สาขาวิทยาศาสตร์

การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องด้วยการหมักสองขั้นตอน

Continuous production of lactic acid with two-stage fermentation

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล[1] เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง[2] มีชัย ลัดดี[1] เกสร กิตติกุศลธรรม[1] สิทธิวัฒน์ เลิศศิริ[3]
ศุภพงศ์ ภูวพัฒนะพันธ์[1] และ Ayaaki Ishizaki[4]

Sarote Sirisansaneeyakul[1], Phenjun Mekvichitsaeng[2], Meechai Luddee[1], Kesorn Kittikusolthum[1],
Sittiwat Lertsiri[3], Supapong Bhuwapathanapun[1] , and Ayaaki Ishizaki[4]

บทคัดย่อ

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพอลิแลกเทต ซึ่งเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ เนื่องจากระบบการผลิตกรดแลกติกมีต้นทุนสูง จึงจำเป็นต้องพัฒนากระบวนการหมักกรดแลกติกที่ให้อัตราการผลิตสูงเพื่อลดต้นทุนการผลิตกรดแลกติก ในการศึกษานี้ได้พัฒนากระบวนการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องโดยใช้เชื้อ Lactococcus lactis IO-1 จากน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ เนื่องจากการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียวให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 4.71 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีปริมาณกลูโคสเหลือ 2.94 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.81 ต่อชั่วโมง เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ปริมาณกลูโคสที่เหลือจากถังหมักแรก จึงปรับปรุงกระบวนการผลิตเป็นการหมักแบบต่อเนื่องสองขั้นตอน ทำให้ได้อัตราการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นรวมเป็น 5.69 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อัตราการเจือจาง 0.83 และ 0.62 ต่อชั่วโมง ในถังหมักที่หนึ่งและสองตามลำดับ ซึ่งเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติกที่สูงกว่าการผลิตแบบเบ็ดเสร็จ (Q_P = 1.82 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) 3.3 เท่า

ABSTRACT

Lactic acid, an important organic acid, can be used as raw material for the production of polylactate, which is biodegradable material in plastic industries. Therefore, a process for lactic acid production has to be developed for increasing volumetric lactic acid productivity, in order to lower the cost of lactic acid production. In this work, continuous fermentation of lactic acid from cassava starch enzymatic hydrolysate using Lactococcus lactic IO-1 was investigated. With continuous single-stage fermentation of lactic acid production, the volumetric productivity and residual glucose of 4.71 g/l h and 2.94 g/l, respectively were obtained at dilution rate, D = 0.81 h^{-1}. In order to increase volumetric lactic acid productivity with well utilizing of residual glucose in the first fermentor, a continuous production of lactic acid by two-stage fermentation was studied. As a result, lactic acid productivity was increased to 5.69 g/l h and glucose was completely utilized at dilution rates of D_1 = 0.83 and D_2 = 0.62 h^{-1} in the first and the second fermentors, respectively. This volumetric lactic acid productivity was 3.3 times higher than that obtained from batch production of lactic acid fermentation (Q_p = 1.82 g/l h).

1 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University.

2 สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
Pilot Plant Development and Training Institute, King Mongkut's University of Technology.

3 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University.

4 Division of Bioresource and Environmental Science, Graduate School of Kyushu University, Japan.

คำนำ

แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่เป็นปริมาณมากในประเทศไทย สามารถเพิ่มมูลค่าของแป้งมันสำปะหลังได้โดยการย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลกลูโคสด้วยเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลสร่วมกับกลูโคอะมัยเลส แล้วใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติก เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมทางเคมี อาหาร และเภสัชกรรมต่อไป ยิ่งกว่านั้นกรดแลกติกยังใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสารพอลิแลกเทต ซึ่งเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Datta และคณะ, 1995) แต่เนื่องจากกระบวนการผลิตกรดแลกติกมีต้นทุนสูง จึงมีการศึกษาพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติกด้วยเทคนิควิธีการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (Sirisansaneeyakul และคณะ, 2000a) และวิธีการหมักแบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียว (Sirisansaneeyakul และคณะ, 2000b) ในงานวิจัยนี้เน้นศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องด้วยการหมักสองขั้นตอน เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติกให้สูงขึ้นกว่าการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จหรือแบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียว

อุปกรณ์และวิธีการ

อาหารเพาะเชื้อ

อาหารเพาะเชื้อประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ 10 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม พอลิเปปโตน 5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม ในปริมาตรน้ำกลั่น 1 ลิตร

การเตรียมกล้าเชื้อในฟลาสก์

เพาะเลี้ยง Lactococcus lactis IO-1 (Ishizaki และคณะ, 1990) ในอาหารสำเร็จรูป Thioglycolate (TGC) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยไม่เขย่า แล้วถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเพาะเชื้อ โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมัก

การเพาะเลี้ยงในถังหมัก

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเบ็ดเสร็จพร้อมกันในถังหมักที่หนึ่งและสองโดยกำหนดปริมาตรของอาหารเพาะเชื้อเท่ากับ 0.75 และ 1.00 ลิตร ในถังหมักที่หนึ่งและสองตามลำดับ ควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และพีเอช 6.0 เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นระบบการหมักแบบต่อเนื่องสองขั้นตอน โดยกำหนดให้อัตราการไหล (F) ของระบบการหมักเท่ากับ 0.62 ลิตรต่อชั่วโมง ทำให้ได้อัตราการเจือจาง (D) ในถังหมักที่หนึ่งและสองเท่ากับ 0.83 และ 0.62 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ทำการหมักแบบสองขั้นตอนอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 70 ชั่วโมง

วิธีการวิเคราะห์

วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยวิธีทางเอนไซม์ของกลูโคสออกซิเดส/เพอร์ออกซิเดส (Sigma, diagnostic kit no. 510-A) ปริมาณกรดแลกติกโดยวิธีของ Baker และ Summerson (1941) โดยใช้ Lithium lactate (L-2250, sigma) เป็นสารละลายมาตรฐาน และความเข้มข้นของเซลล์วิเคราะห์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีการอบแห้ง

ผลและวิจารณ์

Fig.1 แสดงผลการทดลองจากการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่องสองขั้นตอน พบว่าการหมักแบบต่อเนื่องของถังหมักแรก (Fig.1a) ระบบเริ่มปรับตัวเข้าสู่สถานะคงตัวที่ 12 ชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นกลูโคส กรดแลกติก และเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 3.52 5.19 และ 0.77 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีอัตราการผลิตกรดแลกติกในถังหมักแรก ($Q_{p,1}$) เท่ากับ 4.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียว (Q_p = 4.71 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ D = 0.81 ต่อชั่วโมง) (Sirisansaneeyakul และคณะ, 2000b) ส่วนการหมักแบบต่อเนื่องของถังหมักที่สอง (Fig. 1b) ระบบเข้าสู่สถานะคงตัวที่ 12 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน โดยมีความเข้มข้นของกลูโคส กรดแลกติก และเซลล์เท่ากับ 0.01 7.44 และ 1.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้อัตราการผลิตกรดแลกติกในถังหมักที่สอง ($Q_{p,2}$) เท่ากับ 1.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Table 1) ดังนั้นอัตราการผลิตกรดแลกติกของระบบการหมักแบบต่อเนื่องสองขั้นตอนเท่ากับ 5.69 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นอัตราการผลิตที่สูงกว่าการผลิตการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (Q_p = 1.82 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) และแบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียว (Q_p = 4.71 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) 3.3 และ 1.2 เท่า ตามลำดับ (Table 2)

Table 1 Kinetic parameters obtained from two-stage fermentation.

Stage	C_s	C_x	C_p	F	V	D	Yields (g/g)		Q_p^*
	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(l/h)	(l)	(h^{-1})	Yx/s	Yp/s	(g/l h)
I	3.52	0.77	5.19	0.62	0.75	0.83	0.14	0.95	4.30
II	0.01	1.54	7.44	0.62	1.00	0.62	0.22	0.64	1.39

* Volumetric productivity of lactic acid ($Q_{p,n}$) = D_n ($C_{p,n}$ - $C_{p,n-1}$), n = 1, 2

Table 2 Comparison of lactic acid production between batch and continuous fermentation.

Fermentation	C_s^0	C_x	C_p	Yields (g/g)		Q_p	References
	(g/l)	(g/l)	(g/l)	Yx/s	Yp/s	(g/l h)	
Batch[(1)]	8.41	1.76	7.82	0.20	0.94	1.82	Sirisansaneeyakul et al., 2000a
Single-stage[(2)]	8.85	0.45	5.82	0.12	0.87	4.71	Sirisansaneeyakul et al., 2000b
Tw0-stage[(3)]	8.99	1.54	7.44	0.17	0.83	5.69*	This study

[(1)] Yield and volumetric productivity of lactic acid were calculated from 4.0 - 8.5 h of culture time.

[(2)] Continuous fermentation at steady state of D = 0.81 h^{-1}.

[(3)] Two-stage fermentation was carried out at steady state of D_1 = 0.83 h^{-1} and D_2 = 0.62 h^{-1}.

* volumetric productivity (Q_p) = $\sum Q_{p,n}$, n = 1,2

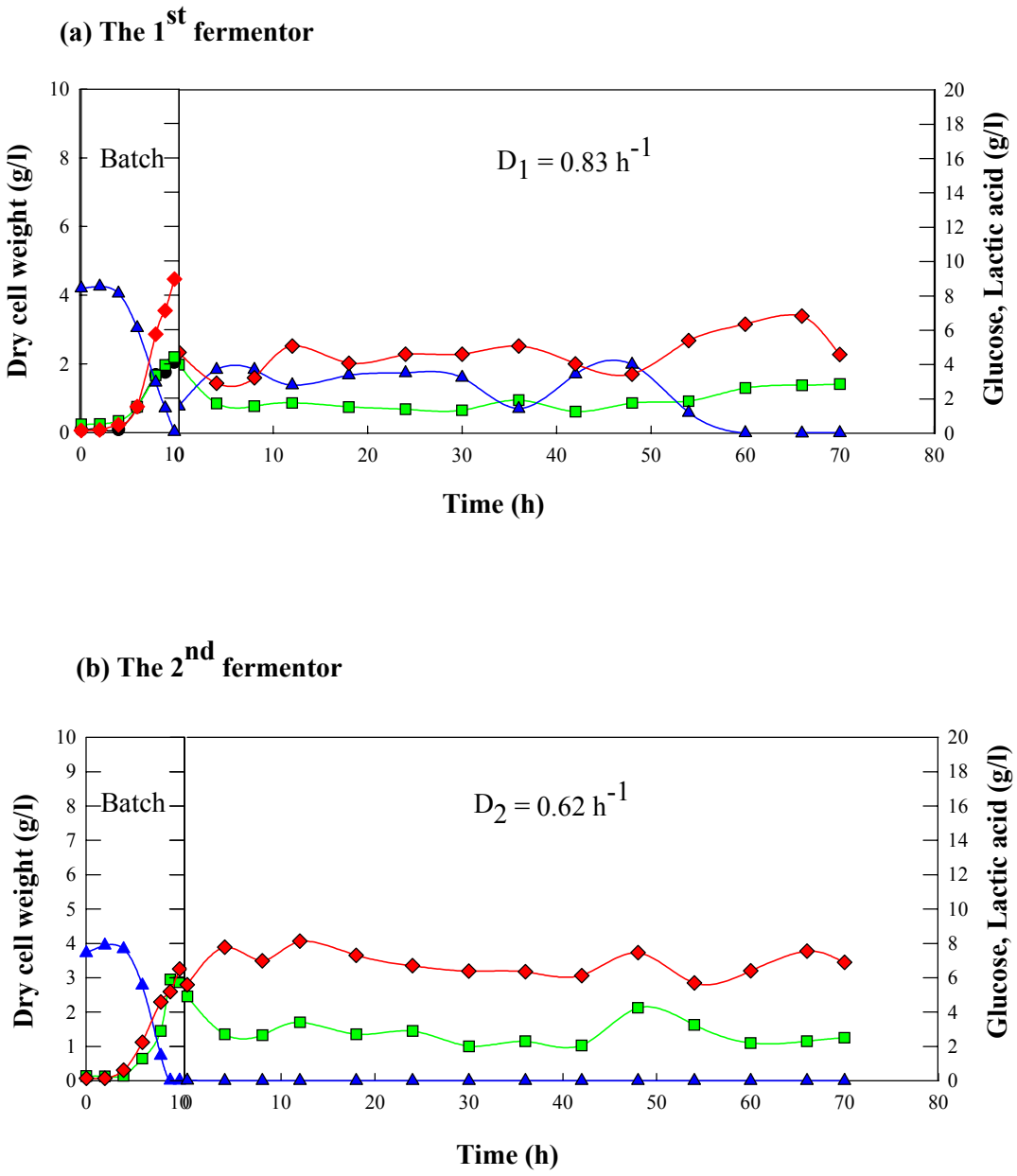

Fig. 1 The production of lactic acid with two-stage fermentation.
Initial conditions : C_s^0 = 8.99 g/l, F = 0.62 l/h, V_1 = 0.75 l, V_2 = 1.00 l
Symbols : Dry cell weight, Glucose, Lactic acid

สรุป

การพัฒนากระบวนการหมักเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติก โดยวิธีการผลิตแบบต่อเนื่องสองขั้นตอน ทำให้ได้อัตราการผลิตสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียว และการหมักแบบเบ็ดเสร็จ การศึกษานี้จะเป็นพื้นฐานในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องสองขั้นตอนที่มีระบบการหมุนเวียนเซลล์ ซึ่งคาดว่าจะได้อัตราการผลิตกรดแลกติกที่สูงขึ้นเหมาะสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

เอกสารอ้างอิง

Baker, S.B. and Summerson, W.H. 1941. J. Biochem. Chem. 138: 535.

Ishizaki, A., Osajima, K., Nakamura, K., Kimura, K., Hara, T. and Ezaki, T. 1990. Biochemical characterization of Lactococcus lactis IO-1 whose optimization temperature is as high as 37°C. J. Gen. Appl. Microbiol. 36: 1-6.

Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P., Moon, S.H. and Frank J. H. 1995. Technology and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivertive. FEMS Microbiol. Rev. 16: 221-231.

Sirisansaneeyakul, S., Mekvichitsaeng, P., Kittikusolthum, K., Pattaragulwanit, S., Bhuwapathanapun, S. and Ishizaki, A. 2000a. Lactic acid production from starch hydrolysates using Lactococcus lactis IO-1. Proceedings of JSPS-UNIMAS Regional Workshop for the Development of the Sago Industries: Sustainable Production and Optimum Utilisation of Sago Starch, 21-22 August 2000, Sarawak, Malaysia.

Sirisansaneeyakul, S., Mekvichitsaeng, P., Kittikusolthum, K., Luddee, M., Lertsiri, S., Bhuwapathanapun, S. and Ishizaki, A. 2000b. Continuous fermentation of lactic acid roduction by Lactococcus lactis IO-1. p. 154. In The12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Biotechnology: Impact & Trends, 1-3 November 2000, Kanchanaburi, Thailand.