุด เนื่องมาจากที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้เอนไซม์อะไมเลสมีกิจกรรมน้อย และทำให้เกิดการย่อยแป้งได้น้อยกว่าที่อุณหภูมิสูง แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือมากที่สุด ส่วนหนึ่งเนื่องมาจากที่อุณหภูมินี้ เชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด จึงมีการนำน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้น้อย ทำให้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลืออยู่ในระบบในปริมาณที่สูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆ ทั้งนี้เกิดจากอุณหภูมิที่สูงจะเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. kefiranofaciens* (Yokoi and Watanabe, 1992)

อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าเอนไซม์ในกลุ่มดังกล่าวสามารถเกิดกิจกรรมได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า 60 องศาเซลเซียส (Soni *et al*., 2003) แต่ที่อุณหภูมิดังกล่าวเชื้อ *L. kefiranofaciens* จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นในการเลี้ยงเชื้อไปพร้อมกับการย่อยแป้งสาคูในกระบวนการ SSF เพื่อผลิตคีเฟอรันจึงจำเป็นต้องอาศัยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของ *L. kefiranofaciens* (30 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เชื้อสามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด

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

Jyothi และคณะ (2005) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Brevibacterium divaricatum* ด้วยกระบวนการ SSF โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อจะสามารถผลิตกรดกลูตามิกได้สูงสุดเท่ากับ 3.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส เชื้อจะเจริญเติบโตได้น้อยเนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบเกิดขึ้นได้น้อยที่อุณหภูมิต่ำ จึงทำให้การผลิตกรดกลูตามิกเกิดขึ้นได้น้อยตามไปด้วย ในทางกลับกันที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทำให้การผลิตกรดกลูตามิกเกิดได้น้อยเช่นกัน

John และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเศษเหลือแป้งมันสำปะหลังและกากอ้อย โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ด้วยกระบวนการ SSF และใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยสารตั้งต้น ทำการทดลองที่อุณหภูมิต่างกัน (25, 30, 37, 44, และ 51องศาเซลเซียส) พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. delbrueckii* มากที่สุด เชื้อจะสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 249 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพที่ 10 การผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในกระบวนการ SSF ที่อุณหภูมิต่างกัน

(a) การเจริญเติบโตของเชื้อ (b) ปริมาณคีเฟอรัน (c) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Figure10 Kefiran production by *L. kefiranofaciens* from sago starch in SSF mode at various temperature

(a) cell growth (b) total kefiran (c) reducing sugar

สำหรับผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นอกจากจะให้ปริมาณคีเฟอรันที่สูงสุดแล้ว เมื่อนำปริมาณคีเฟอรันที่ได้มาคำนวณเทียบต่อหน่วยเวลา จะให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงที่สุดด้วยเช่นกัน โดยอัตราการผลิตจะลดลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) พบว่าทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (28, 30, 32,และ 35 องศาเซลเซียส) จะมีอัตราการผลิตแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีอัตราการผลิตสูงสุด 8.50 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคืออุณหภูมิ 28, 32, และ 35 องศาเซลเซียส มีอัตราการผลิตเท่ากับ 7.65, 5.70 และ 4.7 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 อัตราการผลิตคีเฟอรันเริ่มต้นจากเชื้อ *L .kefiranofaciens* ที่อุณหภูมิต่างกัน

Table 6 Initial production rate of kefiran by *L .kefiranofaciens* at various temperature

Temperature (°C)	Initial production rate (mg/L/h)
28	7.65 ± 0.70^{a}
30	8.50 ± 0.14^{b}
32	5.70 ± 1.27^{c}
35	4.70 ± 0.85^{c}

a, b and c : Statistically significantly different ($p < 0.05$)

1.4 ผลของความเข้มข้นของแป้งสาคูที่ใช้เป็นสารตั้งต้น

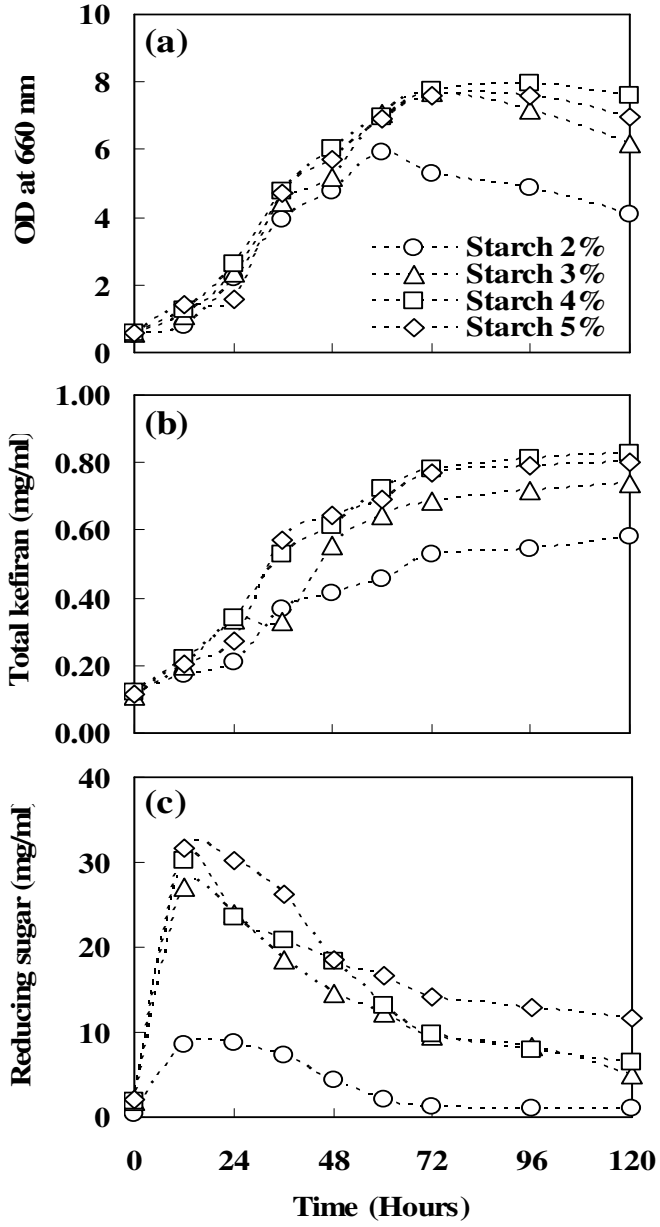
การทดลองเพื่อศึกษาความเข้มข้นของแป้งสาคูเริ่มต้นที่เหมาะสมในการใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตคีเฟอรันจากเชื้อ *L. kefiranofaciens* ด้วยกระบวนการ SSF ทำการทดลองในอาหาร MRS-sago starch โดยใช้แป้งที่ผ่านการให้ความร้อน (ความเข้มข้นแป้งสาคูร้อยละ 2, 3, 4 และ 5) ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 100 ยูนิตต่อกรัมแป้ง พีเอชเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 120 รอบต่อนาที ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 11a, b และ c แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ ปริมาณคีเฟอรัน และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามลำดับ พบว่าที่ความเข้มข้นของแป้งสาคูต่ำสุดร้อยละ 2 จะให้การเจริญเติบโตของเชื้อต่ำที่สุด (ภาพ 11a) ในขณะที่การเจริญเติบโตของเชื้อที่ความเข้มข้นแป้งร้อยละ 3-5 ไม่มีความแตกต่างกันในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมงที่ 0-48) แต่จะมีความแตกต่างกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 เป็นต้นไป ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งที่ความเข้มข้นต่างกันจะทำให้ได้แหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของเชื้อในปริมาณที่ต่างกัน โดยแป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่น้อยและลดลงเร็วตั้งแต่ ชม.ที่ 36 (ดังแสดงในภาพที่ 11c) ซึ่งจะทำให้ในช่วงนั้นมีสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเติบโตของเชื้อ ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้น้อยที่สุด ในขณะที่ความเข้มข้นของแป้งสาคูที่ร้อยละ 3, 4 และ 5 ยังมีปริมาณน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนอยู่ในปริมาณที่สูง จึงทำให้เชื้อยังคงเจริญเติบโตต่อไปได้

สำหรับปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ พบว่าปริมาณคีเฟอรันจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแป้งสาคูที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 11b) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าที่ความเข้มข้นของแป้งสาคูร้อยละ 5 จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบสูงที่สุด (31.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่จะพบว่าที่ความเข้มข้นของแป้งสาคูร้อยละ4 จะให้ปริมาณคีเฟอรันสูงสุด (0.83 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือที่ความเข้มข้นแป้งสาคูร้อยละ 5 (0.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทั้งนี้เนื่องมาจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกินไปจะไปยับยั้งการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ (Bebic *et al*., 2000) จากผลการทดลองที่ได้ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความสามารถของเชื้อ *L. kefiranofaciens*ในการนำสารคาร์โบไฮเดรตไปใช้มีข้อจำกัดอยู่ที่ความเข้มข้นแป้งร้อยละ 4 เช่นเดียวกับการทดลองของ Anuradha และคณะ (1999) ที่ทำการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* โดยใช้แป้งมันฝรั่งเป็นสารตั้งต้นร่วมกับการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ด้วยกระบวนการ SSF ทำการทดลองที่ความเข้มข้นแป้ง 10, 30, 100, 150 และ 250 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นแป้งมันฝรั่ง 10 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดแลคติกต่อสารตั้งต้นสูงที่สุดร้อยละ 82 นอกจากนี้แม้ว่าที่ความเข้มข้นแป้ง 100-250 กรัมต่อลิตร จะให้น้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณที่สูงในช่วงแรกของการทดลอง แต่เมื่อเข้าสู่ช่วง lag phase เชื้อจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้เท่าที่ควรเนื่องจากมีความเข้มข้นที่สูงของน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบเป็นตัวยับยั้ง

Roy และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* (NCIM 2365) ด้วยกระบวนการ SSF จากแป้งมันฝรั่งร่วมกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่ความเข้มข้นแป้งต่างกัน 3 ระดับ (30-200 กรัมต่อลิตร) พบว่าที่ความเข้มข้นแป้ง 200 กรัมต่อลิตรจะให้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดแลคติกสูงที่สุด แต่เมื่อเทียบผลผลิตต่อหน่วยสารตั้งต้น พบว่าที่ความเข้มข้นแป้ง 30 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตต่อหน่วยสูงที่สุด (1.33 กรัมต่อกรัมแป้ง)

Saha (2006) ทำการศึกษาการผลิตแมนนิทอลจากเชื้อ *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 ด้วยกระบวนการ SSF โดยมีอินนูลิน (ที่ความเข้มข้นร้อยละ 15-35) เป็นสารตั้งต้นร่วมกับการใช้เอนไซม์อินนูลิเนสเข้มข้น 8 ยูนิตต่อกรัมสารตั้งต้น ผลการทดลองที่ได้พบว่าที่ความเข้มข้นของอินนูลินเริ่มต้นร้อยละ 30 จะให้ผลผลิตของแมนนิทอลสูงสุด 207.4 กรัมอินนูลินเริ่มต้น ภายในเวลา 72 ชั่วโมง

นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองที่พบว่าความเข้มข้นของแป้งที่เป็นสารตั้งต้นจะส่งผลทั้งต่อการทำงานของเอนไซม์และการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อ (Mojovic *et al*., 2006) และในปี 2005, Huang และคณะ ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยใช้เชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* ทำการเลี้ยงเชื้อและย่อยแป้ง ด้วยกระบวนการ SSF ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 12.5-62.8 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นแป้งมันฝรั่ง 20 กรัม สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 0.85-0.92 กรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้นของแป้ง 20-40 กรัมจะเป็นตัวยับยั้งความสามารถของเชื้อในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งให้สูงขึ้นมากกว่าร้อยละ 40 จะเป็นการยับยั้งการผลิดกรดของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์



ภาพที่ 11 การผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในกระบวนการ SSF ที่ความเข้มข้นแป้งสาคูต่างกัน

(a) การเจริญเติบโตของเชื้อ (b) ปริมาณคีเฟอรัน (c) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Figure11 Kefiran production by *L. kefiranofaciens* from sago starch in SSF mode with various sago starch concentrations

(a) cell growth (b) total kefiran (c) reducing sugar

สำหรับผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้ ถึงแม้ที่ความเข้มข้นของแป้งสาคูร้อยละ 4 และ 5 จะให้ปริมาณคีเฟอรันที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อนำปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้มาเทียบต่อหน่วยเวลา เพื่อหาอัตราการผลิต พบว่าที่ความเข้มข้นแป้งร้อยละ 4 ให้อัตราการผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 11.25 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ดังตารางที่ 7) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราการผลิตคีเฟอรันมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่สูงขึ้นก็จริง แต่เมื่อถึงจุดหนึ่ง (ความเข้มข้นแป้งร้อยละ 5) อัตราการผลิตจะลดลงเนื่องจากเกิดการยับยั้งจากสารตั้งต้น (substrate inhibition) โดยในการทดลองนี้ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นนอกจากจะมีผลต่อกระบวนการย่อยแป้งแล้ว ยังมีผลต่อกระบวนการผลิตคีเฟอรันอีกด้วย ดังนั้นการเลือกความเข้มข้นของสารตั้งต้นให้เหมาะสม ควรพิจารณาจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้อัตราการผลิตสูงสุดเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดการยับยั้งจากสารตั้งต้น

ตารางที่7 อัตราการผลิตคีเฟอรันเริ่มต้นจากเชื้อ *L. kefiranofaciens* ที่ความเข้มข้นแป้งสาคูเริ่มต้นต่างกัน

Table 7 Initial production rate of kefiran by *L. kefiranofaciens* at various sago starch concentrations

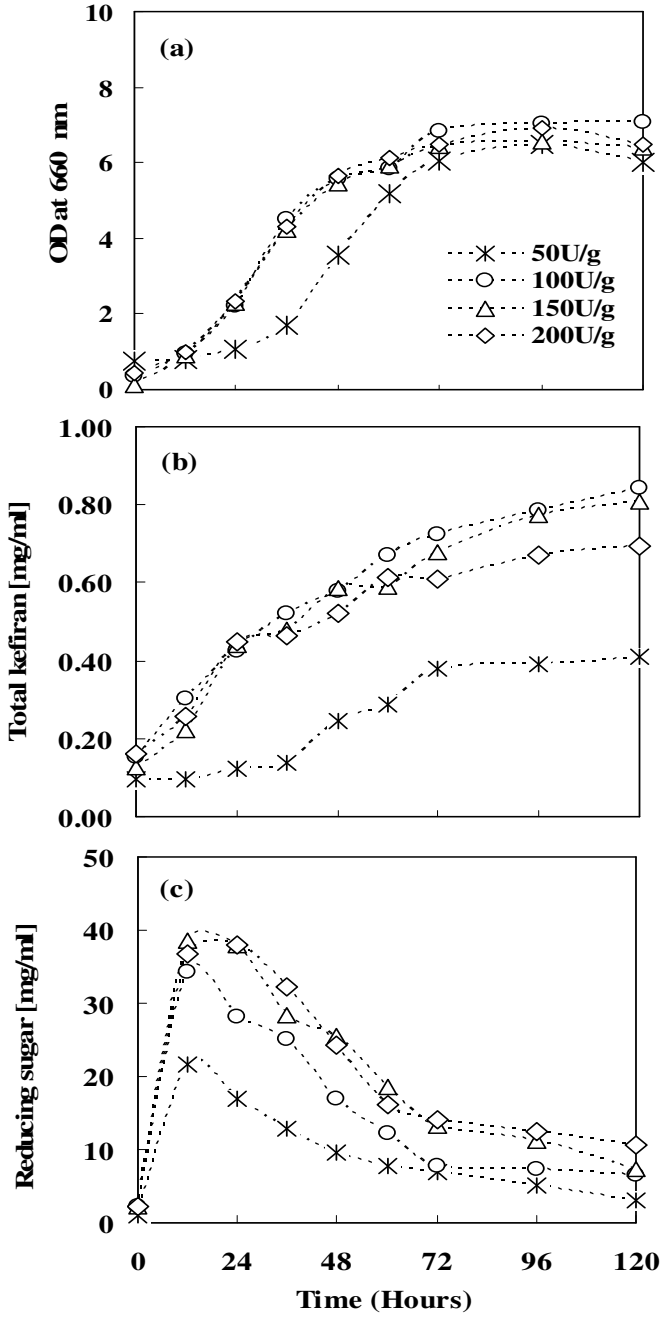
Sago starch (%)	Initial production rate (mg/L/h)
2	8.50 ± 0.14^{a}
3	9.35 ± 0.78^{b}
4	11.25 ± 0.78^{c}
5	10.10 ± 0.85^{c}

a, b and c : Statistically significantly different ($p < 0.05$)

1.5 ผลของอัตราส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ผสมต่อกรัมแป้งสาคู

การทดลองเพื่อศึกษาอัตราส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ผสมต่อกรัมแป้งที่เหมาะสมในการย่อยแป้งสาคูเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตคีเฟอรันจากเชื้อ *L. kefiranofaciens* ด้วยกระบวนการ SSF ทำการทดลองในอาหาร MRS-sago starch ความเข้มข้นแป้งสาคูที่ผ่านการให้ความร้อนที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 พีเอชเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 120 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสมต่างกัน (50, 100, 150 และ 200 ยูนิตต่อกรัมแป้ง) ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 12 a, b และ c แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ ปริมาณคีเฟอรัน และปริมาณน้ำตารีดิวซ์ ตามลำดับ

โดยจากผลการทดลองที่ได้พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 100, 150 และ 200 ยูนิตต่อกรัมแป้งจะให้การเจริญเติบโตของเชื้อที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ชุดการทดลองที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 50 ยูนิตของกรัมแป้ง จะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำสุด (ภาพที่ 12 a) เช่นเดียวกับปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ (ภาพที่ 12 b) พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 100, 150 และ 200 ยูนิตต่อกรัมแป้งจะให้ปริมาณคีเฟอรันใกล้เคียงกัน และที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 50 ยูนิตต่อกรัมแป้งจะให้ปริมาณคีเฟอรันต่ำสุด (0.84, 0.81, 0.70 และ 0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำตารีดิวซ์ที่ได้จากชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 50 ยูนิตต่อกรัมแป้งจะมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ (ภาพที่ 12 c) เหตุผลเนื่องมาจากที่ชุดการทดลองดังกล่าวมีปริมาณเอนไซม์ผสมที่จะเข้าไปทำปฏิกิริยาย่อยแป้งสาคูให้กลายเป็นน้ำตารีดิวซ์ได้ปริมาณที่น้อย ทำให้มีปริมาณแป้งสาคูที่ยังไม่ถูกย่อยเหลืออยู่ในระบบมาก แต่มีปริมาณน้ำตารีดิวซ์ที่เชื้อสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตมีอยู่น้อย การเจริญเติบโตของเชื้อจึงเกิดขึ้นได้น้อย มีผลให้เกิดการผลิตคีเฟอรันได้ต่ำตามไปด้วย ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 150 และ 200 ยูนิตต่อกรัมแป้ง มีปริมาณเอนไซม์ที่จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับแป้งสาคูในปริมาณมาก สามารถทำให้เกิดน้ำตารีดิวซ์ในระบบสูง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อ ทำให้ในชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 150 และ 200 ยูนิตต่อกรัมแป้ง มีปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อ *L. kefiranofaciens* ผลิตได้น้อยกว่าในชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 100 ยูนิตต่อกรัมแป้ง เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Anuradha และคณะ (1999) ที่พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อกรัมแป้งที่ต่ำหรือสูงเกินไป จะไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Lactobacillus delbruckii*



ภาพที่ 12 การผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในกระบวนการ SSF ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ผสมต่อกรัมแป้งสาคูต่างกัน

(a) การเจริญเติบโตของเชื้อ (b) ปริมาณคีเฟอรัน (c) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Figure 12 Kefiran production by *L. kefiranofaciens* from sago starch in SSF mode with different levels of mixed-enzymes per gram starch

(a) cell growth (b) total kefiran (c) reducing sugar

Charoenlap และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากแป้งสาคูโดยใช้เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ตรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus circulans* ทำการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ (10, 30 และ 50 ยูนิต) ต่อกรัมแป้งสาคูที่เหมาะสม ผลการทดลองที่ได้พบว่า ที่อัตราส่วนเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ตรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส 50 ยูนิตต่อกรัมแป้งสาคูจะผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินได้สูงสุด 25.97 กรัมต่อลิตร

Mojovic และคณะ (2006) รายงานการใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ทางการค้า Termamyl และ Supersan ในการย่อยแป้งข้าวโพดเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลจากเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อกรัมแป้งมีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง ถ้าใช้เอนไซม์ผสมที่ความเข้มข้นต่ำ (240 AGUต่อกรัมแป้ง) จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำ ในทางกลับกันถ้าใช้เอนไซม์ผสมที่ความเข้มข้นสูง (480 AGUต่อกรัมแป้ง) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะมีความเข้มข้นสูงและเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae*

Tanaka และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากฟางข้าว โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 ด้วยกระบวนการ SSF ทำการย่อยฟางข้าวโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส และใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากัน (10กรัมต่อลูกบาศก์เมตร) ผลการทดลองที่ได้พบว่าปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยฟางข้าวเท่ากับ 22.5, 15.9 และ 28.5 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร

เมื่อนำปริมาณคีเฟอรันที่ได้จากแต่ละความเข้มข้นของเอนไซม์ผสมต่อกรัมแป้งสาคูมาคำนวณเทียบต่อหน่วยเวลา พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 100 ยูนิตต่อกรัมแป้ง จะให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงที่สุด 11.25 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 150, 200 และ 50 ยูนิตต่อกรัมแป้ง ให้อัตราการผลิตคีเฟอรัน 10.35, 8.70 และ 3.53 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าที่ความเข้มข้นเอนไซม์ผสม 100 และ 150 ยูนิตต่อกรัมแป้งให้อัตราการผลิตคีเฟอรันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 100 ยูนิต จะใช้ปริมาณเอนไซม์น้อยกว่าที่ 150 ยูนิต ทำให้มีค่าใช่จ่ายน้อยกว่า จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ต่อไป

ตารางที่ 8 อัตราการผลิตคีเฟอรันเริ่มต้นจากเชื้อ *L. kefiranofaciens* ที่ปริมาณเอนไซม์ผสมต่อกรัมแป้งสาคูต่างกัน

Table 8 Initial production rate of kefiran by *L.kefiranofaciens* at various levels of mixed-enzymes per gram starch

Mixed-enzymes(U/g starch)	Initial production rate(mg/L/h)
50	3.53 ± 0.32[a]
100	11.25 ± 0.78[b]
150	10.35 ± 0.78[b]
200	8.70 ± 0.16[c]

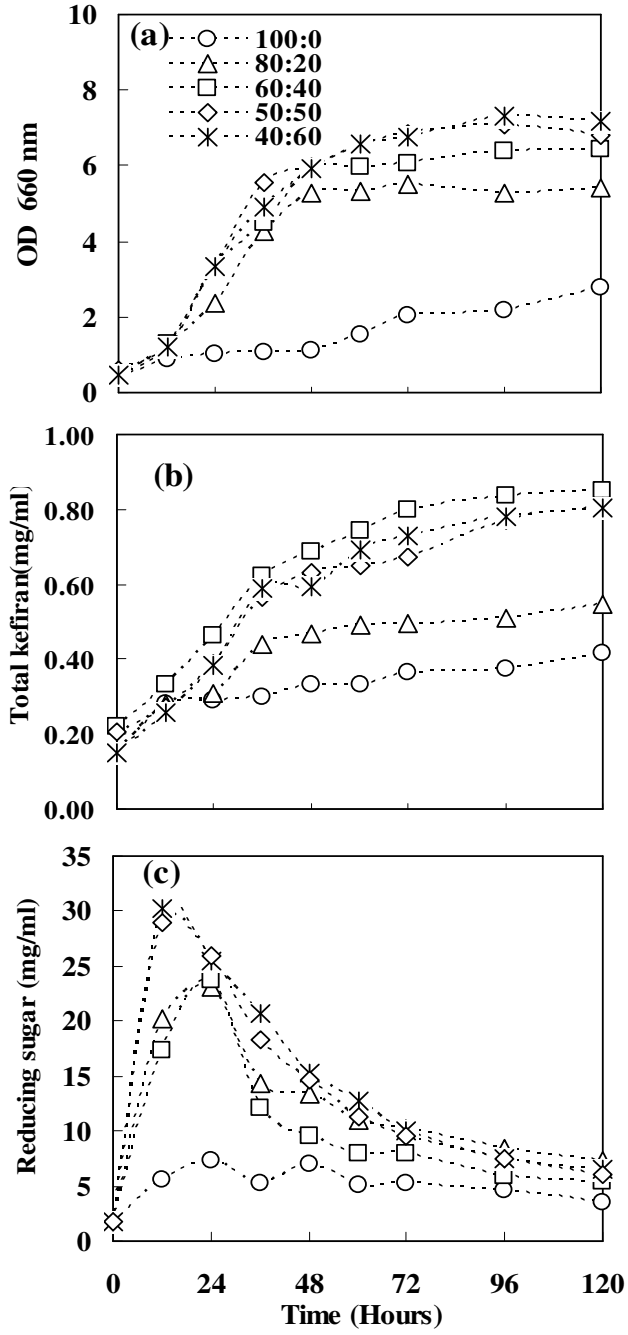
a, b and c : Statistically significantly different ($p < 0.05$)

1.6 ผลของอัตราส่วนของเอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟา-อะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

การศึกษาอัตราส่วนของเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมในการย่อยแป้งสาคูเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตคีเฟอรันจากเชื้อ *L. kefiranofaciens* ทำการทดลองในอาหาร MRS-sago starch โดยใช้แป้งสาคูที่ผ่านการให้ความร้อนที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 พีเอชเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 120 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 100 ยูนิตต่อกรัมแป้ง ใช้อัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่ 100:0, 80:20, 60:40, 50:50 และ 40:60 ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 13 a, b และ c แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ ปริมาณคีเฟอรัน และปริมาณน้ำตารีดิวซ์ ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้พบว่าอัตราส่วนของเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ 60:40, 50:50 และ 40:60 ให้การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. kefiranofaciens* ใกล้เคียงกัน ในขณะที่อัตราส่วน 80:20 มีอัตราการเจริญของเชื้อต่ำ และที่อัตราส่วน 100:0 ให้การเจริญเติบโตของเชื้อต่ำสุด (ภาพที่13a) เมื่อพิจารณาการผลิตคีเฟอรันของเชื้อที่อัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ทั้ง 5 อัตราส่วนพบว่าคล้ายกับการเจริญเติบโตของเชื้อ (ภาพที่13b) โดยที่อัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ 60:40, 50:50 และ 40:60 มีการผลิตคีเฟอรันได้สูงสุดใกล้เคียงกันประมาณ 0.80 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร ที่อัตราส่วนเอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ 80:20 และ 100:0 สามารถผลิตคีเฟอรันได้เพียง 0.56 และ 0.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณน้ำตาลที่ได้จากอัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแต่ละอัตราส่วนนั้นแตกต่างกัน (ภาพที่13c) ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* เป็นอย่างมาก

ในการทดลองเพื่อผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* ด้วยกระบวนการ SSF การย่อยแป้งจัดเป็นขั้นตอนแรกในการทดลอง เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สำหรับนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ ในการเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่จะเข้าไปสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ตำแหน่ง α-1,4 ได้เป็นพอลิเมอร์สายสั้นๆ และอาศัยการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่จะตัดปลายสายพอลิเมอร์ที่มีหมู่รีดิวซิงเข้าไปทีละหน่วยได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เชื้อจะสามารถนำไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ (Nigam and Singh, 1995) ซึ่งในชุดการทดลองที่มีอัตราส่วนของเอนไซม์ผสมแอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เท่ากับ 100:0 จะมีแต่เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแต่ไม่มีเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่จะย่อยพอลิเมอร์ของแป้งสายสั้นให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์โมเลกุลเดี่ยวได้ ในชุดการทดลองนี้จึงมีแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ของเชื้อ ส่งผลให้การเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* เกิดขึ้นได้น้อยมากเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ในขณะเดียวกันที่ชุดการทดลองที่มีอัตราส่วนของเอนไซม์ผสม 80:20 ถึงแม้จะมีเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด แต่มีเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสัดส่วนที่น้อย การทำงานที่จะผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จึงไม่ทันต่อความต้องการนำไปใช้ของเชื้อ จึงมีการเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันเกิดขึ้นได้น้อยเช่นกัน และสำหรับในชุดการทดลองที่อัตราส่วนของเอนไซม์ผสมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เท่ากับ 60:40, 50:50 และ 40:60 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากการตัดปลายหมู่รีดิวซิงของสายพอลิเมอร์ของแป้งให้ได้เป็นน้ำตาล เกิดจากการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ดังนั้นเมื่ออัตราส่วนของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบจึงเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ทำให้ในชุดการทดลองนี้มีอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันเพิ่มสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลที่มากเกินไปจะเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อด้วยเช่นกัน (Bebic *et al*., 2000; Huang *et al*., 2005) ซึ่งในการทดลองนี้ที่อัตราส่วนเอนไซม์ผสมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เท่ากับ 60:40 มีการผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด



ภาพที่ 13 การผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในกระบวนการ SSF ที่อัตราส่วนเอนไซม์ผสมแอลฟา-อะไมเลสต่อกลูโคอะไมเลสต่างกัน

(a) การเจริญเติบโตของเชื้อ (b) ปริมาณคีเฟอรัน (c) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Figure 13 Kefiran production by *L. kefiranofaciens* from sago starch in SSF mode with different ratios of mixed-enzymes (α-amylase to glucoamylase)

(a) cell growth (b) total kefiran (c) reducing sugar

Mojovic และคณะ (2006) รายงานการใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ทางการค้า Termamyl และ Supersan ในการย่อยแป้งข้าวโพดเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลจากเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ทำการศึกษาโดยใช้เอนไซม์ผสม Termamyl ต่อ Supersan ที่อัตราส่วน1:2, 1:3 และ 1:4 ผลการทดลองที่ได้พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของเอนไซม์ Supersan ที่เพิ่มขึ้น

นอกจากนี้เมื่อนำปริมาณคีเฟอรันที่ได้จากอัตราส่วนเอนไซม์ผสมแต่ละอัตราส่วนมาคำนวณเทียบต่อหน่วยเวลาเพื่อหาอัตราการผลิต พบว่าที่อัตราส่วนเอนไซม์ผสม 60:40 นอกจากจะให้ปริมาณคีเฟอรันที่สูงสุดแล้ว ยังมีอัตราการผลิตคีเฟอรันสูงที่สุดด้วยเช่นกัน โดยอัตราเร็วในการการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* จะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0-40 แต่เมื่อเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50 อัตราเร็วของการผลิตจะเริ่มคงที่จนถึงลดลงเล็กน้อย ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่าอัตราส่วนของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ร้อยละ 40-60 จะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อคำนึงถึงต้นทุนของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีราคาแพงกว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่อัตราส่วนของเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ 60:40 จึงเป็นอัตราส่วนเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ต่อไป

ตารางที่9 อัตราการผลิตคีเฟอรันเริ่มต้นจากเชื้อ *L. kefiranofaciens* ที่อัตราส่วนเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่างกัน

Table 9 Initial production rate of kefiran by *L.kefiranofaciens* at various ratios of α- amylase to glucoamylase

Ratio of α-amylase to glucoamylase	Initial production rate(mg/L/h)
100:0	3.70 ± 0.14^{a}
80:20	7.00 ± 0.10^{b}
60:40	11.83 ± 1.87^{c}
50:50	11.25 ± 0.78^{c}
40:60	9.95 ± 0.78^{c}

a, b and c : Statistically significantly different ($p < 0.05$)

2. ผลของปริมาณเชื้อ *L. kefiranofaciens* เริ่มต้นที่เหมาะสม

การทดลองเพื่อศึกษาปริมาณของหัวเชื้อ *L. kefiranofaciens* ที่เหมาะสมต่อการผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคู ด้วยกระบวนการ SSF ทำการทดลองในอาหาร MRS-sago starch ความเข้มข้นแป้งสาคูที่ผ่านการให้ความร้อนร้อยละ 4 พีเอชเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 120 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 100 ยูนิตต่อกรัมแป้ง ใช้อัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ 60:40โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 2, 5, 7 และ 10 ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 14 a, b และ c แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ ปริมาณคีเฟอรันและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามลำดับ

พบว่าในช่วงแรกชุดการทดลองที่มีปริมาณเชื้อ *L. kefiranofaciens* เริ่มต้นสูง (ร้อยละ 7 และ 10) จะมีอัตราการเจริญเติบโต และการผลิตคีเฟอรันเป็นไปอย่างรวดเร็วกว่าชุดการทดลองที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่ำ (ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-48) แต่หลังจากนั้นจะพบว่าการเจริญของเชื้อในชุดทดลองดังกล่าวจะเริ่มคงที่และลดลง ในขณะที่ในชุดทดลองที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่ำ (ร้อยละ 2 และ 5) จะพบว่าในช่วงแรกเชื้อจะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ แต่จะค่อยๆมีการปรับตัวและท้ายสุดจะมีอัตราการเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูง (ร้อยละ 7 และ 10) ทั้งนี้เนื่องจากในขณะที่เชื้อ *L. kefiranofaciens* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกมีการเจริญเติบโตจะมีการผลิตกรดแลคติกออกมาด้วย (Narayanan *et al*., 2004) ทำให้ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าลดลง (ภาพที่ 15) โดยชุดการทดลองที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูง ก็จะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงแรก พร้อมกันนั้นก็จะมีการสร้างกรดออกมา เมื่อค่าพีเอชในสภาวะการเลี้ยงเชื้อลดต่ำลง เชื้อก็จะมีการเจริญเติบโตที่ช้าลงตามไปด้วย ในขณะที่ในชุดการทดลองที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่ำ ก็จะมีการเจริญเติบโตที่ต่ำในช่วงแรก แต่จะมีกรดซึ่งเป็นตัวลดค่าพีเอชในปริมาณที่น้อยด้วยเช่นกัน เชื้อจึงยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

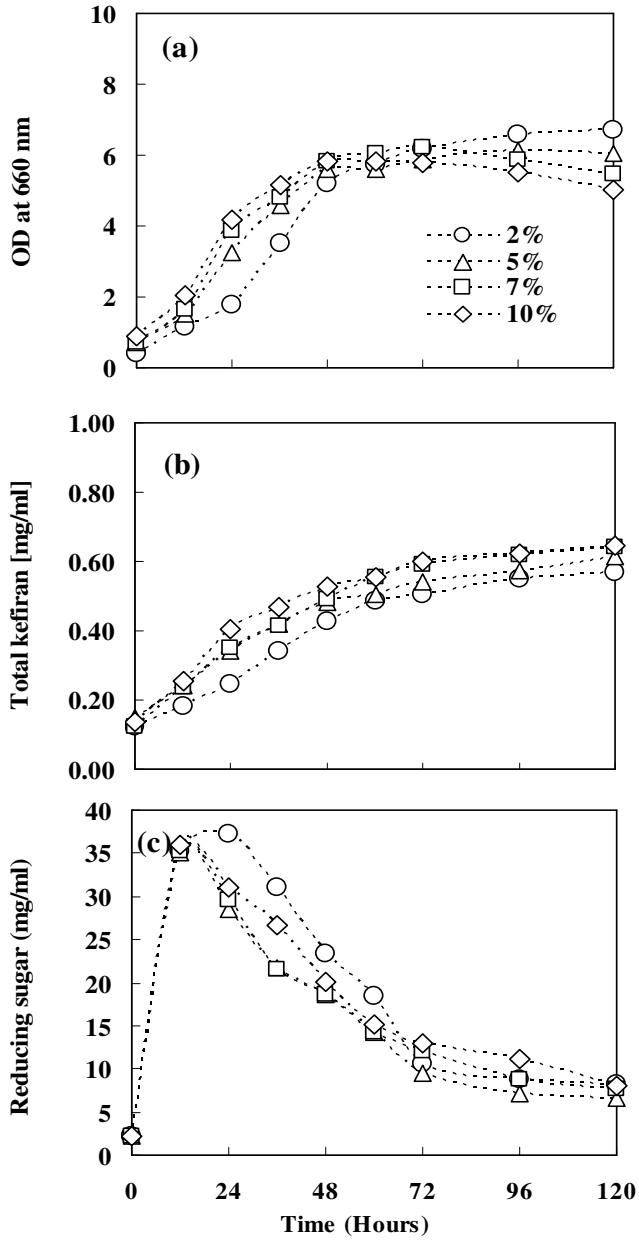
สำหรับการผลิตคีเฟอรันทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นต่างกัน (ร้อยละ 2, 5, 7 และ 10) พบว่ามีแนวโน้มการผลิตคีเฟอรันที่ใกล้เคียงกันทั้ง 4 ชุดการทดลอง (ภาพที่ 14 b) โดยจะพบว่าชุดการทดลองที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูงจะสามารถผลิตคีเฟอรันในช่วงแรกได้สูงกว่าชุดการทดลองที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่ำกว่า แต่เมื่อสิ้นสุดเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ 120 ชั่วโมง จะพบว่าปริมาณคีเฟอรันที่ได้จากทั้ง 4 ชุดการทดลองที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2, 5, 7 และ 10 จะมีค่าใกล้เคียงกัน (0.57, 0.61, 0.64 และ 0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับการทดลองของ Mojovic และคณะ (2006) ที่พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อปริมาณผลผลิตที่ได้มากนัก

สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบ พบว่าจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเชื้อ (ภาพที่ 14c) โดยในช่วงแรกชุดการทดลองที่มีปริมาณเชื้อสูง (ร้อยละ 7 และ 10) น้ำตาลรีดิวซ์ในระบบจะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเชื้อมีการนำไปใช้สูงกว่าเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่ำ (ร้อยละ 2 และ 5) แต่เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไป 60 ชั่วโมงจนถึง 120 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในระบบไม่มีความแตกต่างกัน

Jyothi และคณะ (2005) ทำการศึกษาการผลิตกรดกลูตามิกจากเศษเหลือแป้งมันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Brevibacterium divaricatum* ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 3, 5, 7 และ 10 ผลการทดลองที่ได้พบว่า การผลิตกลูตามิกจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณหัวเชื้อที่เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 3-7 แต่เมื่อเพิ่มเป็นร้อยละ 10 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่มากเกินไปจะเกิดการยับยั้งการผลิตได้ และที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 7 จะให้ปริมาณกรดกลูตามิกสูงสุด 3.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับการทดลองของ Mojovic และคณะ (2006) ที่ทำการผลิตเอทานอลจากซังข้าวโพดที่ผ่านการย่อยแล้ว โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ทำการทดลองโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 1, 1.35 และ 2 ผลการทดลองที่ได้พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นทั้ง 3 ระดับให้ผลผลิตเอทานอลใกล้เคียงกันเท่ากับร้อยละ 78.5, 80.1 และ 81.6 ตามลำดับ แต่ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2 จะใช้เวลาในการผลิตสั้นที่สุดเพียง 30 ชั่วโมงหลังการหมัก

จากผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้ เมื่อนำปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้มาคำนวณเทียบต่อหน่วยเวลาเพื่อหาอัตราการผลิต พบว่าถึงแม้ผลผลิตคีเฟอรันที่ชั่วโมงสุดท้ายของการผลิตจะมีค่าใกล้เคียงกัน (0.57-0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่อัตราการผลิตคีเฟอรันที่ได้จากปริมาณเชื้อเริ่มต้นแต่ละชุดการทดลองให้อัตราเร็วในการผลิตต่างกัน โดยอัตราเร็วในการผลิตคีเฟอรันจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้น และที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 จะให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงสุด รองลงมาคือที่ร้อยละ 7, 5 และ 2 โดยให้อัตราเร็วในการผลิตเท่ากับ 11.1, 9.4, 8.7 และ 6.7 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 16

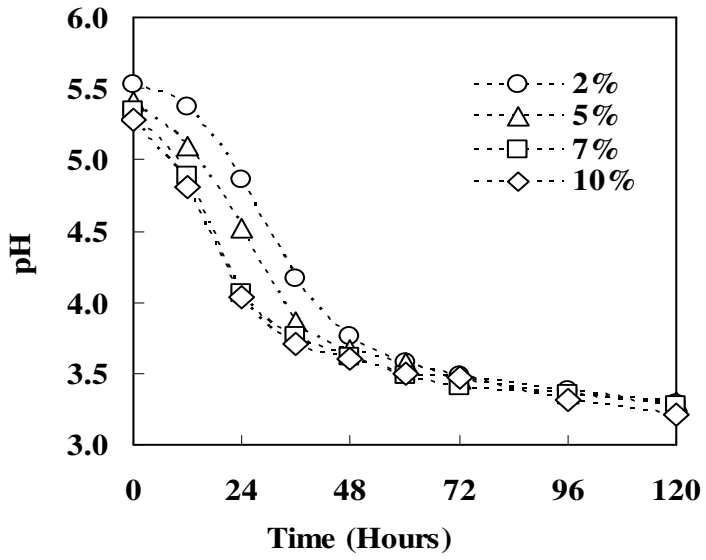


ภาพที่ 14 การผลิตคีเฟอรันเริ่มต้นจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* ร่วมกับกระบวนการ SSF ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างกัน

(a) การเจริญเติบโตของเชื้อ (b) ปริมาณคีเฟอรัน (c) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

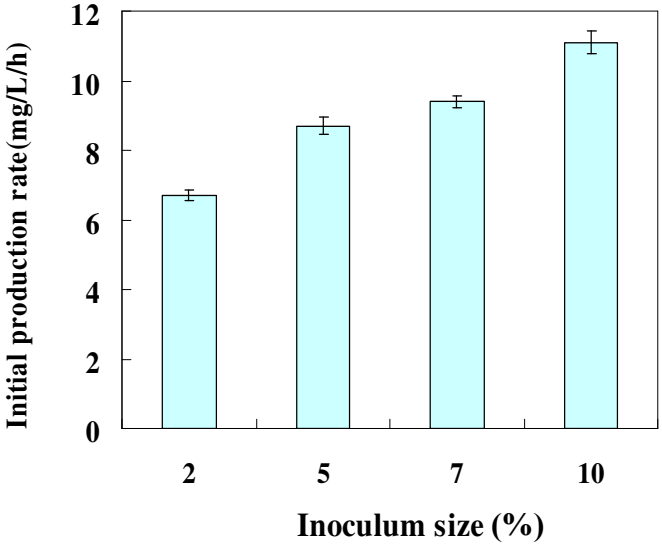
Figure 14 Kefiran production by *L. kefiranofaciens* from sago starch with various amout of inoculum size

(a) cell growth (b) total kefiran (c) reducing sugar



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในอาหาร MRS-sago starch ที่ปริมาณเชื้อ เริ่มต้นต่างกัน

Figure 15 Time course of pH in MRS-sago starch at various inoculum sizes



ภาพที่ 16 อัตราการผลิตคีเฟอรันเริ่มต้นจากเชื้อ *L. kefiranofaciens* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างกัน

Figure16 Initial production rate of kefiran by *L.kefiranofaciens* at various inoculum sizes

3. การขยายขนาดการทดลอง

จากผลการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคู จากเชื้อ *L. kefiranofaciens* ด้วยกระบวนการ SSF โดยทำการทดลองในขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้อาหาร MRS-sago starch ที่ผ่านการให้ความร้อน ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นแป้งสาคูร้อยละ 4 พีเอชเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 120 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 100 ยูนิตต่อกรัมแป้ง ใช้อัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่ 60:40 และใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 10 จะเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคีเฟอรันมากที่สุด

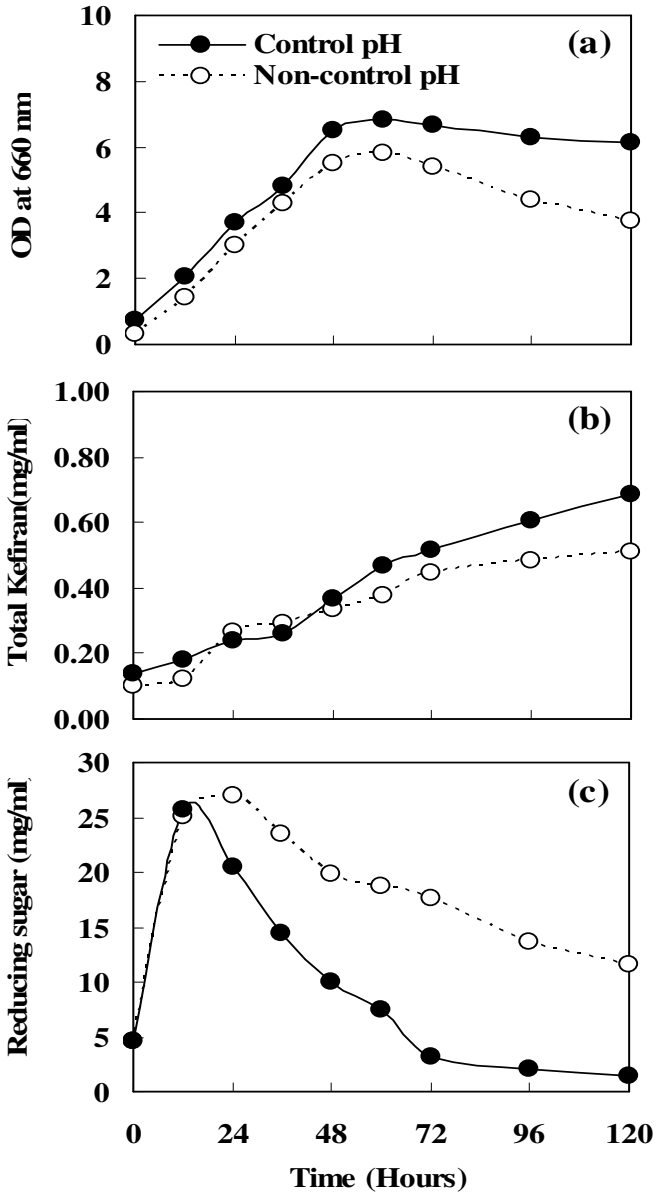
เมื่อนำสภาวะดังกล่าวมาขยายขนาดการทดลองในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร ทำการเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างชุดการทดลองที่ไม่ควบคุมพีเอช และควบคุมพีเอชให้เท่ากับ 5.5 ตลอดการทดลอง ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 17 a, b และ c แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ ปริมาณคีเฟอรัน และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้พบว่าในช่วงแรกของการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0-48) เชื้อจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันทั้ง 2 ชุดการทดลอง แต่ในชั่วโมงที่ 60 เป็นต้นไปชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชให้เท่ากับ 5.5 จะมีการเจริญเติบโตของเชื้อสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ควบคุมพีเอช ทั้งนี้เนื่องจากในชุดที่ไม่ควบคุมพีเอชมีค่าพีเอชที่ลดลงจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (ดังแสดงในภาพที่ 18)ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชจะมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *L. kefiranofaciens* (Cheirsilp *et al*., 2001) ทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ต่อเนื่องต่อไป สำหรับการผลิตคีเฟอรัน พบว่าจะเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเจริญเติบโต นั่นคือในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชุดการทดลองจะมีการผลิตคีเฟอรันไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 60 ชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชจะมีการผลิตคีเฟอรันสูงกว่าชุดที่ไม่ควบคุมพีเอช (ภาพที่ 17b) เนื่องจากสภาวะที่มีความเป็นกรดจะเป็นตัวยับยั้งการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อ โดยชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอช จะสามารถผลิตคีเฟอรันได้เท่ากับ 0.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับชุดการทดลองที่ไม่มีการควบคุมพีเอชผลิตได้เพียง 0.51 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Anuradha และคณะ (1999) ที่พบว่าเมื่อค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอยู่ในช่วง 4.0-4.5 จะทำให้การผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ลดลง อย่างไรก็ตามในการปรับค่าพีเอชที่ต้องทำการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป ทำให้ความเข้มข้นของคีเฟอรันเจือจาง ดังนั้นเมื่อคำนวณปริมาณคีเฟอรันต่อปริมาตรโดยไม่คิดการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะพบว่าสามารถผลิตคีเฟอรันภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมพีเอชได้ 0.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น

ผลผลิตร้อยละ 2.2 ของแป้งสาคูทั้งหมด ซึ่งใกล้เคียงกับการผลิตคีเฟอรันของ Cheirsilp และคณะ (2001) ที่ผลิตคีเฟอรันได้ร้อยละ 2.5 ของน้ำตาลแลคโตสทั้งหมด

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อขยายขนาดการผลิตจากระดับขวดดูแรนเป็นระดับถังหมัก ปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้จะลดลง เนื่องจากการนำแป้งปริมาณมากไปให้ความร้อนจะเกิดปัญหาความหนืดสูง เอนไซม์ผสมไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ทั่วถึง ทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อลดลง รวมไปถึงอากาศในถังหมักซึ่งมีปริมาตรที่มากกว่าในขวดดูแรนก็ยังมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ เนื่องจาก *L. kefiranofaciens* เป็นแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (Vancanneyt *et al*., 2004) ดังนั้นปริมาตรอากาศในถังหมักจึงมีผลทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตและผลิตคีเฟอรันได้น้อยลง

ในภาพที่ 17c แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชจะมีปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง จากการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่มีการควบคุมพีเอชจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในระบบสูงกว่าชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอช เนื่องจากเชื้อมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าการนำแหล่งคาร์บอนไปใช้จึงน้อยกว่าตามไปด้วย

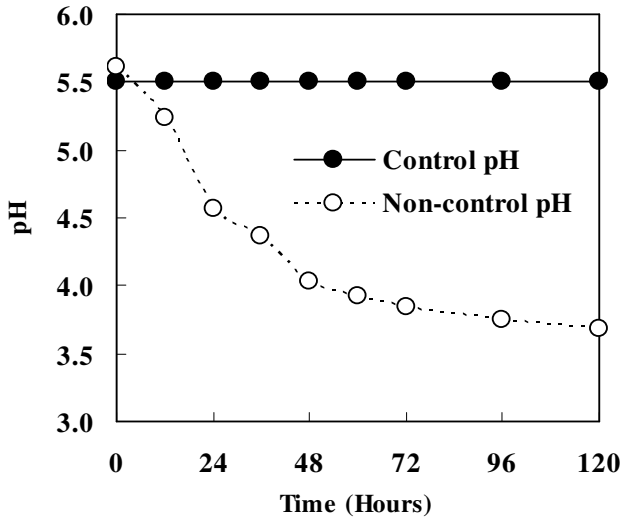
Ohkouchi และ Inoue (2006) ทำการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเศษเหลือทางอาหารโดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011 พบว่าการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชตลอดการทดลองเท่ากับ 4.5, 5.0 และ 5.5 ให้ผลการผลิตสูงกว่าไม่ควบคุมพีเอชถึง 2.5 เท่า และชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชเท่ากับ 5.0 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 48.7 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ชุดการทดลองที่ไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่าค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงมาถึง 3.5



ภาพที่ 17 การผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในกระบวนการ SSF ในระดับถังหมักที่มีการควบคุมพีเอชและไม่มีการควบคุมพีเอชเท่ากับ 5.5 ตลอดการทดลอง (a) การเจริญเติบโตของเชื้อ (b) ปริมาณคีเฟอรัน (c) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Figure 17 Kefiran production by *L. kefiranofaciens* from sago starch in fermenter (working volume 1.5 liter with control pH at 5.5 and non-control pH)

(a) cell growth (b) total kefiran (c) reducing sugar



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในระดับถังหมักที่ควบคุมพีเอช และไม่ควบคุมพีเอชเท่ากับ 5.5 ตลอดการทดลอง

Figure 18 Time course of pH in fermenter (working volme 1.5 liter, control pH at 5.5 and non-control pH)