

**สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง**

ผลของขนาดเมล็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต

ต่อการผลิตกรดแลคติก

โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง



พิณศุกาญจน์ ใจยงค์  
วรพรรณ อินทร์ปิ่น

รพ.  
พ ๖๖๓๗  
๒๕๕๐

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 83971  
วัน,เดือน,ปี..... 23 ก.ย. ๒๕๕1

b..... 11๙๖๕๔๒๘  
i.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา ๒๕๕๐

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Effect of bead sizes and sodium alginate concentration on lactic acid  
production by immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 10863**



**A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement**

**for the Degree of Bachelor of Science**

**Department of Applied Biology, Faculty of Science**

**King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang**

**Academic Year 2007**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**โครงการพิเศษเรื่อง** ผลของขนาดเมล็ดเจลและความเข้มข้นของโวลเคียมอัลจิเนตต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

**นักศึกษา** นางสาวพิณศุภาณจน์ ใจยงค์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 47050507  
นางสาววรรณ อินทร์ปั้น นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 47050536

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์

**สาขา** จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

**อาจารย์ที่ปรึกษา** รศ. สุขใจ ชูจันทร์

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ ผศ.ดร.มารีสา จาคูพรพัฒน์	
กรรมการ รศ. สุขใจ ชูจันทร์	

.....  
(รศ.ดร.นवलพรรณ ณ ระนอง)  
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	ผลของขนาดเมล็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินตต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึง	
นักศึกษา	นางสาวพิณสุกาญจน์ ใจยงค์	นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 47050145
	นางสาววรรณ อินทร์ปิ่น	นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 47050153
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
ปีการศึกษา	2550	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.สุใจ ชูจันทร์	

### บทคัดย่อ

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติกจากกระบวนการทางชีวภาพของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยศึกษาผลของขนาดเมล็ดเจล (0.89, 1.52 และ 2.06 มิลลิเมตร) และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินต (ร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5) ทำการหมักด้วยอาหารสังเคราะห์ พีเอชเริ่มต้น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ซึ่งพบว่ากรดรีจูลาร์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินตร้อยละ 2 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด โดยให้ปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 26.82 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 ในการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเชื้อมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันกับการผลิตกรดแลคติก และจากการศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถึงหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าการใช้ถังหมักสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่า โดยมีอัตราการผลิตสูงสุดในพลาสติก และถึงหมัก เท่ากับ 0.45 และ 0.82 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Special Product Title</b>	Effect of bead sizes and sodium alginate concentration on lactic acid production by immobilized <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863
<b>Name</b>	Miss Pinsukarn Jaiyong Miss Warapun Inpun
<b>Department</b>	Applied Biology
<b>Program</b>	Biotechnology
<b>Academic Year</b>	2007
<b>Special Project Advisor</b>	Assoc.Prof. Sukjai Choojun

### ABSTRACT

The optimum conditions for lactic acid production were studied by biological process of immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 10863. The objective is to study on effect of bead sizes (0.89, 1.52 and 2.06 mm) and sodium alginate concentration (0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% and 2.5%). The media used in this experiment were synthetic media at initial pH 6.5 and temperature 37°C in stationary phase for 168 hr. The results indicate that the maximum concentration of lactic acid was remarkably high reaching 26.82 g/L produced after 60 hr of fermentation when 0.89 mm bead innerdiameter and 2% sodium alginate concentration were applied. Thus, lactic acid production correlated to the growth of immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 10863. With the optimized condition, the productivity rate in 2 liter fermentor was 0.82 g/Lhr which higher than 0.45 g/Lhr in 2 liter flask.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.สุโขใจ ชูจันทร์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่ามาให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เป็นประโยชน์ระหว่างการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.อารี อุทธิบูรณ์ และ ผศ.ดร.มารีสา จารุพรพิพัฒน์ ที่กรุณาสละเวลาตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์ ที่กรุณาสละเวลาให้ความรู้ และคำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ทางสถิติ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ และสารเคมี รวมทั้งอำนวยความสะดวกต่างๆระหว่างทำโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณ คุณเมธิศา ช้างแก้ว นักวิจัย และคุณจิราภรณ์ ช่างชู ผู้ช่วยนักวิจัย บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) ที่ให้คำปรึกษา และแนวทางในการแก้ปัญหาระหว่างทำโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณ คุณศิริประภา มั่นตรง คุณฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ และคุณพรวิสาข์ ยุ่นประยงค์ ที่ให้คำปรึกษา และแนวทางในการแก้ปัญหาระหว่างทำโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณ บิดา มารดา ที่ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดมา จนโครงการพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากโครงการพิเศษฉบับนี้ ผู้จัดทำขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

พิณสุกาญจน์ ไยงค์  
วรพรรณ อินทร์ปิ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก	3
2.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพ	3
2.1.2 คุณสมบัติทางเคมี	3
2.2 ความสำคัญของกรดแลกติก	4
2.3 กระบวนการผลิตกรดแลกติก	5
2.3.1 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี	5
2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางชีวภาพ	6
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก	6
2.4.1 ลักษณะทั่วไป	7
2.4.2 แหล่งที่พบ	7
2.4.3 ชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมัก	7
2.4.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	9
2.5 การหมักกรดแลกติก	9
2.5.1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ	9
2.5.2 การหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ	10
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.1 แหล่งคาร์บอน	13
2.6.2 แหล่งไนโตรเจน	15
2.6.3 แร่ธาตุ	16
2.6.4 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง	17
2.6.5 อุณหภูมิ	18
2.6.6 การให้อากาศ	19
2.7 การผลิตเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูป	20
2.7.1 การตรึงรูปด้วยวิธีเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง	20
2.7.2 การตรึงรูปด้วยการเชื่อมแบบไขว้	21
2.7.3 การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้	21
2.8 ข้อดีและข้อเสียของการใช้เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูป	22
2.8.1 ข้อดีของการใช้เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูป	22
2.8.2 ข้อเสียของการใช้เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูป	22
2.9 ข้อควรคำนึงเมื่อใช้เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูปกับอาหาร	22
2.9.1 ด้านเศรษฐกิจ	22
2.9.2 ความเหมาะสมของวัตถุที่ตรึง	23
2.9.3 ความสามารถในการเป็นตัวเร่ง	23
2.9.4 ความคงตัว	23
2.9.5 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์	23
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเซลล์	23
2.11 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	24
2.11.1 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์	24
2.11.2 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC	25
2.11.3 การเลือกใช้และการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ทาง LC	31
2.11.4 การพัฒนาวิธีการแยกสารที่เฉพาะ	31
2.11.5 การประยุกต์ใช้งานทั่วไป	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.11.6 ข้อจำกัดของเทคนิค	32
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	33
3.1 อุปกรณ์	33
3.2 สารเคมี	34
3.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการหมักกรดแลคติก	34
3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย	35
3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย	35
3.4.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น	35
3.5 ขั้นตอนการตรึงเซลล์	35
3.6 การศึกษาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจิเนต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก	36
3.7 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร	37
3.8 การศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร	37
3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ	38
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	39
4.1 ผลการศึกษาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจิเนต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก	39
4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร	54
4.3 ผลการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร	56
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	61
เอกสารอ้างอิง	62
ภาคผนวก ก	68
ภาคผนวก ข	70
ภาคผนวก ค	86
ภาคผนวก ง	97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก	3
4.1 แสดงปริมาณกรดแลคติกสูงสุดที่ได้ (กรัมต่อลิตร) ณ ชั่วโมงที่ 60 จากการศึกษาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก	51
4.2 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบความแตกต่างของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้สูงสุด (ชั่วโมงที่ 60) จากการศึกษาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	53
4.3 แสดงผลของขนาดเม็ดเจลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึง	53
4.4 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบความแตกต่าง จากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร	58
6.2 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	87
6.3 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	88
6.4 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	89
6.5 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
6.6 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตแตกต่างกัน	91
6.7 แสดงค่าเฉลี่ยของพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตแตกต่างกัน	92
6.8 แสดงค่าเฉลี่ยของพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตแตกต่างกัน	93
6.9 แสดงค่าเฉลี่ยของพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตแตกต่างกัน	94
6.10 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลกลูโคส พีเอช และจำนวนเซลล์จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึง	95
6.11 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลกลูโคส และพีเอช จากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถึงหมักขนาด 2 ลิตร	96
6.12 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่ผลิตได้จากการศึกษาผลของขนาดของเมล็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก	97
6.13 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่ผลิตได้จากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถึงหมักขนาด 2 ลิตร	98
6.14 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถึงหมักขนาด 2 ลิตร	99
6.15 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดที่ได้จากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถึงหมักขนาด 2 ลิตร	100
6.16 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุดที่ได้จากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถึงหมักขนาด 2 ลิตร	101

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงสูตร โครงสร้างของกรดแลกติก	4
2.2 แสดงรูปร่างของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i>	9
2.3 แสดงวิธีการหมักแบบ โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ	11
2.4 แสดงวิธีการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ	12
2.5 แสดงลักษณะของเครื่อง HPLC	25
2.6 แสดงส่วนประกอบต่างๆของเครื่อง HPLC	25
2.7 แสดงภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่	26
2.8 แสดงการฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC	27
2.9 แสดงคอลัมน์และอุปกรณ์ที่ใส่คอลัมน์	28
2.10 แสดงเครื่องยูวี- วิสิเบิล คีเทคเตอร์	29
2.11 แสดงเครื่องดีฟเฟอเรนเชียลรีเฟรค โดมิเตอร์	30
2.12 แสดงคีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนซ์	30
4.1 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	39
4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	40
4.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	40
4.4 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	41
4.5 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	42
4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	43
4.8 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	44
4.9 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน	44
4.10 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 0.5	45
4.11 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 0.5	46
4.12 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.0	46
4.13 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.0	47
4.14 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.5	47
4.15 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.5	48
4.16 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0	48
4.17 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูปร่างภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.18 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง จากการตรึงเซลล์ ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของ โซเดียม-อัลจินตร้อยละ 2.5	49
4.19 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจินตร้อยละ 2.5	50
4.20 แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาล พีเอช และจำนวนเซลล์จากการศึกษาการ เจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติก โดย <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร	55
4.21 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง จากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร	57
4.22 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร	57
6.1 แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	71
6.2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแลคติกบริสุทธิ์	78
6.3 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดแลคติก	79
6.4 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจินตร้อยละ 0.5 ในชั่วโมงที่ 60	79
6.5 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจินตร้อยละ 1.0 ในชั่วโมงที่ 60	79
6.6 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจินตร้อยละ 1.5 ในชั่วโมงที่ 60	80
6.7 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจินตร้อยละ 2.0 ในชั่วโมงที่ 60	80
6.8 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจินตร้อยละ 2.5 ในชั่วโมงที่ 60	80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
6.9 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 1.52 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 0.5 ในชั่วโมงที่ 60	81
6.10 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 1.52 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.0 ในชั่วโมงที่ 60	81
6.11 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 1.52 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.5 ในชั่วโมงที่ 60	81
6.12 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 1.52 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0 ในชั่วโมงที่ 60	82
6.13 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 1.52 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.5 ในชั่วโมงที่ 60	82
6.14 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 2.06 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 0.5 ในชั่วโมงที่ 60	82
6.15 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 2.06 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.0 ในชั่วโมงที่ 60	83
6.16 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 2.06 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.5 ในชั่วโมงที่ 60	83
6.17 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 2.06 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0 ในชั่วโมงที่ 60	83
6.18 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 2.06 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.5 ในชั่วโมงที่ 60	84

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในแต่ละปีมีการผลิตกรดแลคติกเป็นจำนวนมาก เนื่องจากกรดแลคติกถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารมีการนำกรดแลคติกมาใช้เป็นสารปรับความเป็นกรด และกลิ่นรสในอาหาร รวมทั้งเครื่องสำอาง ใช้เป็นวัตถุดิบเสียเพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของอาหาร โดยเฉพาะในอาหารหมักดองและในผลิตภัณฑ์นม อุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอางมีการนำกรดแลคติกเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง เนื่องจากกรดแลคติกเป็นสารในกลุ่ม AHA (Alpha Hydroxy Acid) ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยลึกรอยบนใบหน้า ทำให้ผิวหน้าเรียบเนียน และมีความชุ่มชื้น อุตสาหกรรมเคมีได้มีการนำกรดแลคติกมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีชนิดใหม่ที่มีประโยชน์ เช่น propylene oxide, propylene glycol, acrylic acid, 2,3-pentanedione และ lactate ester นอกจากนี้ยังนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของกระบวนการผลิตกรดพอลิแลคติก (polylactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกรดแลคติกที่นำมาใช้ทางการแพทย์ เช่น เป็นส่วนประกอบในการทำไหมเย็บแผล การทำศัลยกรรมกระดูก และใช้ผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) โดยกระบวนการทางชีวภาพทดแทนพลาสติกที่ผลิตขึ้นจากกระบวนการทางเคมีได้เป็นอย่างดี (Dailey และคณะ, 2000 ; FDA, 1998 ; Laskin, 1985)

กรดแลคติกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งในการผลิตกรดแลคติกโดยใช้วิธีทางเคมีจะเป็นวิธีที่มีต้นทุนการผลิตสูง และมีความยุ่งยากในการทำ ให้บริสุทธิ์ ส่วนการผลิตทางชีวภาพสามารถผลิตกรดแลคติกโดยใช้ homolactic acid bacteria ซึ่งมีการศึกษาหาวิธีที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณมาก และเสียค่าใช้จ่ายในการลงทุนต่ำ เช่น การปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะ และองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม (Senthuran และคณะ, 1999)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีการตรึงเซลล์ โดยการศึกษาผลของขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจิเนตที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง และมีการใช้อาหารสังเคราะห์ในการผลิต เพื่อเป็นแนวทางในการหาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของ โซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ เพื่อเพิ่มผลผลิตของกรดแลคติกโดยกระบวนการทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 ศึกษาขนาดเมล็ดเจลที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

1.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

1.2.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารสังเคราะห์ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยวิธี Total plate count

1.2.4 ศึกษาศักยภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงในการผลิตกรดแลคติกในระดับพลาสติกขนาด 2 ลิตร และถังหมักขนาด 2 ลิตร

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากอาหารสังเคราะห์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก ได้แก่ ขนาดเมล็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารสังเคราะห์ และศึกษาการผลิตกรดแลคติกในระดับพลาสติกขนาด 2 ลิตร กับถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลกลูโคสก่อนและหลังทำการหมัก และการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างทำการหมัก

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการทางชีวภาพ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

2. ทราบถึงขนาดเมล็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

3. ทราบถึงความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารสังเคราะห์ และการผลิตกรดแลคติก

4. ทราบถึงศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกที่ได้จากกระบวนการหมักอาหารสังเคราะห์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาและพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักการ

#### 2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

##### 2.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

กรดแลกติกมีคุณสมบัติดูดความชื้นได้ง่าย อาจอยู่ในรูปเป็นผลึก หรือของเหลวข้น ไม่มีสี มีกลิ่นครีมอ่อนๆ ละลายน้ำได้ดี ให้รสเปรี้ยวปานกลาง (ศิวาพร, 2546) โดยคุณสมบัติทั่วไปทางกายภาพของกรดแลกติกแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

คุณสมบัติทางกายภาพ	กรดแลกติก
น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)	90.08
จุดหลอมเหลว (Melting point)	16.8 °C
จุดเดือด (Boiling point)	82 °C ที่ความดัน 0.5 mm.Hg 122 °C ที่ความดัน 14 mm.Hg
ค่าคงที่ของการแตกตัว ( $K_a$ ที่อุณหภูมิ 25 °C)	$1.37 \times 10^{-4}$
ค่าความร้อนของการเผาไหม้ ( $\Delta H_c$ )	1361 KJ/mole
ค่าความร้อนจำเพาะ ( $C_p$ ที่อุณหภูมิ 20 °C)	190 J/mole/°C

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

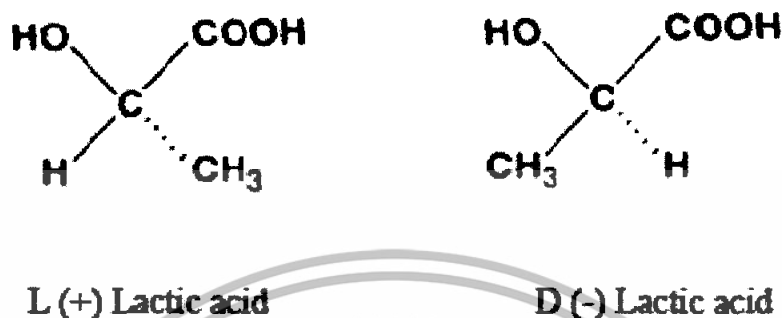
##### 2.1.2 คุณสมบัติทางเคมี

กรดแลกติกมีชื่อทางเคมีว่า 2- hydroxypropanoic acid หรือ 2- hydroxypropionic acid สูตรโมเลกุล คือ  $C_3H_6O_3$ , สูตรโครงสร้างของกรดแลกติกมี 2 ไอโซเมอร์ คือ L (+) Lactic acid และ D (-) Lactic acid แสดงดังรูปที่ 2.1

การเปลี่ยนรูปของ D (-) lactic acid และ L (+) lactic acid เกิดจากการหมุนของเอทิลีนออกไซด์บริดจ์ (ethylene oxide bridge) ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่หนึ่ง และอะตอมที่สอง โดยเกิด tautomeric shift ของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) บนคาร์บอนอะตอมที่สองไปเป็นหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ของคาร์บอกซิล (carboxyl) กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีสารปนเปื้อน กรดแลคติกสามารถละลายน้ำ เอทานอล อะซีโตน อีเทอร์ และไม่ละลายใน กลอโรฟอร์ม ปีโตรเลียมอีเทอร์ คาร์บอนซัลไฟด์ (Narayanan และคณะ, 2004)



รูปที่ 2.1 แสดงสูตรโครงสร้างของกรดแลคติก

ที่มา : <http://www.bioline.org.br/.../ej0402/ej04016e4.jpg>

## 2.2 ความสำคัญของกรดแลคติก

กรดแลคติกหรือกรดนมได้มีการค้นพบครั้งแรก โดย Scheele นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดน ในปี ค.ศ. 1780 ในนมเปรี้ยว และได้ตั้งชื่อว่า Mjolkssyra ซึ่งเป็นกรดชนิดแรกๆที่มีการนำมาใช้ในอาหาร พบตามธรรมชาติในนมเปรี้ยว กะหล่ำปลี ผักดองชนิดต่างๆ เบียร์ และเนยแข็ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในเลือด และกล้ามเนื้อของสัตว์ด้วย (Gardner, 1972) ต่อมาในปี ค.ศ. 1881 ได้มีการผลิตกรดแลคติกในทางการค้าครั้งแรกที่เมือง Littleton รัฐ Massachusetts และในปี ค.ศ. 1980 สหรัฐอเมริกาและยุโรปผลิตกรดแลคติกในระดับอุตสาหกรรมมากถึง 40,000 ตัน โดยการหมักแบบกะ (batch fermentation) และการสังเคราะห์ทางเคมี เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมอาหาร (Laskin, 1985)

กรดแลคติกเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของกระบวนการผลิตกรดพอลิแลคติก (polylactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกรดแลคติกที่นำมาใช้ทางการแพทย์ และใช้ผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) ทดแทนพลาสติกที่ผลิตขึ้นจากกระบวนการทางเคมีได้เป็นอย่างดี ในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้กรดแลคติกเป็นสารที่ช่วยเพิ่มความเป็นกรด วัตถุกันเสีย สารให้กลิ่นรส เป็นส่วนผสมของสารที่ใช้ในการหมักเนื้อ และเป็นตัวทำละลาย เป็นต้น (FDA, 1998) ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้กรดแลคติก ได้แก่ แยม เยลลี่ เซอร์เบต ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เครื่องดื่มชนิดต่างๆ ซอส และผักดอง เป็นต้น โดยอาจจะใช้กรดแลคติกเพียงชนิดเดียว หรือรวมกับกรดชนิดอื่นๆ มีการนำกรดแลคติกมาใช้ผสมกับน้ำยาที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลโลเฟนเพื่อใช้ในการบรรจุอาหาร น้ำยาล้างฟิล์มถ่ายรูป การพิมพ์สิ่งทอ น้ำยาเคลือบโลหะ และขี้เถ้า ในอุตสาหกรรม เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตเครื่องสำอางมีการนำมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง เนื่องจากกรดแลคติกเป็นสารในกลุ่ม AHA (Alpha Hydroxy Acid) ที่มีคุณสมบัติช่วยลึกรอยบนใบหน้า ทำให้ผิวหน้าเรียบเนียน และยังช่วยให้ผิวมีความชุ่มชื้น (ศิวาพร, 2546)

มีการใช้แคลเซียมแลคเตทในการทำให้คงรูป (Firming Agent) ในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพคติน ทำให้ผักและผลไม้มีความคงตัวมากขึ้น ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่นรสของผักและผลไม้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป โดยการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะที่ปนเปื้อนมา ช่วยทำให้เกิดเจลดีขึ้นในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ช่วยปรับปรุงคุณภาพของนมผง นมข้น (ศิวาพร, 2546) นอกจากนี้ยังใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมสำหรับผู้ป่วยที่ขาดแคลเซียมด้วย โดยอาจจะเสริมในนม น้ำผลไม้ อาหารอื่นๆ หรืออาจบริโภคน้ำผลไม้รูปแคลเซียมแลคเตทได้เลย ส่วนผู้ขาดเหล็ก สังกะสี และแมกนีเซียม สามารถบริโภคอาหารที่มีการเสริมด้วยเฟอร์รัสแลคเตท (ferrous lactate) ซิงค์แลคเตท (zinc lactate) และแมกนีเซียมแลคเตท (magnesium lactate) สำหรับในผลิตภัณฑ์ปลาเนื้อ และสัตว์ปีก มีการใช้กรดแลคติกหรือเกลือแลคเตทช่วยในการยืดอายุการเก็บ (Dailey และคณะ, 2000)

อนุพันธ์ของกรดแลคติก เช่น แลคทีเลเตต โมโนและไดกลีเซอไรด์ของกรดไขมัน (lactylated mono-and diglycerides of fatty acids) นิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ โดยเฉพาะในแป้งเค้กสำเร็จรูป และเนยขาว เป็นต้น ส่วนแคลเซียมสเตียริล-2-แลคทิลเลต (calcium stearyl -2-lactylate) นิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมปัง (FDA, 1998)

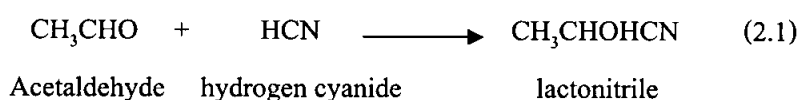
## 2.3 กระบวนการผลิตกรดแลคติก

การผลิตกรดแลคติก สามารถผลิตได้ 2 ทางคือ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ

### 2.3.1 การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางเคมี (Narayanan และคณะ, 2004)

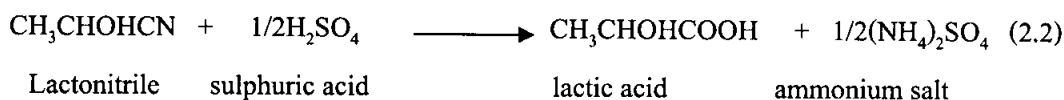
การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางเคมี มี 4 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 นำ hydrogen cyanide ทำปฏิกิริยากับ acetaldehyde ได้ lactonitrile ทำปฏิกิริยาที่ความดันบรรยากาศ ดังสมการที่ 2.1

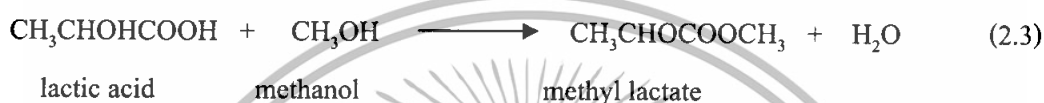


ขั้นตอนที่ 2 นำ lactonitrile มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริกแล้วจะได้กรดแลคติก และเกลือแอมโมเนียม ซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง ดังสมการที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ขั้นตอนที่ 3 นำกรดแลคติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ คือ เมทิลแลคเตท แล้วนำเมทิลแลคเตทมากลั่นและย่อยจะได้กรดแลคติก ส่วนเมทานอล hydrogen cyanide และสารปนเปื้อนอื่นๆจะถูกกำจัดออกโดยนำมาผ่านถ่านกัมมันต์ และการทำ ion exchange ดังสมการที่ 2.3 และ 2.4



### 2.3.2 การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางชีวภาพ (Muller, 2001)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกมี 2 ชนิด คือ โฮโมแลคติกแบคทีเรียและเฮเทอโรแลคติกแบคทีเรีย ซึ่งขั้นตอนในการผลิตแลคติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ ดังสมการที่ 2.5 และ 2.6



สมการที่ 2.5 แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติกของโฮโมแลคติกแบคทีเรีย



สมการที่ 2.6 แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติกของเฮเทอโรแลคติกแบคทีเรีย

## 2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก เรียกว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria; LAB) หมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติก และมีความสามารถในการหมักนมให้เกิดตะกอนได้ นอกจากนี้ยังรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย ต่อมาได้พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียมีเพียงแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น จึงได้มีการแยกกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มเอคซาร์นี่เป็นเอคซาร์นี่ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคลิฟอร์มออก จากนั้นได้ให้ความหมายของแลคติกแอซิดแบคทีเรียว่า ต้องเป็นแบคทีเรียแกรม บวกที่มีลักษณะสำคัญ คือ ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างสปอร์ มีความสามารถในการหมัก คาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดแลคติก มีรูปร่างเป็นทรงกลม และแท่ง

#### 2.4.1 ลักษณะโดยทั่วไป

เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม หรือเป็นรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (catalase) (Axelson, 1993) สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ สุดท้าย ในการหมักคาร์โบไฮเดรตได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาล โดย ได้จากกระบวนการ substrate-level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน เช่น วิตามินต่างๆ กรดอะมิโน และไพริมิดีน สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน ไม่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนน้อย อุณหภูมิที่ เชื้อสามารถเจริญได้คืออยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศา เซลเซียส ส่วนพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่พีเอชน้อยกว่าหรือ เท่ากับ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (Salminen และ Wright, 1993)

#### 2.4.2 แหล่งที่พบ

สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์ จากเนื้อ ปลา ไวน์ ผลไม้ และน้ำผลไม้ อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ (Salminen และ Wright, 1993)

#### 2.4.3 ชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมัก

ได้แก่ *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* และ *Streptococcus* ซึ่งมีลักษณะดังนี้ (สุมณฑา, 2545)

*Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียรูปท่อนยาว ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวกและ เปลี่ยนเป็นแกรมลบเมื่อมีอายุมากขึ้น ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการ เจริญเติบโตจะอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ ต่ำกว่าหรือ เท่ากับ 5.5-5.8 พบได้ในธรรมชาติโดยเฉพาะในสัตว์และผลิตภัณฑ์ธัญพืช เป็นเชื้อก่อโรคในลำไส้ นก และในช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ตัวอย่าง *Lactobacillus* ที่ทำให้เกิดความเสียหาย เช่น เชื้อ *L. brevis* ทำให้กะหล่ำปลีคองมีรสเปรี้ยวเกินไป เชื้อ *L. plantarum* ทำให้ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ เน่าเสีย *L. fructivorans* และ *L. brevis* ทำให้ไวน์ขุ่น มีรสเปรี้ยวที่เกิดจากการสร้างกรดแลคติกและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอะซิติก เป็นต้น สำหรับ *Lactobacillus* ที่มีประโยชน์ เช่น ก่อให้เกิดอาหารหมักที่มีรสเปรี้ยวหลายชนิด เช่น แหนม ผักกาดดอง นมเปรี้ยว เป็นต้น

*Pediococcus* เป็นแบคทีเรียแลคติกที่นิยมนำมาใช้หมักกรดแลคติกมากกว่า เช่น *P. pentosaceus* ส่วน *P. halophilus* ปัจจุบันถูกใช้ในสปีชีส์ใหม่ในชื่อว่า *Tetragenococcus halophnus*

*Leuconostoc* เป็นแบคทีเรียแลคติกที่มีรูปร่างกลมอันเป็นลักษณะสำคัญที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากพวก *Lactobacillus* ได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่นิยมนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติก เพราะเกิดเมือก

*Streptococcus* เป็นแบคทีเรียสปีชีส์หนึ่ง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นที่สามารถจำแนกย่อยออกเป็น 3 จีนัส คือ *Enterococci*, *Lactococcus* และ *Streptococcus*

นักจุลชีววิทยาบางคนจัด *Bifidobacteria* ไว้ในกลุ่มแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกด้วย แม้ว่าจะมีลักษณะทางพันธุกรรมและทางชีวเคมีแตกต่างจากแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังไม่ลึกซึ้งพอ และต้องการความกระจ่างมากกว่านี้

เมื่อพิจารณาถึงการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

**2.4.3.1 Obligative homofermenter** หมายถึงแบคทีเรียพวกที่หมักแล้วได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *Pediococcus damnosus* และ *Lactobacillus ruminis* แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำตาลเฮกโซส (น้ำตาลที่มีคาร์บอนอยู่ 6 อะตอม หรือ  $C_6$  sugar) เช่น กลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลเพนโทสได้ (น้ำตาลที่มีคาร์บอนอยู่ 5 อะตอม หรือ  $C_5$  sugar) เช่น น้ำตาลไซโลส

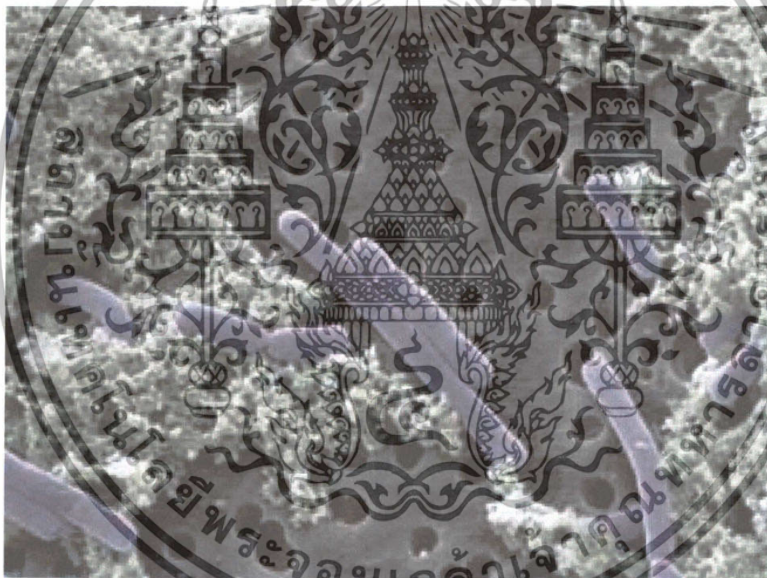
**2.4.3.2 Facultative heterofermenter** หมายถึงแบคทีเรียพวกที่หมักแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก หรือเอทานอล ได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *L. plautarum*, *L. pentosus*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* และ *Enterococcus faecium* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลเฮกโซสได้ และสามารถใช้น้ำตาลเพนโทสได้เล็กน้อย

**2.4.3.3 Obligative heterofermenter** หมายถึงแบคทีเรียที่หมักแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก หรือเอทานอล ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มของ *Leuconostoc* และกลุ่มของ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น

*Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus buchneri* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส และ น้ำตาลเพนโทสได้ดี

#### 2.4.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้คือ *Lactobacillus casei* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนกรด ได้ (acid tolerant) มีรูปร่างเป็นแท่ง ดังรูปที่ 2.2 เซลล์มีขนาด 0.7-1.1 x 2.0-4.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีกระบวนการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (heterofermentative) ได้ผลิตภัณฑ์หลักคือกรดแลคติก สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นมดิบ นมหมัก ผักผลไม้ ถ้าใส่ของคนและสัตว์ ในอุตสาหกรรมมีการผลิตเพื่อเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก และเชื้อตั้งต้นในอุตสาหกรรมนมหมัก เป็นต้น (Salminen และคณะ, 2004)



รูปที่ 2.2 แสดงรูปร่างของเชื้อ *Lactobacillus casei*

ที่มา : [http://www.bioweb.usu.edu/.../Lb\\_casei\\_1-LABGC-colored.jpg](http://www.bioweb.usu.edu/.../Lb_casei_1-LABGC-colored.jpg)

#### 2.5 การหมักกรดแลคติก (Lactic acid fermentation) (สุมณฑา, 2545)

กรดแลคติกเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก โดยมีกระบวนการหมัก 2 แบบ คือ

##### 2.5.1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (homofermentative)

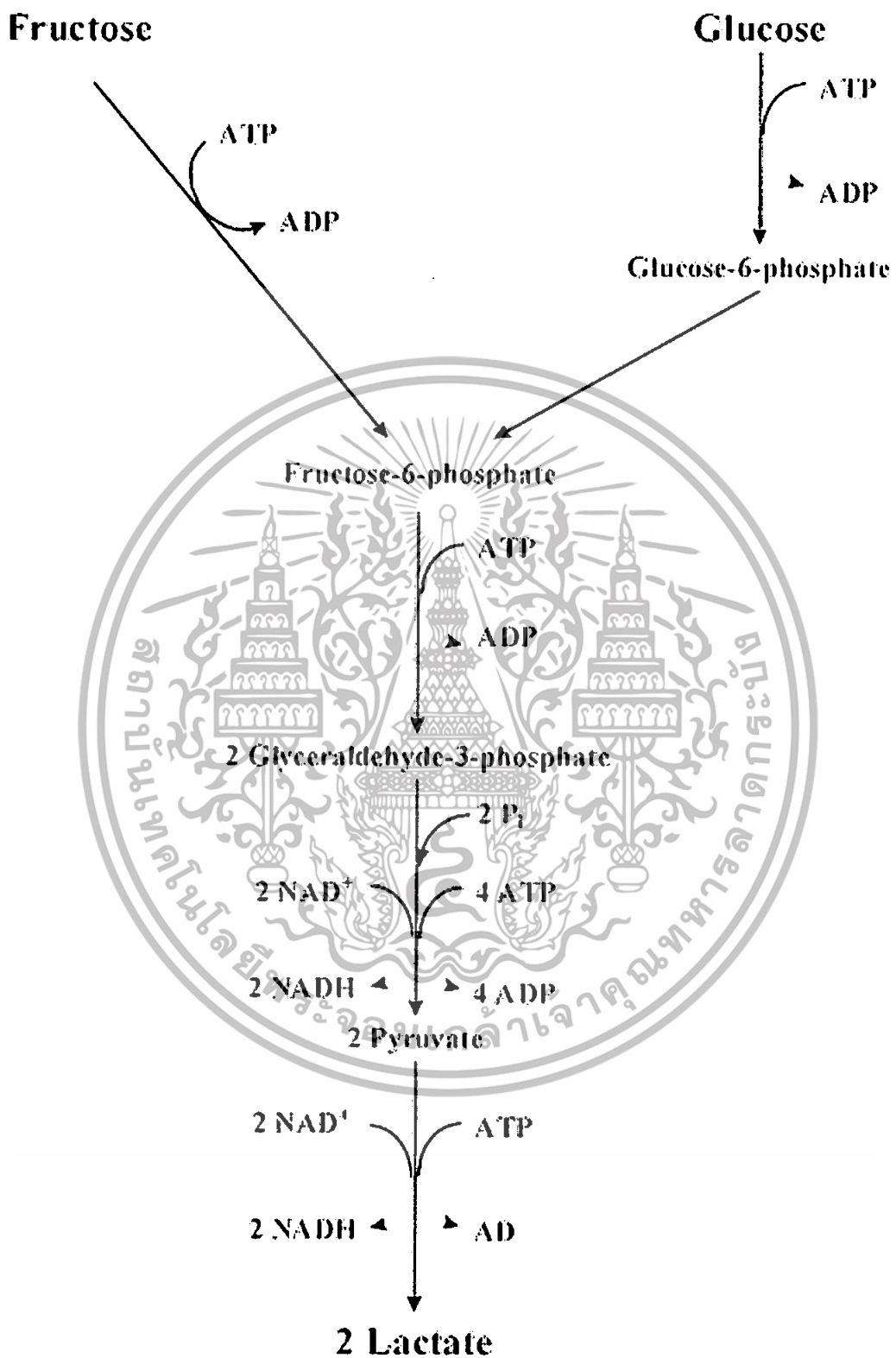
เป็นการหมักที่ได้กรดแลคติกหรือแลคเตทอย่างเดียวเป็นผลผลิตสำคัญ ผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (Embden-Meyeroth-Parnas glycolytic pathway) หรือ EMP pathway ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เริ่มจากน้ำตาลกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ถูกเติมฟอสฟอรัส และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกิดขึ้นก่อนที่เอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) จะเข้าทำปฏิกิริยา เป็นผลให้โมเลกุลกลูโคสแตกออกเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม) 2 โมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวท โดยเกิด ATP ขึ้น 2 โมเลกุล จากการหมักกลูโคส 1 โมเลกุล (เนื่องจากการเติมฟอสฟอรัสให้กับสับสเตรท 2 แห่ง) ในขั้นตอนสุดท้ายเป็นการรีดิวซ์ไพรูเวทเป็นแลคเตท ขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH ได้ NAD<sup>+</sup> กลับคืนมาจากการใช้ไปในการออกซิเดชันกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต กลไกการเกิดกรดแลคติกหรือแลคเตท แสดงดังรูปที่ 2.3

### 2.5.2 การหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative)

เป็นการหมักที่ได้แลคเตท เอทานอล หรืออะซิเตท และคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากแบคทีเรียขาดเอนไซม์อัลโดเลส จึงเปลี่ยนรูปจากน้ำตาลกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ไปเป็นน้ำตาลเพนโตส (ไรโบส) ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยการสร้างโครงสร้างภายในโมเลกุลที่มีการออกซิเดชันและคีคาร์บอกซิเลชันร่วมด้วย น้ำตาลที่มี 5 อะตอมนี้ จะถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟต (ซึ่งเป็นสารประกอบฟอสเฟตที่มีคาร์บอน 3 อะตอม) และอะซีติลฟอสเฟตโดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) กลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟตจะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตท เช่นเดียวกับการเกิดไกลโคไลซิสในการหมักโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (แต่เนื่องจากการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟมีกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟตเพียง 1 โมเลกุล จึงเกิด ATP เพียง 1 โมเลกุล) ส่วนขนาดของอะซีติลฟอสเฟตนั้นขึ้นอยู่กับว่าจะมีสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนอยู่ด้วยหรือไม่ ในสภาวะที่ขาดตัวรับอิเล็กตรอน อะซีติลฟอสเฟตจะทำหน้าที่นี้เสียเอง ทำให้ถูกรีดิวซ์เป็นเอทานอล และได้ NAD<sup>+</sup> ขึ้นมาใหม่ 2 โมเลกุลจากเอนไซม์ NADH oxidases แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจน NAD<sup>+</sup> สามารถสร้างขึ้นใหม่จากเอนไซม์ NADH oxidases และ peroxidases ปล่อยให้อะซีติลฟอสเฟตมีมากเพียงพอสำหรับการเปลี่ยนไปเป็นอะซิเตท จึงเท่ากับเป็นการเติมฟอสเฟตให้กับสับสเตรทอีกทางหนึ่ง เป็นผลให้ได้ ATP เพิ่มขึ้นอีก 1 โมเลกุล เป็น 2 โมเลกุล จากน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เช่นเดียวกับการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ ในกรณีที่มีการเพิ่มขึ้นของ ATP สะท้อนให้เห็นได้จากอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว ผลเช่นเดียวกันนี้สามารถเกิดขึ้นกับตัวรับออกซิเจนอื่นๆด้วย เช่น น้ำตาลฟรุกโตส ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นแมนนิทอล กลไกการเกิดกรดแลคติกหรือแลคเตท แสดงดังรูปที่ 2.4

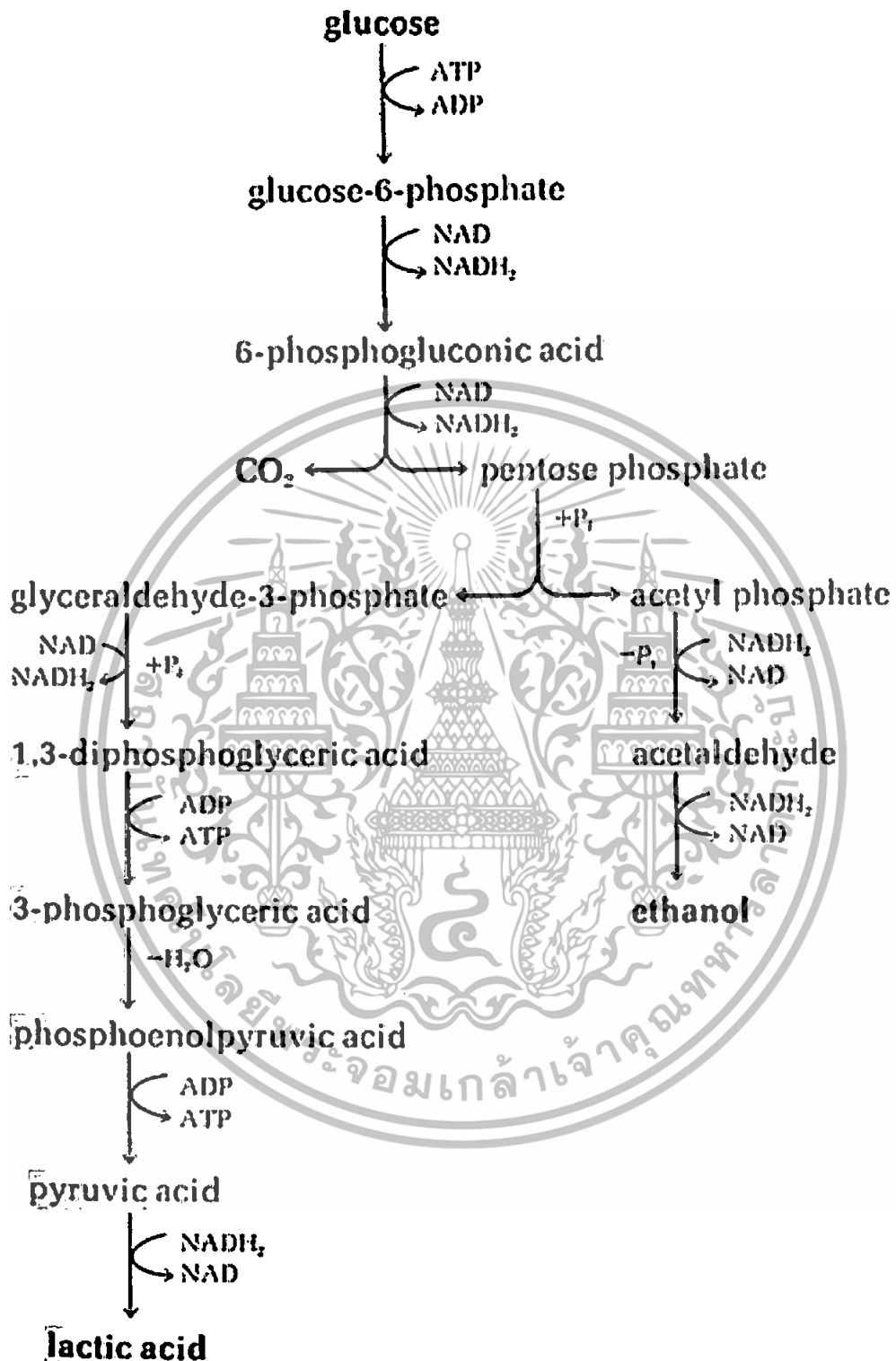
การระบุว่าเกิดการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟหรือไม่ อาศัยการชี้บ่งด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น



รูปที่ 2.3 แสดงวิถีการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ

ที่มา : <http://www.brighton73.freemove.co.uk/.../Image2.gif>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงวิถีการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ

ที่มา : <http://www.textbookofbacteriology.net/heterolactic.jpeg>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก

การผลิตกรดแลคติกเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ดังนี้

### 2.6.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเป็นการลดต้นทุนการผลิต และเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งมาทำให้เกิดประโยชน์ ซึ่งมีหลายประเภทด้วยกัน เช่น

2.6.1.1 หางนม (whey) หรือเวย์เป็นแหล่งสับสเตรทที่นิยมใช้ในการผลิตกรดแลคติก เป็นผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็ง ประกอบด้วยสารอินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ โปรตีน น้ำตาลแลคโตส และกรดแลคติก เป็นต้น (Vasanthi และคณะ, 1996) ในปัจจุบันประเทศไทยมีปริมาณการผลิตเนยแข็งไม่ต่ำกว่า 2,365 ตันต่อปี ซึ่งใช้ปริมาณน้ำนมดิบไม่ต่ำกว่าปีละ 21,484 ตัน ทำให้มีหางนมเหลือทิ้งไม่ต่ำกว่าปีละ 19,000 ตัน (ประพันธ์ ทรราชานุกรม, 2549) เนื่องจากหางนมมีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 4-5 จึงสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการหมักผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม ได้แก่ เอทานอล โลซีน ทรีโอไนน์ และกรดแลคติก เป็นต้น (Cote และคณะ, 2004; Yong และ John, 1983; Motoyoshi และคณะ, 1986)

2.6.1.2 กากน้ำตาล (molass) เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำตาล ใช้เป็นแหล่งสับสเตรทในการผลิตกรดแลคติก เอทานอล และเซลล์ยีสต์ น้ำตาลที่พบคือน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงอาจทำให้สารละลายมีความหนืดสูง สายพันธุ์แบคทีเรียที่นิยมใช้ผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาล คือ *Lactobacillus delbrueckii*

2.6.1.3 แป้ง (starch) เป็นแหล่งสับสเตรทที่นิยมใช้ในการผลิตกรดแลคติก ได้จากธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวไรย์ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และมันฝรั่ง แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ เช่น *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus amylovorus* และ *Lactobacillus amylophilus* บางครั้งอาจเติมเอนไซม์อะไมเลสลงไปเพื่อย่อยแป้งก่อน จากนั้นจึงเกิดการหมักโดยแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* และ *Lactobacillus lactis* เป็นต้น

2.6.1.4 ลิกโนเซลลูโลส แหล่งของลิกโนเซลลูโลส เช่น เศษกระดาษเหลือทิ้ง (waste paper) เศษไม้ (plant material) และไม้ เป็นต้น โดยลิกโนเซลลูโลสจะประกอบด้วยน้ำตาล กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส และเพนโทส (น้ำตาลไซโลสและอะราบิโนส) ซึ่งจำเป็นต้องย่อยสลายก่อนเพื่อให้เกิดการหมักได้ (Hofvendahl และ Hagerdal, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yun และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลกโตส กลีเซอรอล โซโลส เวย์ และ แป้ง พบว่าในน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลมอลโตส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 18.18, 17.95 และ 16.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลกโตส กลีเซอรอล โซโลส เวย์ และ แป้ง จะให้ปริมาณกรดแลกติก 2.7, 1.26, 2.24, 1.68, 1.83 และ 1.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำ

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ โดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อเซลล์เจริญในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลมอลโตส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีอัตราการผลิตอยู่ระหว่าง 5.2-6.0 กรัมต่อลิตรชั่วโมง กรดแลกติกที่ได้คิดเป็น 0.96 กรัมต่อกรัม แหล่งคาร์บอน โดยการผลิตกรดแลกติกด้วยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 จากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลมอลโตส จะสามารถให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูงกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น

Bulut และคณะ (2004) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส โมลาส ผักถั่ว และรำข้าวสาลี ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูง เช่นเดียวกับการใช้น้ำตาลจากผักถั่ว ซึ่งได้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 58 กรัมต่อลิตร

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลซึ่งมีซูโครสเป็นองค์ประกอบ ในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 95.7 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 94.9

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าความเข้มข้นของแป้งที่ 20 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดแลกติก 0.85-0.92 กรัมต่อสารตั้งต้น

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด โดยนำมาหมักกับเอนไซม์ แล้วจึงนำมาผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าเมื่อใช้ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลีเป็นสารตั้งต้นจะให้ปริมาณกรดแลกติกมากกว่า 0.8 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และเมื่ออาหารประกอบด้วยแป้งสาลีที่ถูกลบด้วยเอนไซม์ 200 กรัมต่อลิตร แป้งข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงถึง 5.36 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส แลคโตส กาแลคโตส ไฮโลส และมอลโตส ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้ง และเศษอาหารเหลือทิ้ง โดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011 พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 19.5 กรัมต่อ 200 กรัมสารตั้งต้น

Tanaka และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกในรูป D-form จากรำข้าวซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้สูงถึง 9.2 กรัมต่อลิตร

Wee และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ปริมาณต่างๆ ได้แก่ 50, 75, 100 และ 125 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 125 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด

Xu และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส เซลโลไบโอส และไฮโลส โดยเชื้อ *Lactobacillus sake* และ *Lactobacillus casei* พบว่า *Lactobacillus sake* และ *Lactobacillus casei* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดีที่สุดในการผลิตกรดแลคติก ซึ่งให้ผลผลิต 3 กรัมต่อลิตร และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

## 2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนแหล่งของไนโตรเจนจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ โดยชนิดและความเข้มข้นของธาตุอาหารที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ซึ่งจะต้องปรับสภาวะให้เหมาะสมถึงจะได้ผลผลิตสูงขึ้น (สมใจ, 2544)

Fitzpatrick และ O'Keeffe (2001) ศึกษาอิทธิพลการเติม whey protein hydrolase (WPH) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนลงไปใน whey permeate สำหรับการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสในเวย์ให้เป็นกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงภายในระยะเวลา 30-40 ชั่วโมง

Nancib และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโติน ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด และ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ที่เติมลงในน้ำอินทผลัม ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีคือ ยีสต์สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pauli และ Fitzpatrick (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์ โดยมีการเติมสารสกัดจากมอลต์ และยีสต์สกัด เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าเมื่อมีการเติมสารสกัดจากมอลต์ และยีสต์สกัด จะสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่าเมื่อไม่มีการเติม

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาล โดยแปรผันปริมาณยีสต์สกัด 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าการเติมยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุดถึง 5.3 กรัมต่อลิตร

Altaf และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วเบงกอล ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และยีสต์สกัด ที่เติมลงในแป้ง ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV6 พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้จะสูงถึงร้อยละ 92

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย เปปโตเน เคซีน ที่เติมลงในน้ำอินทผลัม ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะสูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพด ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะสามารถผลิตได้ปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 89 กรัมต่อลิตร

### 2.6.3 แร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างกรดแลคติก ได้แก่ เกลืออนินทรีย์ของธาตุโพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และแมงกานีส เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีโคบอลต์ ทองแดง เหล็ก และสังกะสี แต่โดยทั่วไปมักจะพบแร่ธาตุเหล่านี้เจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อ (สมใจ, 2544)

Fitzpatrick และ O'Keeffe (2001) ศึกษาอิทธิพลของแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. casei* ที่มีการเติมแมงกานีสในรูปของแมงกานีสซัลเฟต ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ) ร่วมกับยีสต์สกัดลงในเวย์ พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกจะสั้นลง และเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสได้ดี แต่เมื่อไม่มีการเติมแมงกานีสเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกจะนานขึ้น และเชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ได้เท่าที่ควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บันทึกหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Chauhan และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus* sp. KCPO 1 พบว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงขึ้น ซึ่งสามารถผลิตได้ 45.59 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งสามารถผลิตได้เพียง 16.5 กรัมต่อลิตร

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าเมื่อมีการเติมแร่ธาตุชนิดต่างๆ ได้แก่ โพแทสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และซิงค์ซัลเฟต จะช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาลได้เร็วขึ้น

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทรีปทิกซอย ยูเรีย เปปโตน เคซีน ที่เติมลงในน้ำอินทผลัม ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะสูงเมื่อมีการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

Altaf และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. amylophilus* GV 6 ในอาหารที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไป เพื่อเป็นบัฟเฟอร์ในการปรับพีเอชของอาหาร พบว่าได้ปริมาณกรดแลคติก 3.8 กรัมต่อ 6 กรัมสารตั้งต้น

Ding และ Tan (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากอาหารสังเคราะห์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ซึ่งมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 15 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงขึ้น

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาการปรับปรุงเชื้อสายพันธุ์ *L. delbrueckii* NCIM 2365 สำหรับการผลิตกรดแลคติก พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดี เมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหาร

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้ง และเศษอาหารเหลือทิ้ง โดยเชื้อ *L. manihottivorans* LMG 18011 พบว่าเมื่อเติมแมงกานีสจะสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่าเมื่อไม่เติมแมงกานีส

### 2.6.4 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช)

การควบคุมพีเอชให้เหมาะสมในการหมักจะทำให้การสร้างกรดนั้นเป็นไปได้ดีขึ้น โดยค่าพีเอชนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ การควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่ละลายน้ำ ถ้าพีเอชลดลงคาร์บอเนตจะสลายตัวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอชคงที่ หรืออาจควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติมกรดหรือด่าง เช่น กรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์

Pauli และ Fitzpatrick (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าการควบคุมให้ค่าพีเอชอยู่ที่ 5.4 เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

Wee และคณะ (2004) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่าพีเอช 6 สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 96.1 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 96.3

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 6-7

Kourkouts และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *L. casei* ด้วยวิธีการตรึงเซลล์กับแอปเปิ้ล และควินซ์ พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกอยู่ในช่วง 5.5-6.0

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก คือ 7

Idris และ Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรด โดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* ที่ถูกตรึง พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็ว และให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง

John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *L. delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติก

### 2.6.5 อุณหภูมิ

อุณหภูมิจะขึ้นกับชนิดของเชื้อที่ใช้ และสภาวะอื่นๆของกระบวนการหมัก

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก คือ 38 องศาเซลเซียส

Idris และ Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรด โดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาอุณหภูมิที่ระดับ 27, 30, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติก

Tanaka และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกในรูป D-form จากรำข้าว โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 พบว่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหมาะต่อการผลิตกรดแลกติก

Vishu และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้ง โดยเชื้อ *L. amylophilus* GV 6 พบว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเหมาะสมที่สุดในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

### 2.6.6 การให้อากาศ

ออกซิเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (aerobe) ปริมาณออกซิเจนในอาหารจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญ และการผลิตสารเมตาบอไลต์ (สมใจ, 2544)

Nancib และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ได้มีการให้อากาศโดยการกวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญอยู่ในช่วง stationary phase ภายในเวลา 20 ชั่วโมง

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่ามีการควบคุมให้อากาศโดยการกวนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นสายพันธุ์ facultative anaerobic จึงไม่ต้องการการให้อากาศแบบพ่น (air-sparging)

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก คือ มีการให้อากาศโดยการกวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* ในการศึกษา มีการควบคุมการให้อากาศ โดยการกวนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้สูงถึงร้อยละ 98

Gao และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเศษปลา โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* (NBRC 3863) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิ พีเอช และการกวนที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้จะสูงถึง 87 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 การผลิตเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูป

การตรึงรูปเอนไซม์หรือเซลล์ มีกรรมวิธีการหลักๆ อยู่ 3 วิธี ดังนี้

### 2.7.1 การตรึงรูปด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง (carrier binding)

หมายถึงการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์หรือเซลล์กับตัวพุงหรือตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำ (Laskin, 1985) แบ่งออกเป็น 3 วิธี ดังนี้ (วิเชียร, 2526)

#### 2.7.1.1 วิธีการดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption method)

หมายถึงการดูดซับเอนไซม์หรือเซลล์เอาไว้บนสารพุงของแข็ง (solid support) ด้วยแรงอื่นที่ไม่ใช่แรงยึดร่วม (covalent linkages) เช่น แรงยึดระหว่างไอออน (ionic bonding) แรงยึดระหว่างไฮโดรเจน (hydrogen bonding) หรือแรงยึดระหว่างสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic bonding) แรงยึดที่เกิดขึ้นระหว่างเอนไซม์ หรือเซลล์กับตัวพุง หรือสารตัวกลางจะอ่อนมาก ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น พีเอช ความแรงของไอออน และอุณหภูมิ การนำตัวพุงมาใช้ซ้ำทำได้ง่าย เหมาะกับตัวพุงราคาแพง วิธีนี้เหมาะกับเอนไซม์ที่ถูกกระทบได้ง่ายต่อวิธีการเชื่อมพันธะเคมี เช่น อินเวอร์เทส เนื่องจากกรรมวิธีไม่ซับซ้อน และไม่รุนแรง เป็นกรรมวิธีที่ใช้ได้กับเอนไซม์ทุกชนิด

ตัวอย่างตัวพุง เช่น bentonite, calcium phosphate gel, activated carbon, porous glass, acid clay, kaolinite aluminar และพอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น แป้ง กลูเตน คอลลาเจน

#### 2.7.1.2 วิธีเชื่อมแบบพันธะไอออน (Ionic bonding method)

หมายถึงการเชื่อมระหว่างโปรตีนของเอนไซม์ หรือเซลล์กับตัวพุงที่ไม่ละลายในสารละลายปฏิกริยา โดยใช้พันธะไอออน

ตัวอย่างตัวพุง ได้แก่ สารที่มีอนุมูลแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange residue) ได้แก่ พอลิแซคคาไรด์ พอลิเมอร์สังเคราะห์ และอนุมูลประจุในตัวพุง เอนไซม์ต้องแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ที่มีอนุมูลประจุบวก (anionic enzyme) เช่น กลูโคส ไมเลส และตัวพุงที่มีประจุลบ (cationic residue) เช่น DEAE-cellulose, DEAE-sephadex

ลักษณะสำคัญของการตรึงรูปวิธีเชื่อมพันธะไอออน คือ

1. มีผลต่อกิจกรรม และ โครงรูปสามมิติของเอนไซม์น้อย ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์อาจคงเดิม
2. แรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์หรือเซลล์กับตัวพุงอ่อน อาจหลุดง่ายที่ความเข้มข้นของไอออนสูง หรือแรงเกาะกันจะลดลงเมื่อเปลี่ยนพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กรรมวิธีไม่ซับซ้อน ใช้หลักการเชื่อมอออนเหมือนการแลกเปลี่ยนอออนของสารชีวภาพอื่นๆได้

#### 2.7.1.3 วิธีเชื่อมพันธะโควาเลนต์ (covalent binding method)

หมายถึงการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงด้วยพันธะโควาเลนต์วิธีนี้ได้นำมาศึกษามากที่สุด พันธะโควาเลนต์เป็นพันธะที่เกิดจากอะตอมรวมกันโดยการถ่ายอิเล็กตรอนอย่างสมบูรณ์ และอะตอมใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน เนื่องจากพันธะโควาเลนต์ต้องผ่านขั้นตอนของการสลายพันธะโควาเลนต์เดิม ดังนั้นพลังงานการสลาย (dissociation energy) ยิ่งสูง โมเลกุลใหม่ที่ได้จะมีพันธะโควาเลนต์ที่แข็งแรง และเสถียร

การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับตัวกลาง จะต้องพิจารณาเลือกตัวพุงให้เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์ และวัตถุดิบที่ใช้เป็นสับสเตรท ซึ่งมีทั้งสารธรรมชาติและสารสังเคราะห์ (ชมรมเทคโนโลยีทางอาหารและชีวภาพ, 2550)

#### 2.7.2 การตรึงรูปด้วยการเชื่อมแบบไขว้ (cross linking method) (ชมรมเทคโนโลยีทางอาหารและชีวภาพ, 2550)

การตรึงรูปวิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพุง แต่จะอาศัยสารเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะเคมีแบบโควาเลนต์ ทำให้โมเลกุลเอนไซม์ตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปต่อเชื่อมเกาะกันเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ละลายน้ำได้น้อยลง

การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้จะมีผลต่อโครงสร้าง และแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ เนื่องจากการเชื่อมระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับสารเชื่อมขวางจะเกิดปฏิกิริยารุนแรง

#### 2.7.3 การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ (entrapping method) (ชมรมเทคโนโลยีทางอาหารและชีวภาพ, 2550)

การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะเอนไซม์ไม่ได้สร้างพันธะเคมีใดๆกับสารห่อหุ้ม และเอนไซม์ไม่ได้จับยึดกับตัวพุง หรือจับยึดกันเอง แต่จะถูกขังให้อยู่ในบริเวณที่จำกัด ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ

##### 2.7.3.1 แบบห่อหุ้มเอนไซม์หรือเซลล์ในช่องตาข่าย (Lattice type) เอนไซม์จะถูกขังหรือห่อหุ้มไว้ในช่องตาข่ายของสารพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำอย่างสม่ำเสมอ สารที่ใช้ห่อหุ้มเอนไซม์วิธีนี้อาจเป็นสารพอลิเมอร์ธรรมชาติ หรือสังเคราะห์ก็ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องเลือกชนิดของสารพอลิเมอร์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ เนื่องจากสารบางชนิดขณะเกิดเป็นพอลิเมอร์ จะมีปฏิกิริยารุนแรงจนทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์เสียหายไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3.2 แบบห่อหุ้มเอนไซม์หรือเซลล์ในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type) เอนไซม์จะถูกห่อหุ้มไว้ในแคปซูลเล็กที่มีคุณสมบัติยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้าออกได้ แต่เอนไซม์ผ่านออกมาไม่ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาขณะเกิดสารพอลิเมอร์ให้ดี มิฉะนั้นจะมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้

## 2.8 ข้อดีและข้อเสียของการใช้เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูป (วิเชียร, 2526)

### 2.8.1 ข้อดีของการใช้เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูป

- 2.8.1.1 ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการเอนไซม์ตัวเดียว
- 2.8.1.2 ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการเอนไซม์หลายตัว แต่ไม่ต้องการตัวร่วมที่มีความเฉพาะเจาะจง
- 2.8.1.3 ใช้ในปฏิกิริยาคู่เดียวหรือหลายตัวที่ต้องการตัวร่วม
- 2.8.1.4 ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการให้ขบวนการเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ในวิถีที่เผาผลาญอาหารในร่างกาย (metabolic pathway) ทั้งแบบสารปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ
- 2.8.1.5 ใช้กับเซลล์อวัยวะ (cell originals) เช่น คลอโรพลาสต์ (chloroplast) หรือ เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเรียกว่าเซลล์ของอวัยวะที่ถูกตรึง (immobilized cell organelles)
- 2.8.1.6 ใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องได้

### 2.8.2 ข้อเสียของการใช้เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูป

- 2.8.2.1 เกิดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น
- 2.8.2.2 การส่งผ่านออกซิเจนในถังปฏิกิริยา (reactor) ควบคุมยาก
- 2.8.2.3 เกิดปัญหาการส่งผ่านมวลจากภายนอกสู่ภายใน และขบวนการเคลื่อนที่

## 2.9 ข้อควรคำนึงเมื่อใช้เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูปกับอาหาร (วิเชียร, 2526)

### 2.9.1 ด้านเศรษฐกิจ

ในการเตรียมเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูป ต้นทุนส่วนใหญ่อยู่กับการตรึงรูปและการทำให้บริสุทธิ์ แต่เทคนิคในการตรึงรูปก็สามารถลดขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ได้ เช่น การใช้ affinity chromatography เป็นต้น การตรึงเซลล์หรือเอนไซม์สำคัญที่การเลือกวัตถุดิบ ความคงตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และความสามารถของเอนไซม์ตรีงรูป ตลอดจนขณะการใช้เอนไซม์หรือเซลล์ติดต่อกันนั้นสามารถเปลี่ยนสับสเตรทให้เป็นผลผลิตมากน้อยเพียงใด

### 2.9.2 ความเหมาะสมของวัตถุที่ตรีง

ส่วนประกอบของเอนไซม์หรือเซลล์ตรีงรูปทุกชนิดต้องปลอดภัย และไม่ปนเปื้อนต่ออาหาร

### 2.9.3 ความสามารถในการเป็นตัวเร่ง

เอนไซม์หรือเซลล์เมื่อผ่านการตรีงรูปจะมีความสามารถลดลง ขึ้นอยู่กับเทคนิคการตรีงรูป คุณสมบัติของสารที่ใช้ เนื่องจากอาหารมีความแตกต่างทั้งส่วนประกอบ และคุณลักษณะ ดังนั้นจึงสามารถหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดมาใช้ในการตรีงเอนไซม์หรือเซลล์แต่ละชนิดได้

### 2.9.4 ความคงตัว

โดยทั่วไปความคงตัวของเอนไซม์หรือเซลล์ตรีงรูปจะเพิ่มขึ้นจากเดิม และอายุการเก็บรักษาตามปกติจะนานกว่าเอนไซม์ที่ละลายน้ำ

### 2.9.5 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

เมื่อใช้เอนไซม์หรือเซลล์ตรีงรูปกับอาหารติดต่อกันเป็นเวลานานๆ จะเกิดการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากสับสเตรทเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์เจริญได้

## 2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรีงเซลล์

Dembczynski และ Jankowski (2002) ศึกษาการเจริญและการสร้างกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ที่ถูกตรีงด้วยอัลจินเนต พบว่าจำนวนเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเจล มีปริมาณ  $4.8 \times 10^{10}$  cfu/cm<sup>3</sup> ซึ่งมากกว่าเซลล์อิสระที่มีปริมาณเซลล์เพียง  $5.7 \times 10^9$  cfu/cm<sup>3</sup> เม็ดเจลยังคงเสถียร ไม่มีการรั่วไหลแม้ระยะเวลาหมักจะผ่านไป 60 ชั่วโมง

Bergmaier และคณะ (2003) ศึกษาเปรียบเทียบการใช้เซลล์ตรีงและเซลล์อิสระ โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M ที่ถูกตรีงเพื่อผลิต exopolysaccharide พบว่าเซลล์ตรีงมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ และสามารถผลิตได้ 1.7 กรัมต่อลิตร

Adinarayana และคณะ (2004) ศึกษาชนิดของสารที่ใช้ในการตรีงเซลล์ ประกอบด้วยแคลเซียมอัลจินเนต พอลิอะคริลาไมด์ เจลาติน วุ้น และ k-carrageenan ในการผลิต alkaline protease โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* PE-11 พบว่าแคลเซียมอัลจินเนตมีประสิทธิภาพที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jones และคณะ (2005) ศึกษาการตรึงเซลล์ *Lactobacillus plantarum* 80 (pcBH1) เพื่อใช้ในการย่อยกรดของน้ำดี พบว่าการใช้เซลล์ตรึงรูปสามารถลดปริมาณกรดของน้ำดีได้ โดยการย่อยของกรดน้ำดีเป็น glycodeoxycholic acid และ taurodeoxycholic acid โดยเอนไซม์ bile salt hydrolase

Mandal และคณะ (2005) ศึกษาผลความเข้มข้นของอัลจินตในการตรึงเซลล์ โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* NCDC-298 ที่ถูกตรึง เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ตรึงสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะความเป็นกรดต่ำ ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูงในลำไส้ และในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

Idris และ Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นโซเดียมอัลจินตและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเจลต่อการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรด โดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมอัลจินตที่ร้อยละ 1, 2, 4 และ 8 พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินตร้อยละ 2 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด และศึกษาผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเจล 1, 3 และ 5 มิลลิเมตร พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเจล 1 มิลลิเมตร สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด

Kushal และคณะ (2006) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โพรไบโอติก 2 ชนิด คือ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* ในหนูทดลอง โดยการตรึงเซลล์ร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในการลด fecal coliforms

## 2.11 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (นिरนาม, 2550)

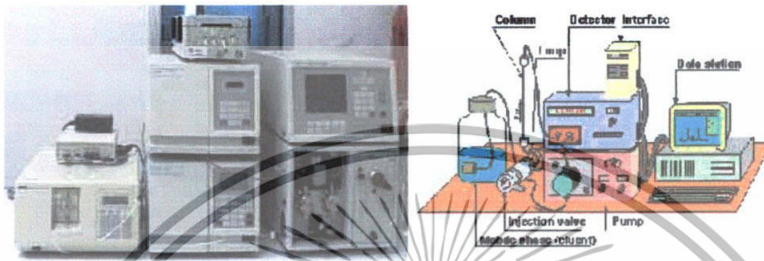
HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (Substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบในเฟสคงที่ (Stationary Phase) ของคอลัมน์ โดยมีเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับตัวตรวจวัด (Detector) จะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ (Analytes or Solutes) ได้อย่างต่อเนื่อง สามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพ (Qualitative Analysis) และเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (Low Volatile Substation) หรือน้ำหนักโมเลกุลสูง (High Molecular Weight Compounds) ลักษณะของเครื่อง High Performance Liquid Chromatography แสดงดังรูปที่ 2.5

### 2.11.1 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบทางชีวภาพ โพลีเมอร์ คู่อิออนิก ไอออนิก สารประกอบที่เสถียรได้ง่าย สารประกอบที่ระเหยยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอออนขนาดเล็ก ไมโครโมเลกุล ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลว ต้องละลายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และต้องกรองผ่านตัวกรอง การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ สารประกอบที่ถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์ โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป

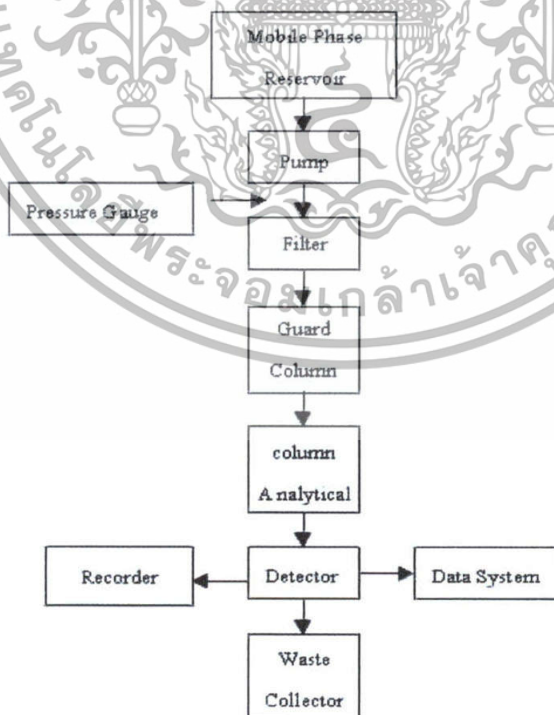


รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของเครื่อง High Performance Liquid Chromatography

### 2.11.2 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC

องค์ประกอบของเครื่อง High Performance Liquid Chromatography แสดงดังรูป

ที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงส่วนประกอบต่างๆของเครื่อง High Performance Liquid Chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.2.1 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase reservoir) เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ความจุประมาณ 1 ลิตร (ดังรูปที่ 2.7) แต่ใน Preparative HPLC ความจุของขวดควรจะมีมากกว่านี้ และจะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่จุดประสงค์ของการไล่อากาศ คือต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจน ซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ การไล่แก๊สจะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นสารมีขั้ว (Polar Solvents) เครื่อง HPLC ของบางบริษัทสามารถใช้กับระบบที่ไม่ต้องไล่แก๊สก่อนได้



รูปที่ 2.7 แสดงภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่

2.11.2.2 ระบบปั๊ม (Pumping System) โดยระบบปั๊มในเครื่อง HPLC จะมีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลจะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็ก และคอลัมน์มีขนาดเล็ก จึงจำเป็นต้องใช้ความดันที่สูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป ปั๊มแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

1. Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้มีค่าคงที่
  2. Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้มีค่าคงที่
- หลักการเลือกระบบปั๊มเพื่อใช้กับเครื่อง HPLC ควรพิจารณาจากสมบัติต่อไปนี้

ก. ปั๊มและส่วนประกอบควรจะทำด้วยวัสดุที่ทนต่อการสึกกร่อนด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทั้งนี้รวมทั้งท่อ fittings และ flow cell ด้วย เช่น ทำด้วยเหล็กไร้สนิมคุณภาพสูง เช่น polytetrafluoroethylene (PTFE), ruby และ sapphire

ข. ควรจะต้องสามารถปั๊มเฟสเคลื่อนที่ที่มีปริมาณมากได้อย่างต่อเนื่อง โดยไม่มีการขัดข้อง

ก. สามารถให้ความดันได้ถึง 4,000-6,000 psi เพื่อบีบให้เฟสเคลื่อนที่ไหลผ่านคอลัมน์ขนาดเล็ก ยาว 30 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กได้ และอย่างน้อยต้องให้ความดันได้ถึงขนาด 500 psi

ง. สามารถให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงถึง 3 มิลลิเมตรต่อนาที เป็นอย่างน้อย และคงที่

จ. ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต้องไม่เกิน 1-2 เปอร์เซ็นต์

ฉ. ควรจะมีปริมาตรภายในต่ำเพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อน

ช. ต้องไม่มี pluse หรือมีตัวที่ใช้ pluse damper หรือไม่ทำให้เกิด Dectector noise

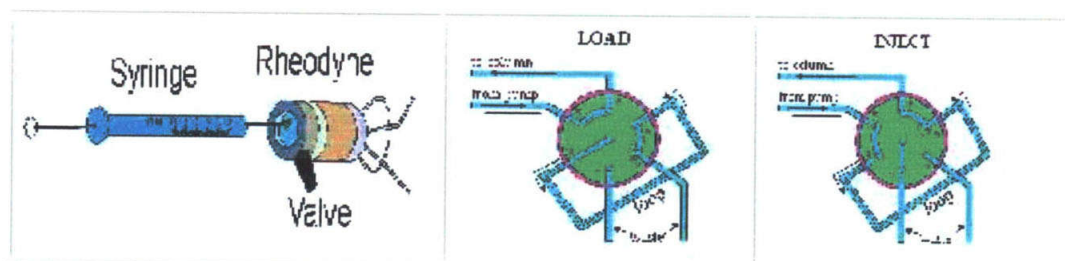
2.11.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน (Pressure Monitoring Devices) ซึ่งอยู่ระหว่างทางเข้าของคอลัมน์กับปั๊ม อุปกรณ์ตรวจวัดนี้จะบอกความดันของเฟสเคลื่อนที่ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ เป็นสิ่งที่บ่งบอกว่ามีอาการอุดตันหรือไม่ หรือการทำงานของปั๊มล้มเหลวหรือไม่ นอกจากนี้การทราบความดันของเครื่องจะช่วยให้การปรับพารามิเตอร์ต่างๆเป็นไปอย่างเหมาะสมที่สุด

2.11.2.4 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทำ Gradient Elution แบ่งได้ 2 แบบ

1. แบบ low pressure gradient เป็นแบบที่ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายที่ความดันบรรยากาศ ต่อจากนั้นก็จะถูกปั๊มต่อไปด้วยความดันสูงเข้าสู่คอลัมน์

2. แบบ High pressure gradient เป็นแบบที่ตัวทำละลายที่ใช้ใน Gradient Elution จะถูกปั๊มผ่าน high pressure pump เข้าสู่ low volume mixing chamber ก่อนจะเข้าสู่คอลัมน์

2.11.2.5 Sample Introduction Devices การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปยังคอลัมน์ LC (Liquid Chromatography Column) มีความสำคัญค่อนข้างมากต่อการแยกสาร ทั้งนี้เนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ควรจะอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ดังนั้นวิธีการต่างๆที่จะใช้มีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้คือ microsampling valve ส่วนวิธีที่ง่ายที่สุดคือใช้วิธีฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum ด้วย microsyringe และควรต้องระวังเนื่องจากความดันภายในสูง ลักษณะการฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography แสดงดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 แสดงการฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography โยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะเป็นกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.2.6 Microsampling Valve การผ่านสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์ LC โดยใช้ microsampling valve สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ในท่อซึ่งอยู่ภายนอกที่ต่อเข้ากับวาล์วนี้ microsampling valve ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันสามารถนำมาใช้กับสารตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5 มิลลิลิตร จนกระทั่งหลายมิลลิลิตร valve ประเภทนี้สามารถใช้งานได้ที่ความสูงถึง 5,000-6,000 psi โดยที่ไม่เกิดการรั่วไหล

2.11.2.7 Guard column เหมือนกับคอลัมน์จึงดักสารที่ไม่ละลาย หรืออนุภาคเล็กๆ เพื่อยืดอายุของคอลัมน์

2.11.2.8 คอลัมน์ ลักษณะทั่วไปของคอลัมน์แสดงดังรูป 2

- คอลัมน์ทำด้วยสแตนเลส (Stainless steel)
- เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1, 3, และ 4.6 มิลลิเมตร
- ความยาว 10, 12.5, 15 และ 25 เซนติเมตร
- ขนาดอนุภาค 3, 5 และ 10 มิลลิเมตร
- ปิดหัวและท้ายด้วย Stainless steel gauze
- Reducing unions

ภายในคอลัมน์จะบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งจนเต็ม ซึ่งอนุภาคนี้ต้องบรรจุให้แน่น และไม่มีช่องว่าง ต้องใช้ปั๊มช่วยให้ตัวทำละลายไหลผ่าน อุณหภูมิของคอลัมน์สามารถควบคุมได้ โดยการติดตั้งคอลัมน์ไว้ใน Heater Column ปัจจุบันคอลัมน์มีขนาดเล็กเรียกว่า Microbore colum



รูปที่ 2.9 แสดงคอลัมน์และอุปกรณ์ที่ใส่คอลัมน์

2.11.2.9 เครื่องตรวจวัด (Detector) สิ่งที่ต้องการคือ ความไวของเครื่องตรวจวัด ซึ่งสามารถตรวจวัดสิ่งที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น เครื่องตรวจวัดในอุดมคติควรมีลักษณะดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ มีความไวสูง และให้สัญญาณตอบรับ (response) ที่คาดคะเนได้ โยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคลื่อนที่

- ให้สัญญาณตอบรับได้กับสารทุกชนิด
- ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และอัตราเร็วการไหลของเฟส

- เชื้อถือได้ และง่ายต่อการใช้งาน
- ความสัมพันธ์ของความเข้มข้น และสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัด

ควรมีสภาพเชิงเส้น (linearity) ในช่วงกว้าง

- ไม่ทำลายสาร
- ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์สำหรับพีก (peak) ที่ต้องการตรวจ

#### 2.11.2.10 เครื่องตรวจวัดของ LC สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด

1. bulk property หรือ general detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมกับของตัวถูกละลาย เช่น refractive index และ conductivity detectors

2. solute property หรือ selective detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น UV-VIS, fluorescence หรือ electrochemical detectors เป็นต้น

2.11.2.11 ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-VIS Detectors) อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง ลักษณะที่พิเศษคือไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ลักษณะของเครื่องยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์แสดงดังรูปที่ 2.10 ยูวี-วิสิเบิลที่นิยมใช้ในเครื่อง HPLC แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ

1. Fixed-wavelength UV detector
2. Variable UV-VIS detector
3. Photodiode-array detector



รูปที่ 2.10 แสดงเครื่องยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์

#### 2.11.2.12 เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรคโตมิเตอร์ (Differential Refractometers)

นิยมมากในเครื่อง HPLC รองลงมาจากเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดัชนีหักเหของสารเป็นเอกลักษณ์ที่ส่งวนไหลสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า ไม่นิยมญาติเห็นาไปเซปรีเยชันด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หักเห (refractive index, RI) อย่างต่อเนื่องระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสคงที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายละลายอยู่ ขณะผ่านออกจากคอลัมน์สามารถให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด ทรายที่ตัวถูกละลายมีค่าดัชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่ ลักษณะของเครื่องคิฟเฟอร์เรนเชียลรีแฟรคโตมิเตอร์ (Differential Refractometers) แสดงดังรูปที่ 2.11

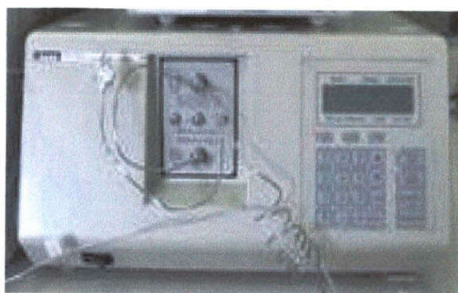
เครื่อง RI ที่สำคัญมีอยู่ 3 ชนิด

1. Fresnel Refractometer
2. Deflection Refractometer
3. Interferometric Refractometer



รูปที่ 2.11 แสดงเครื่องคิฟเฟอร์เรนเชียลรีแฟรคโตมิเตอร์

2.11.2.13 ดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent Detector) มีสภาพความไวสูง เฉพาะ (selective) เนื่องจากมันมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้น (excited) ด้วยแสงยูวี ดีเทคเตอร์ ซึ่งมีประโยชน์มากเมื่อนำมาตรวจหาสารในสารตัวอย่างทางชีวภาพ (biological samples) ที่มีปริมาณน้อย เครื่องดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนซ์แสดงดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 แสดงดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนี้

### 2.11.3 การเลือกใช้และพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ทาง LC

การจะเลือกเทคนิคใดในการแยกสารตัวอย่าง ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆที่ต้องพิจารณา

- 2.11.3.1 ธรรมชาติของสารตัวอย่าง
- 2.11.3.2 วิธีที่ต้องการนำมาใช้แยกสารตัวอย่าง
- 2.11.3.3 ความสะดวกในการทดลอง
- 2.11.3.4 ประสิทธิภาพกับวิธีที่ใช้แยกสารตัวอย่าง
- 2.11.3.5 สิ่งอื่นๆที่อาจพิจารณา

### 2.11.4 การพัฒนาวิธีการแยกสารที่เฉพาะ

- 2.11.4.1 การเลือกวิธีของ LC
- 2.11.4.2 การเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสม
- 2.11.4.3 การกำหนดสภาวะของการทดลองที่เหมาะสม
- 2.11.4.4 การพิจารณาการใช้เทคนิคบางเทคนิคในการแก้ปัญหการแยกให้ดีขึ้น

### 2.11.5 การประยุกต์ใช้งานทั่วไป

- 2.11.5.1 การวิเคราะห์ทางเคมี (Petrochemical Analysis) เช่น อะลิฟาติก (Aliphatic) และอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (Aromatic Hydrocarbons)
- 2.11.5.2 การวิเคราะห์ทางสิ่งแวดล้อม (Environmental Analysis) เช่น PAHs ยาฆ่าแมลง (Pesticides) และยาฆ่าวัชพืช (Herbicides)
- 2.11.5.3 การวิเคราะห์ทางเภสัชภัณฑ์ (Pharmaceutical Analysis) เช่น สารสเตียรอยด์ (Steroids)
- 2.11.5.4 ผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ (Natural Products) เช่น เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid)
- 2.11.5.5 การวิเคราะห์ทางชีวเคมี (Biochemical Analysis) เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน
- 2.11.5.6 พอลิเมอร์ (Thermoplastic Polymers)
- 2.11.5.7 ใช้ทำให้สารที่สนใจในของผสมมีความบริสุทธิ์ขึ้น
- 2.11.5.8 ใช้ในงานควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์
- 2.11.5.9 ใช้ติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมีในการวิเคราะห์สารต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.11.6 ข้อจำกัดของเทคนิค

2.11.6.1 ในการระบุชนิดสารประกอบถูกจำกัดจำเป็นต้องมีสารมาตรฐานเทียบเคียงเสมอ ยกเว้นในกรณีที่มีการต่อเชื่อมกับเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี (MS)

2.11.6.2 กำลังในการแยกถูกจำกัดในกรณีที่สารตัวอย่างมีความซับซ้อน

2.11.6.3 เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน อาจนานถึง 2 ชั่วโมง

2.11.6.4 จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

ที่มา : <http://www.kmitl.ac.th/sisc/HPLC/Model.htm> - 30k



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์

Peristaltic pump ของบริษัท Heidolph รุ่น PD 5201

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท SHIMADZU

รุ่น C-R7 Ae plus

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

ตู้เย็นอุณหภูมิตั้งที่ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

เครื่องเขย่า (Shaker) ของบริษัท Gallenkamp

เครื่องอบลมร้อน ของบริษัท Binder

โถดูดความชื้น (Desiccator)

ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)

เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX<sup>R</sup>

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX<sup>R</sup>

กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX<sup>R</sup>

บีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX<sup>R</sup>

ปิเปตต์ (Pipette)

สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89, 1.52 และ 2.06 มิลลิเมตร ของบริษัท Cple-

Parmer Instrument Company รุ่น Tygon tubing 2-stop

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2 สารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป MRS

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

เปปโตน (Peptone)

แอมโมเนียมซัลเฟต ( $\text{NH}_2 \text{SO}_4$ )

น้ำตาลกลูโคส (Glucose)

น้ำกลั่น

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )

แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ )

โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ )

โพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

ฟอสฟอริก ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )

### 3.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการหมักกรดแลคติก (ดัดแปลงจาก Youssef และคณะ, 2000 ; Vasala และคณะ, 2005)

สารสกัดยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลกลูโคส	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.1	กรัมต่อลิตร

#### วิธีการ

คำนวณสูตรอาหารต่อปริมาตร 175 มิลลิลิตร แล้วซึ่งส่วนประกอบทั้งหมด นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 (Chauhan และคณะ, 2005) จากนั้นจึงปรับพีเอชเป็น 6.5 (Idris และ Suzana, 2006 ; John และคณะ, 2006 ; Nancib และคณะ, 2001) ก่อนนำไปนี้้งมาเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (น้ำตาลกลูโคส แยกมาเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

ใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

#### 3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

ใช้เข็มเย็บเชื้อ (needle) เย็บเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 แล้วลาก (Streak) ลงบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Idris และ Suzana, 2006 ; John และคณะ, 2006 ; Youssef และคณะ, 2000) เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นจึงใช้พาราฟิล์มพันปากหลอดทดลองให้แน่น แล้วเก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกใส่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (Subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

#### 3.4.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

ถ่ายเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 จำนวน 2 หลบ ลงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Nancib และคณะ, 2005) จากนั้นจึงเก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Senthuran และคณะ, 1999) (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

### 3.5 ขั้นตอนการตรึงเซลล์

ขั้นตอนการตรึงเซลล์มีดังนี้ (ประยุกต์จาก สุรีย์, 2543)

3.5.1 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 8.75 มิลลิลิตร (ร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ในการหมักกรดแลคติก) (Fitzpatrick และ O'Keeffe, 2001) ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง

3.5.2 นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันจนเกิดเป็นเซลล์แขวนลอย จากนั้นจึงเทลงในสารละลายโซเดียมอัลจินเตผืนแปร ความเข้มข้นตามชุดการทดลอง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วคนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.5.3 นำสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในตามชุดการทดลองที่จะศึกษาต่อเข้ากับ Peristaltic pump แล้วให้ปลายข้างหนึ่งจุ่มลงในสารละลายโซเดียมอัลจินเตที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์แขวนลอยซึ่งวางอยู่บน stirrer ตลอดการตรึงเซลล์ (Mandel และคณะ, 2005) ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งจุ่มลงในฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ (Mandel และคณะ, 2005) โดยมีระยะห่างระหว่างปลายสายยางกับผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 15 เซนติเมตร (จงกมล, 2550) จากนั้นเปิดเครื่อง Peristaltic pump ให้เครื่องทำงานที่อัตราการไหล 7 มิลลิลิตรต่อนาที

3.5.4 หลังจากดูดสารละลายโซเดียมอัลจินเตที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกับเซลล์แขวนลอยลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์หมด ให้เก็บเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

### 3.6 การศึกษาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งใช้สูตรอาหารตามข้อ 3.3 ได้ทำการแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด (โดยออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล) ดังนี้

ชุดที่ 1 : สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร ผันแปรความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5

ชุดที่ 2 : สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร ผันแปรความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5

ชุดที่ 3 : สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร ผันแปรความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5

ทำการทดลองโดยนำเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงตามการทดลองข้อ 3.5 มาล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ก่อนนำไปหมักในอาหารสังเคราะห์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง (Idris และ Suzana, 2006 ; John และคณะ, 2006) จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก และปริมาณน้ำตาล โดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ของ Dubois 1956 (ภาคผนวก ข) และส่วนหนึ่งนำไปกรองผ่านเซลลูโลส-เมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร) ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Inersil C8-3 มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3.0) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.7 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 33 พลาสติก ทำการทดลองโดยเลือกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินेटที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกที่ดีที่สุดจากข้อ 3.6 มาใช้ในการตรึงเซลล์ นำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินेटที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากันหมักในอาหารสังเคราะห์ (สูตรอาหารตามข้อ 3.3) ปริมาตร 175 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างครั้งละ 3 พลาสติก ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาล เช่นเดียวกับข้อ 3.6 และศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ทั้งหมดด้วยวิธี Total plate count (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ข)

### 3.8 การศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร

การศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยเลือกสถานะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ และสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก เช่นเดียวกับข้อ 3.7 ทำการหมักในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร ดังนี้

แบบที่ 1 : หมักในพลาสติกขนาด 2 ลิตร โดยนำเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ปริมาตร 70 มิลลิลิตร (ร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ในการหมักกรดแลคติก) มาทำการหมักด้วยอาหารสังเคราะห์ ปริมาตร 1400 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง

แบบที่ 2 : หมักในถังหมัก (Fermenter) ขนาด 2 ลิตร โดยนำเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ปริมาตร 70 มิลลิลิตร (ร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ในการหมักกรดแลคติก) มาทำการหมักด้วยอาหารสังเคราะห์ ปริมาตร 1400 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และมีการกวนด้วยอัตราเร็วของใบพัด 100 รอบต่อนาที (Dembezyński และ Jankowski, 2002 ; Gao, 2006)

ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก และปริมาณน้ำตาล เช่นเดียวกับข้อ 3.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการศึกษานาถเมล็ดเจลและความเข้มข้นของไซโตเดียมอัลจินेटที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ซึ่งทำการทดลองแบบแฟกทอเรียลขนาด 3x5 ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (3x5 Factorial Experiment in Completely Randomized Design) โดยทดลอง treatment ละ 3 ซ้ำ จะทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for Social Science) เวอร์ชัน 16 และทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อน (Multiple comparison) ด้วยวิธีการของ Duncan ส่วนในการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร จะทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for Social Science) เวอร์ชัน 16 เช่นเดียวกัน โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวแปร 2 ตัวแปร ด้วยวิธี Independent Samples T-Test



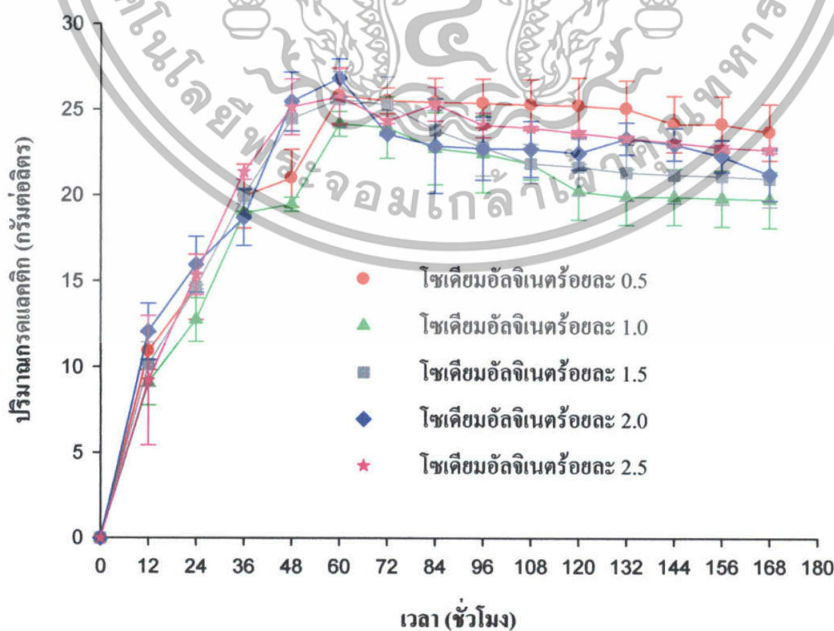
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและวิจารณ์

#### 4.1 ผลการศึกษาขนาดเมล็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

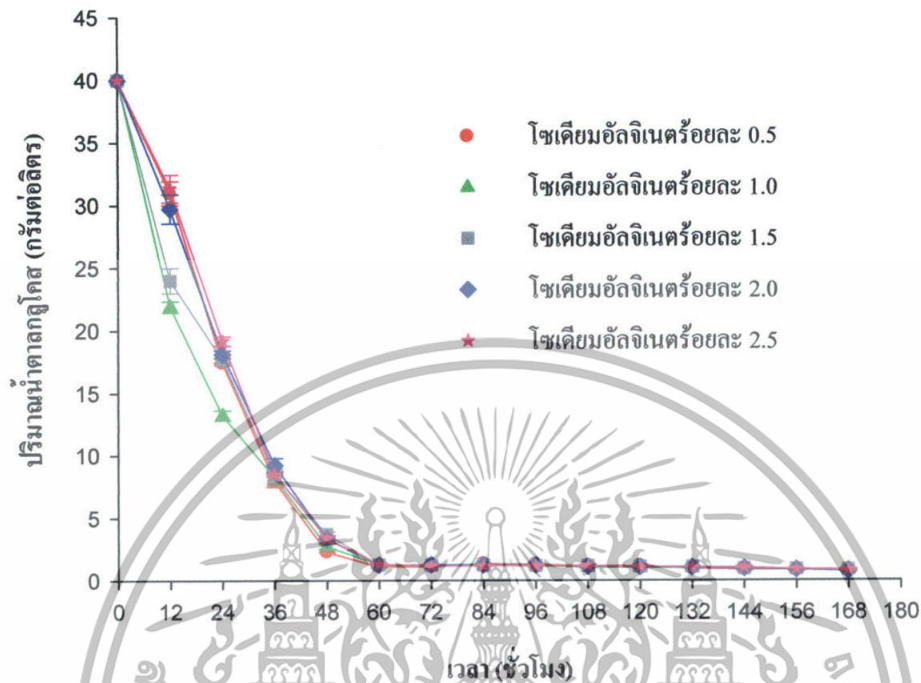
การศึกษานี้ศึกษาขนาดเมล็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก พบว่าในการทดลองชุดที่ 1 ซึ่งทำการทดลองโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร ผันแปรความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินตร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง จะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 26.82 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินตร้อยละ 2.0 รองลงมาคือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินตร้อยละ 0.5, 2.5, 1.5 และ 1.0 ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 25.81, 25.75, 25.59 และ 24.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 60 เมื่อสิ้นสุดการหมัก (ที่ 168 ชั่วโมง) พบว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 98.06, 97.84, 97.88, 97.80 และ 97.81 ตามลำดับ ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ดังแสดงในรูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ



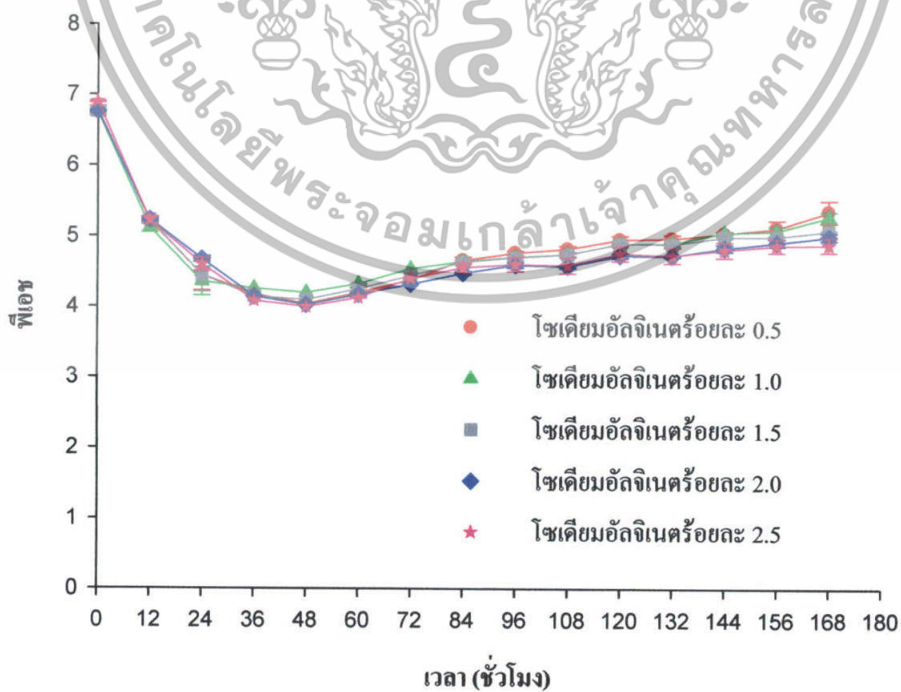
รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

ภายใน 0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินตแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.2** แสดงปริมาณน้ำตากากูโคสที่ลดลงจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน

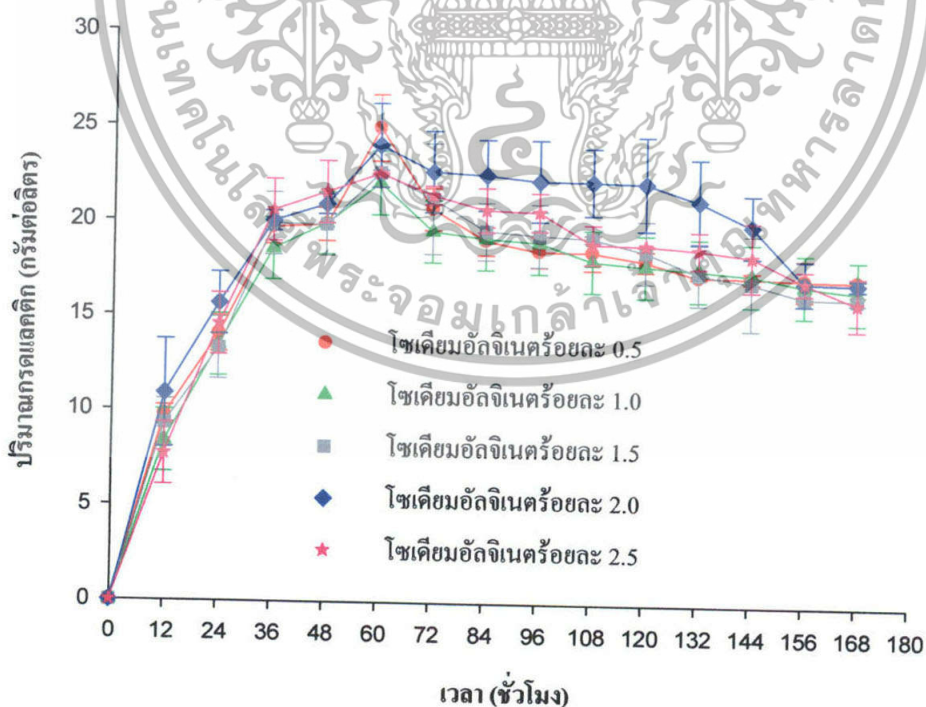


**รูปที่ 4.3** แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน

0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกันให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

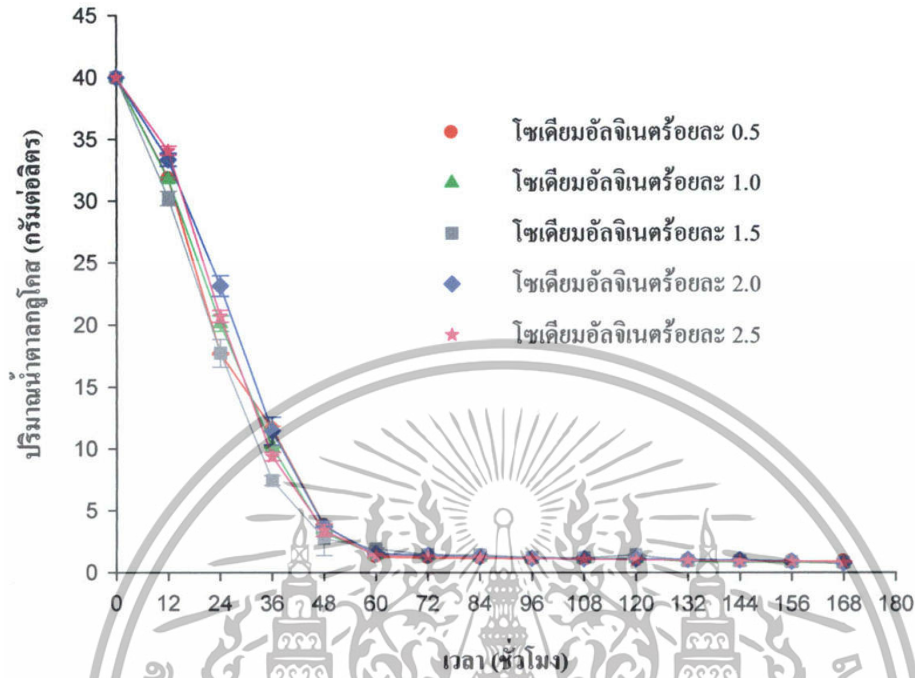
จากรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชแนวโน้มน่าใกล้เคียงกัน คือมีค่าพีเอชต่ำสุดเป็น 4.0, 4.2, 4.1, 4.0 และ 4.0 จากพีเอชเริ่มต้น 6.5 เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ตามลำดับ

การทดลองชุดที่ 2 ทำการทดลองโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร ผันแปรความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง จะได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด 24.91 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตร้อยละ 0.5 รองลงมาคือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตร้อยละ 2.0, 1.5, 2.5 และ 1.0 ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 24.00, 22.58, 22.52 และ 22.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 60 เมื่อสิ้นสุดการหมัก (ที่ 168 ชั่วโมง) พบว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 97.67, 98.09, 97.91, 97.93 และ 98.10 ตามลำดับ ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ดังแสดงในรูปที่ 4.4, 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ

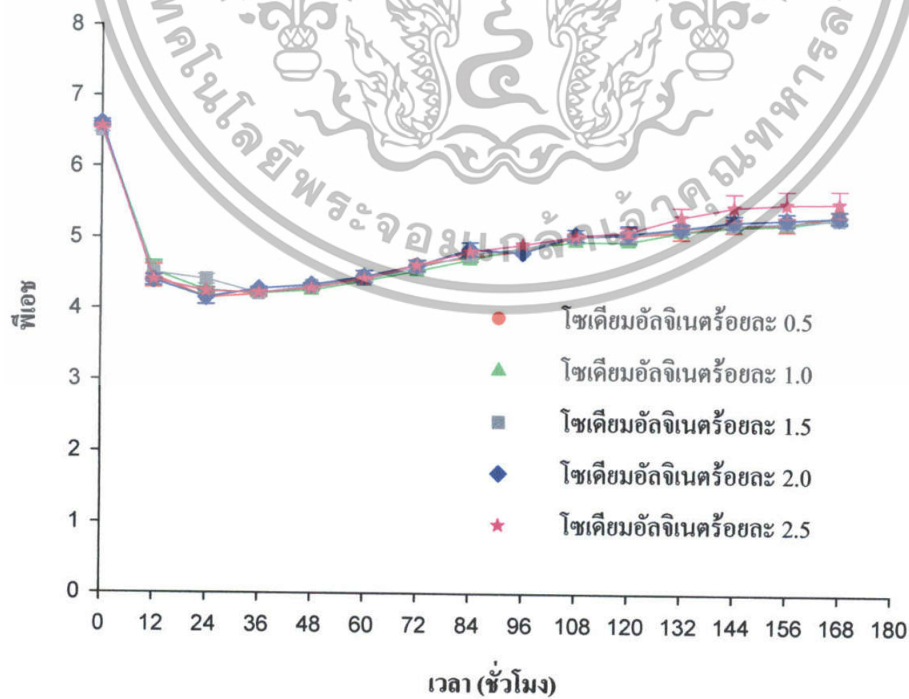


รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



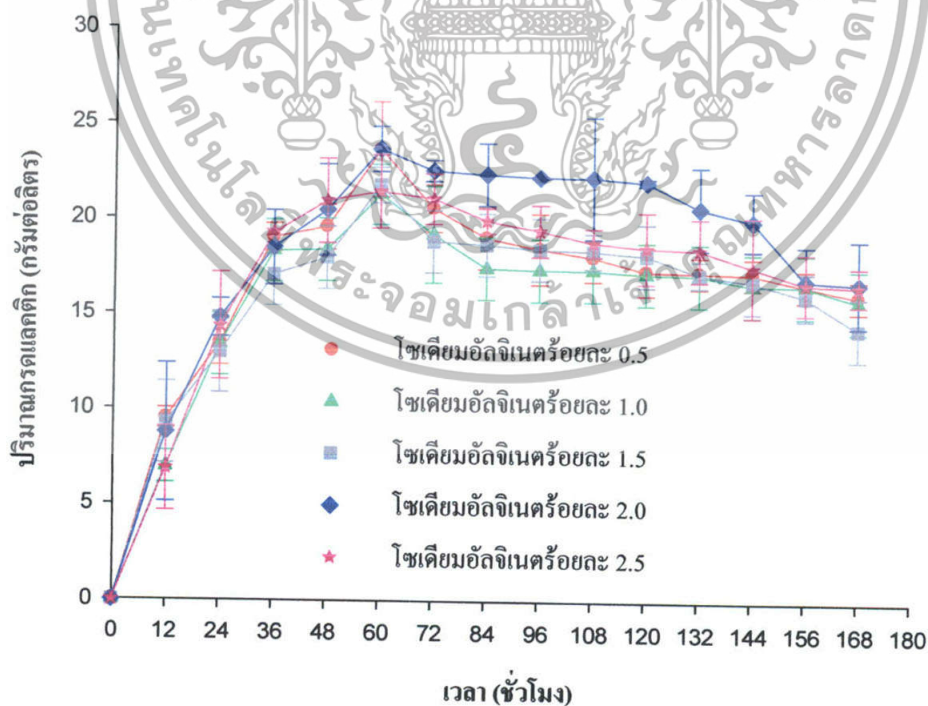
รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณน้ำตากลูกโกสที่ลดลงจากการตรึงเซลล์ด้วยสายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน



รูปที่ 4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน  
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่โดยไม่หวังกำไร เพื่อให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

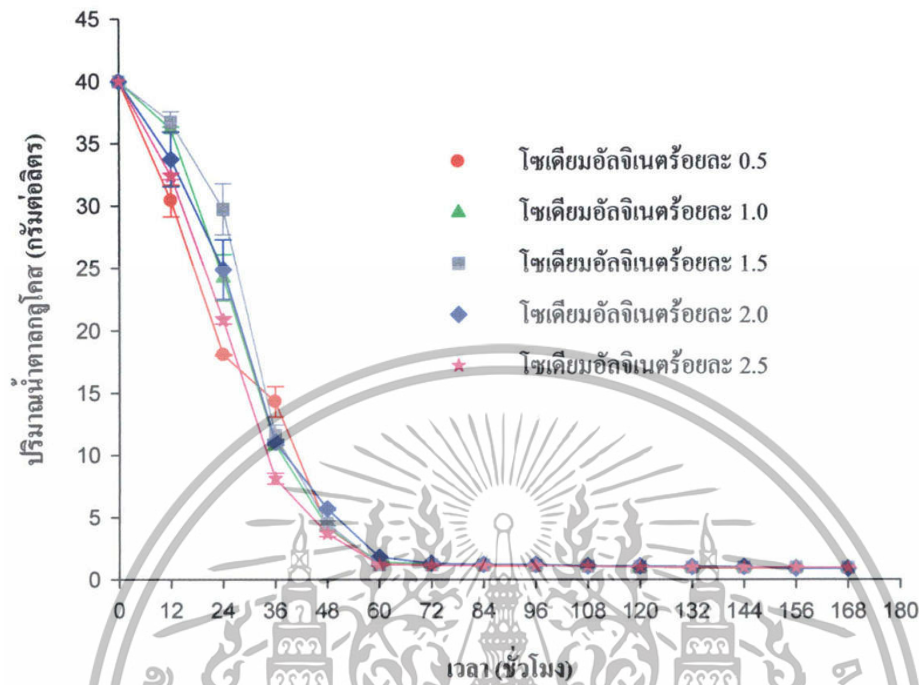
จากรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชเท่ากัน คือมีค่าพีเอชต่ำสุดเป็น 4.2 จากพีเอชเริ่มต้น 6.5 เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตททั้ง 5 ความเข้มข้น

การทดลองชุดที่ 3 ทำการทดลองโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร ผันแปรความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง จะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 23.62 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2.0 รองลงมาคือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 0.5, 1.5, 2.5 และ 1.0 ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 23.60, 21.74, 21.41 และ 21.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 60 เมื่อสิ้นสุดการหมัก (ที่ 168 ชั่วโมง) พบว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 97.74, 97.71, 97.58, 97.57 และ 97.59 ตามลำดับ ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ดังแสดงในรูปที่ 4.7, 4.8 และ 4.9 ตามลำดับ

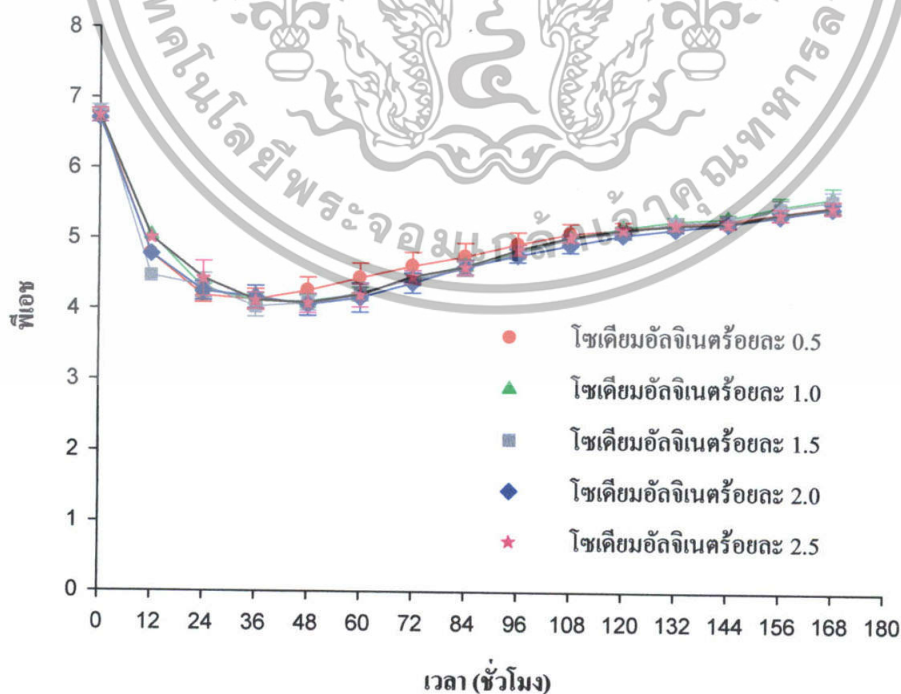


รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตทแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณน้ำตากลูโคสที่ลดลงจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน

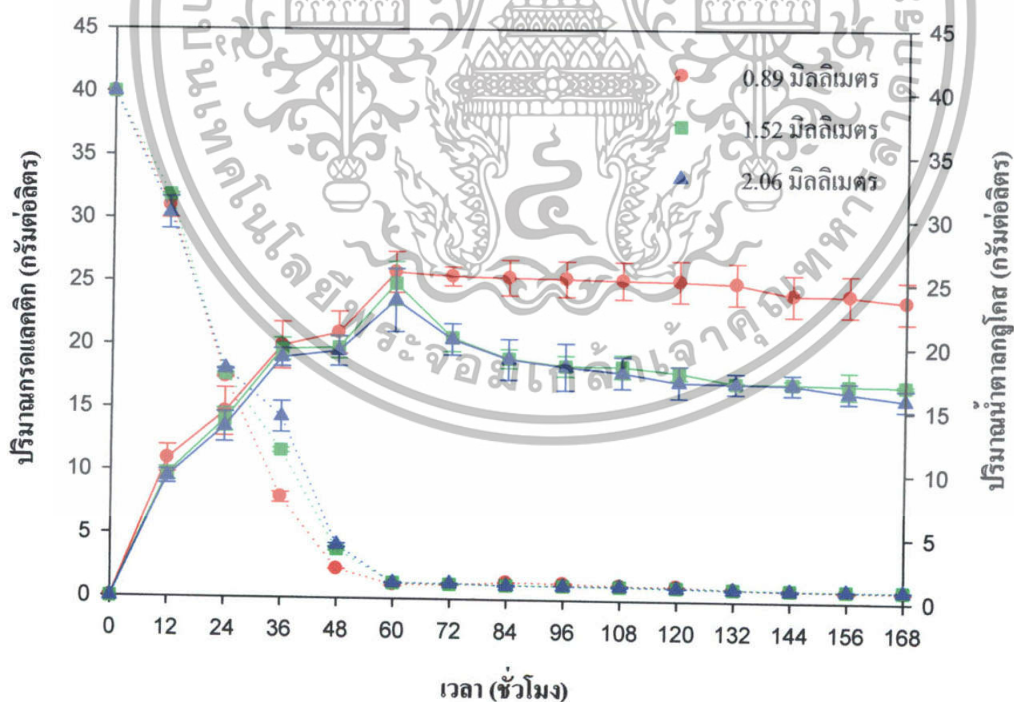


รูปที่ 4.9 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี การนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย การนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย การนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

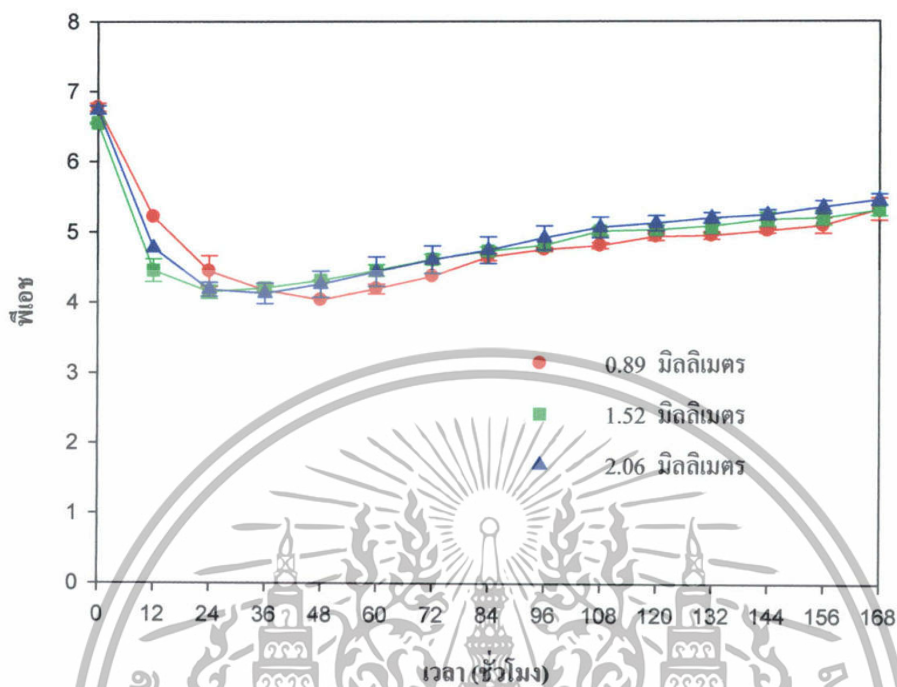
จากรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชแนวโน้มน่าใกล้เคียงกัน คือมีค่าพีเอชต่ำสุดเป็น 4.1, 4.1, 4.0, 4.1 และ 4.1 จากพีเอชเริ่มต้น 6.5 เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ตามลำดับ

จากการศึกษาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกทั้ง 3 ชุด จะได้ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลที่ลดลง และการเปลี่ยนแปลงพีเอชทุกๆ 12 ชั่วโมง จากการหมักเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 6.1 ถึง 6.9 (ภาคผนวก ก) และสามารถแสดงแนวโน้มเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อใช้สายยางที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน ที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ถึง รูปที่ 4.19

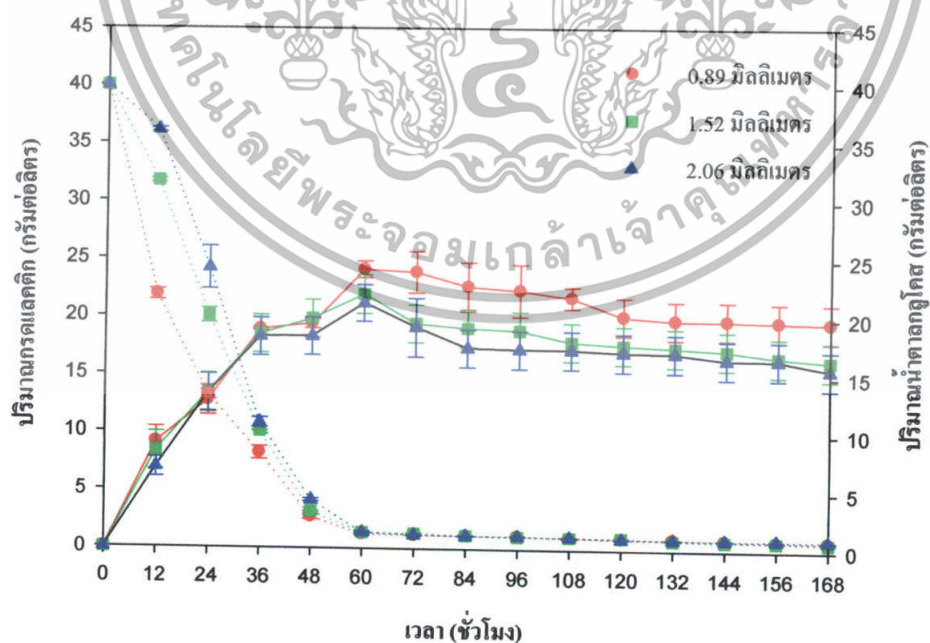


รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

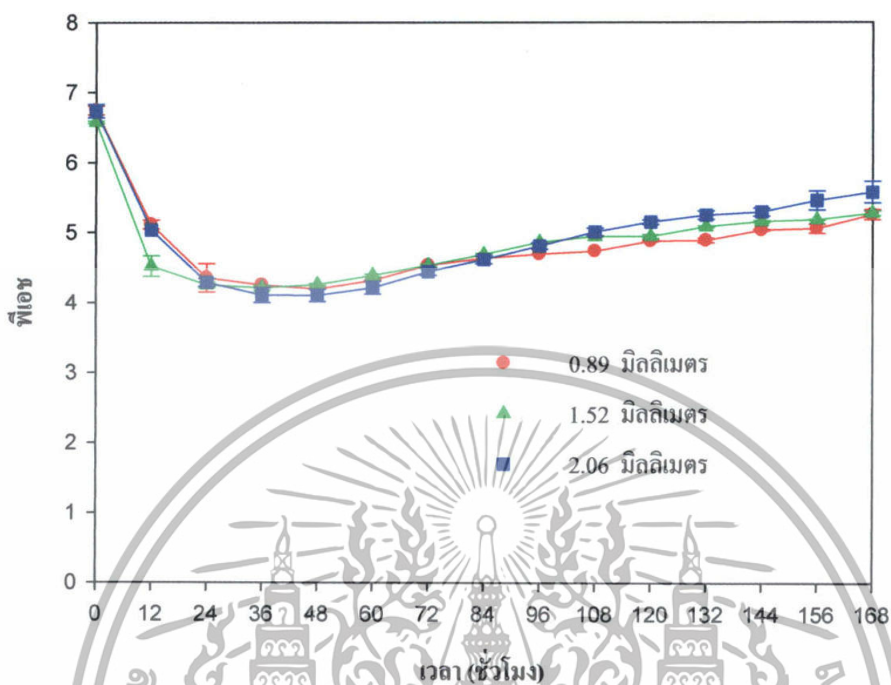


รูปที่ 4.11 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตอ์ร้อยละ 0.5

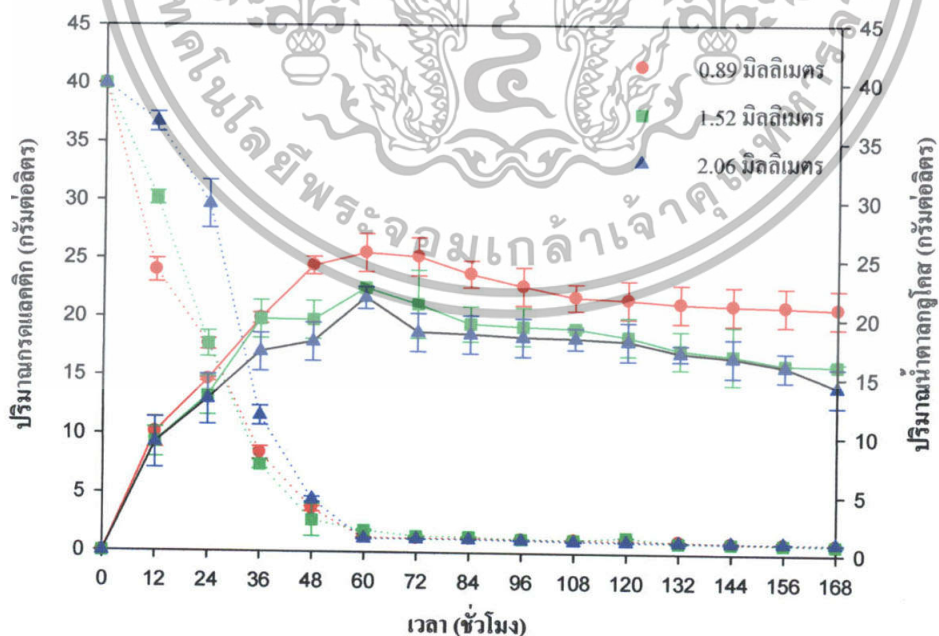


รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง จากการตรึงเซลล์ด้วยสายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตอ์ร้อยละ 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

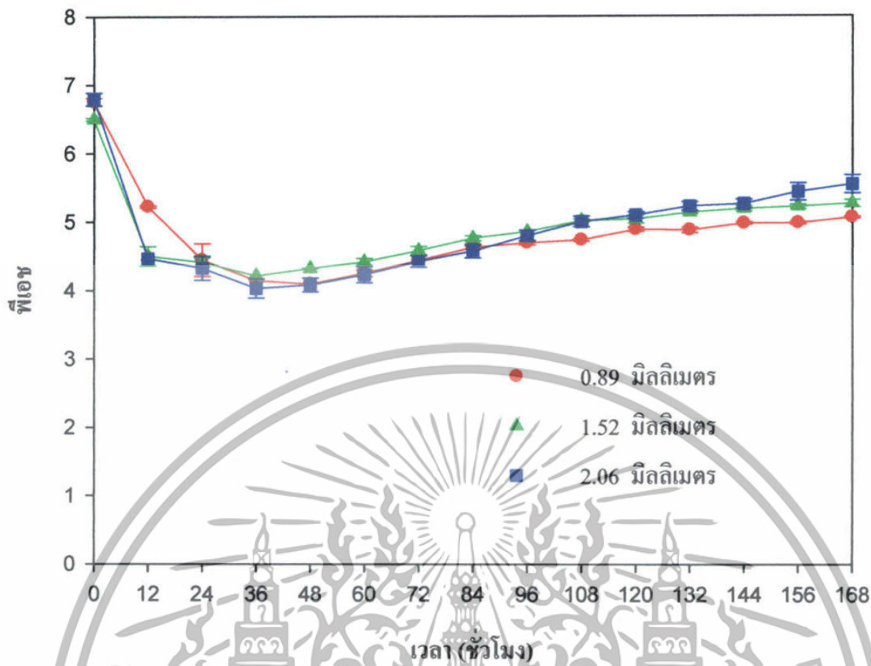


รูปที่ 4.13 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตอ์ร้อยละ 1.0

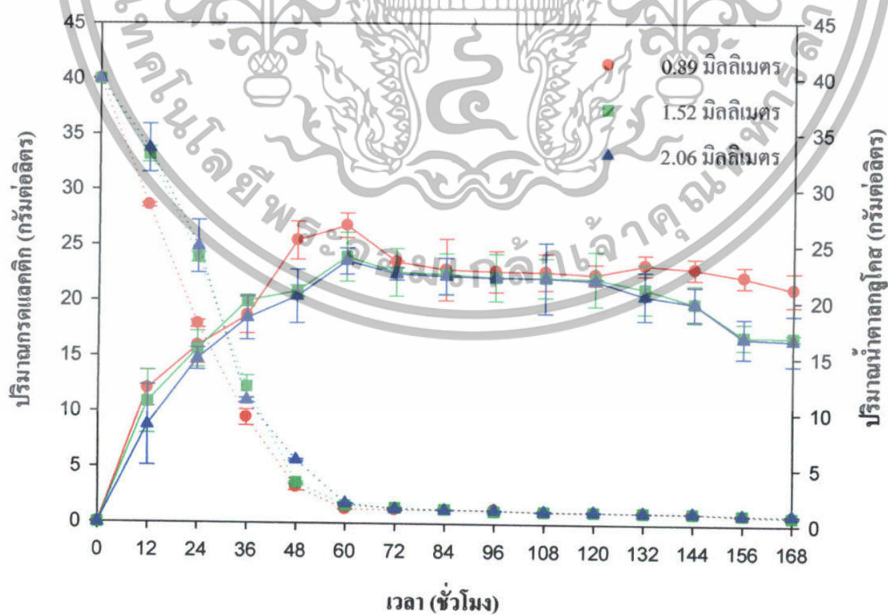


รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตกลงที่ลดลง จากการตรึงเซลล์ด้วยสายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตอ์ร้อยละ 1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

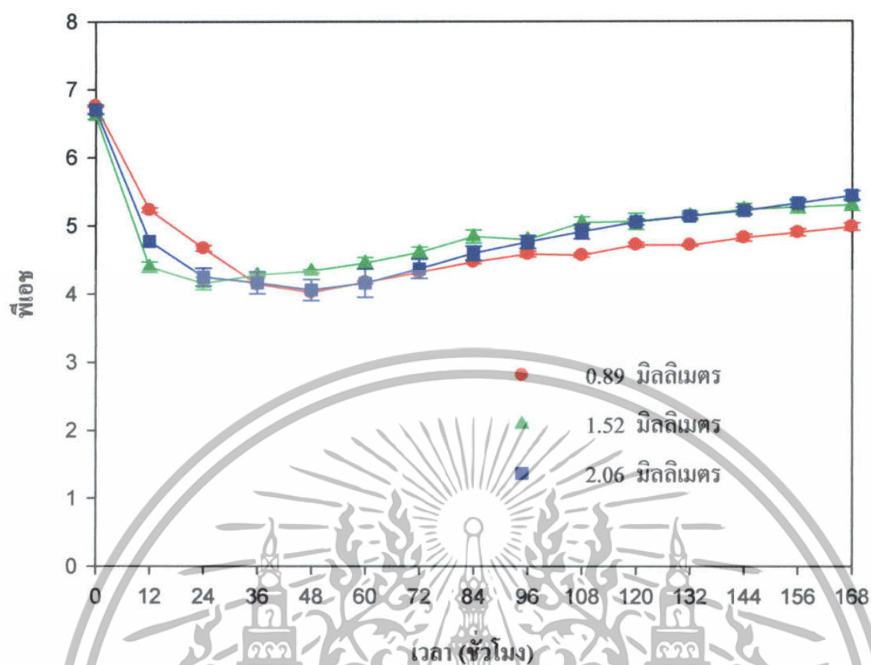


รูปที่ 4.15 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 1.5

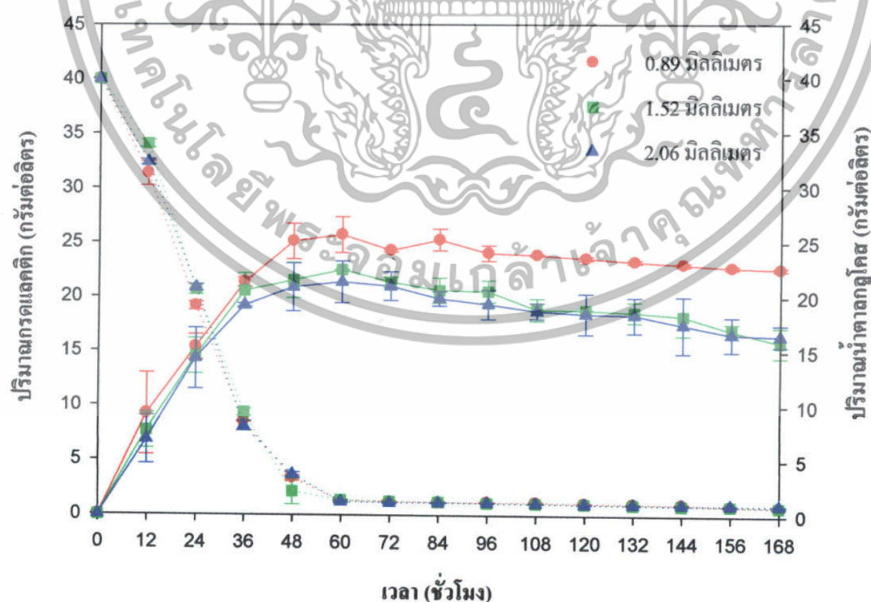


รูปที่ 4.16 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

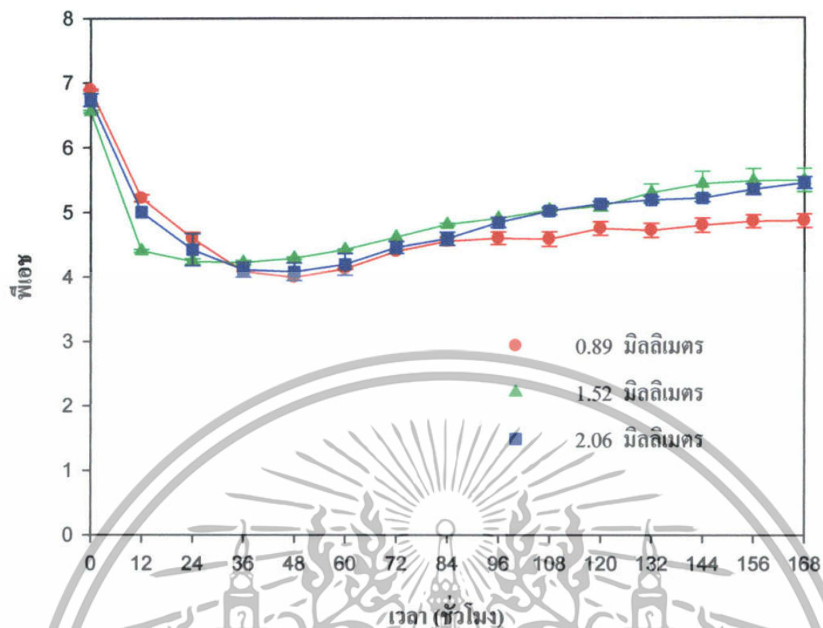


รูปที่ 4.17 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตอ์ร้อยละ 2.0



รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตากลูโคสที่ลดลง จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตอ์ร้อยละ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.5

จากการศึกษาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ซึ่งทำการทดลองแบบแฟคทอเรียลขนาด 3x5 ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (3x5 Factorial Experiment in Completely Randomized Design) สามารถแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลคติกสูงสุด ได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้สูงสุด (กรัมต่อลิตร) ณ ชั่วโมงที่ 60 จากการศึกษาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

		ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต				
		ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 1.0	ร้อยละ 1.5	ร้อยละ 2.0	ร้อยละ 2.5
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง (มิลลิเมตร)	0.89	25.81	24.16	25.59	26.82	25.75
	1.52	24.91	22.03	22.58	24.00	22.52
	2.06	23.6	21.25	21.74	23.62	21.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าการใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีกว่าการใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 และ 2.06 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในทุกความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเต แสดงว่าขนาดของเม็ดเจลมีผลต่อการผลิตกรดแลคติก เนื่องจากขนาดเม็ดเจลเล็กจะช่วยเพิ่มพื้นที่สัมผัสของเม็ดเจลกับอาหาร ทำให้การแพร่ผ่านของอาหารเข้าไปในเม็ดเจลมีมากขึ้น และสามารถปลดปล่อยกรดแลคติกได้ดีกว่าขนาดเม็ดเจลใหญ่ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Idris และ Suzana (2006) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากการใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล 1, 3 และ 5 มิลลิเมตร โดยเชื้อ *L. delbrueckii* ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเต พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุดเมื่อใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล 1 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงถึง 30.27 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตกรดแลคติกร้อยละ 96.7 แต่เมื่อใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล 5 มิลลิเมตร จะทำให้ผลผลิตกรดแลคติกลดลงเหลือเพียง 17.65 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตกรดแลคติกร้อยละ 50.70

นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Abdel-Naby และคณะ (1992) ซึ่งทำการผลิตกรดแลคติกจากการตรึงเซลล์เชื้อแลคติกแอซิกแบคทีเรีย พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลลดลง

Adinarayana และคณะ (2004) ศึกษาผลของขนาดเม็ดเจลที่มีผลต่อการผลิต alkaline protease โดยเชื้อ *B. subtilis* PE-1 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเต พบว่าขนาดเม็ดเจลเล็กสามารถผลิต alkaline protease ได้ดีกว่าขนาดเม็ดเจลใหญ่

เมื่อพิจารณาผลความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเต พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2.0 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่าความเข้มข้นอื่น ยกเว้น ในกรณีที่ใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 0.5 จะได้ปริมาณกรดแลคติกที่สูงกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2.0

การใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2.0 ที่ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด อาจเนื่องจากการสร้างโครงร่างตาข่ายระหว่างสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมอัลจินเตมีความหนาที่เหมาะสม ทำให้มีช่องว่างในการแพร่ของอาหารและการปลดปล่อยกรดแลคติกดีกว่าเมื่อใช้โซเดียมอัลจินเตที่ความเข้มข้นอื่น ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับเม็ดเจล แต่ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จะลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตที่สูงขึ้นจะส่งผลให้เม็ดเจลหนามากเกินไป การแพร่ผ่านของอาหารเป็นไปได้ยาก เชื้อแบคทีเรียได้รับอาหารไม่เพียงพอ จึงมีการผลิตกรดแลคติกต่ำ แต่อย่างไรก็ตามการใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่น้อยกว่าร้อยละ 2.0 จะทำให้เม็ดเจลบาง ง่ายต่อการแตกตัวของเม็ดเจล เนื่องจากมีความคงตัวของโครงสร้างต่ำ จึงไม่สมควรนำมาใช้

จากการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Idris และ Suzana (2006) ซึ่งทำการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1, 2, 4, 6 และ 8 ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. delbrueckii* โดยใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล 1 มิลลิเมตร พบว่าการใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2 มีอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสอย่างรวดเร็ว และสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่าการใช้โซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นอื่น โดยสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงถึง 29.39 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตกรดแลคติกร้อยละ 93.8

Meng-Chaun และคณะ (2008) ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ *B. kaustophilus* leucine aminopeptidase ที่ถูกตรึงด้วย Ca-alginate/k-carageenan โดยศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตในช่วงร้อยละ 0.5-4.0 พบว่าการใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตในช่วงร้อยละ 2.0 จะทำให้มีกิจกรรม (activity) สูงถึงร้อยละ 61 ซึ่งสูงกว่าการใช้โซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นอื่น

Ghasem และคณะ (2004) ศึกษาความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.5, 2.0, 3.0 และ 6.0 ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0 สามารถให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด

อย่างไรก็ตามในบางการทดลองพบว่าความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 3 เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ ดังเช่นการทดลองของ Ellaih และคณะ (2004) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2, 3 และ 4 การทดลองของ Adinarayana และคณะ (2004) ซึ่งศึกษาผลของโซเดียมอัลจิเนตต่อการผลิต alkaline protease ของเชื้อ *B. subtilis* PE-1 โดยศึกษาที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 พบว่า alkaline protease จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต และความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 3 จะให้ปริมาณ alkaline protease ดีที่สุด และการทดลองของ Anisha และ Prema (2008) ได้ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 พบว่าผลผลิตของเอนไซม์กาแลคโตซิเดส ( $\alpha$ -galactosidase) จากเชื้อ *Streptomyces griseoalbus* สูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 3 เช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการผลิตผลิตภัณฑ์และการใช้เชื้อที่แตกต่างกัน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่สร้างและเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ด้วย

เมื่อนำข้อมูลของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 60 (ตารางที่ 4.1) จากการศึกษาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (ภาคผนวก ง) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.2** แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบความแตกต่างของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้สูงสุด (ชั่วโมงที่ 60) จากการศึกษาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	P-value
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง (A)	2	87.685	43.843	6.264	0.005
ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต (B)	4	38.405	9.601	1.372	0.267
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	8	6.784	0.848	0.121	0.998
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	30	209.988	7.000		
รวม	44	342.863			

จากตารางที่ 4.2 พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตมีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในระดับที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย มีค่ามากกว่า 0.05

เมื่อพิจารณาเพียงปัจจัยเดียว พบว่าขนาดเม็ดเจลมีผลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในระดับที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งดูได้จากค่า P-value มีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยางทั้ง 3 ขนาด มีอย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อน (Multiple comparison) เพื่อหาขนาดเม็ดเจลที่ให้ผลต่อการผลิตกรดแลคติกที่แตกต่างกันด้วยวิธีการของ Duncan ดังแสดงในตารางที่ 4.3

**ตารางที่ 4.3** แสดงผลของขนาดเม็ดเจลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง (มิลลิเมตร)	ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้สูงสุด (กรัมต่อลิตร)*
0.89	25.63 <sup>a</sup>
1.52	23.21 <sup>b</sup>
2.06	22.32 <sup>b</sup>

หมายเหตุ \* ค่าเฉลี่ยในสุมภ์ที่มีอักษรต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.5) โดยวิเคราะห์ด้วย Duncan (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อนำไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.3 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของขนาดเมล็ดเจลที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยการตรึงเซลล์ด้วยสายยาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด และมีแตกต่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 และ 2.06 มิลลิเมตร โดยมีปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้สูงสุดโดยเฉลี่ยทั้ง 5 ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต เท่ากับ 25.63 กรัมต่อลิตร ส่วนการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 และ 2.06 มิลลิเมตร มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในระดับที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้สูงสุดโดยเฉลี่ยทั้ง 5 ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต เท่ากับ 23.21 และ 22.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

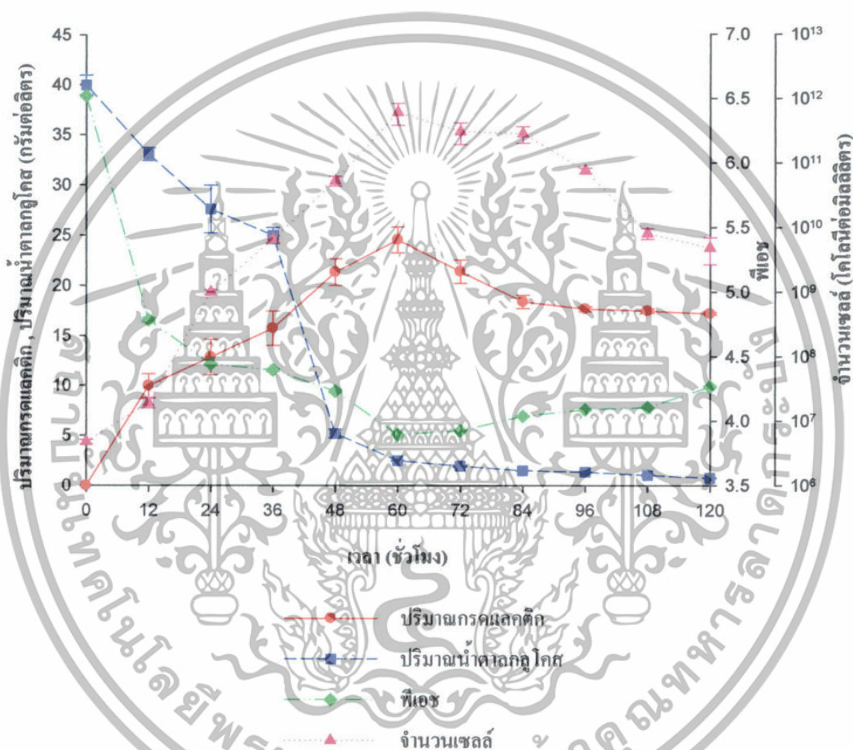
ดังนั้นในการทดลองต่อไป (การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร) จึงเลือกใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0 ในการตรึงเซลล์ เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุด

#### 4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกด้วยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0 ในการตรึงเซลล์ ทำการหมักในอาหารสังเคราะห์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน (Youssef และคณะ, 2000; Vasala และคณะ, 2005) พร้อมทั้งมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 เป็นสารปรับสภาพให้เป็นกลาง เนื่องจากช่วยควบคุมพีเอชให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก (Chauhan และคณะ, 2005) พีเอชเริ่มต้น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง พบว่าได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด 24.54 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 เมื่อสิ้นสุดการหมัก (ที่ 120 ชั่วโมง) พบว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลกลูโคส 39.23 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปร้อยละ 98.07 มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอชต่ำสุด 3.9 ในชั่วโมงที่ 60 และจากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินต ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 5 ของปริมาณอาหารที่ใช้ในการหมักกรดแลคติก พบว่าจำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 60 หลังจากนั้นจำนวนเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเพียงเล็กน้อย จนกระทั่งในชั่วโมงที่ 84 จำนวนเซลล์จึงเริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัดไปจนถึงชั่วโมงที่ 120 ดังแสดงในรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.20 แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลกลูโคส พีเอช และจำนวนเซลล์ จากการศึกษากการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดย *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร

จากรูปที่ 4.20 จะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง มีการเปลี่ยนแปลงไปในทางเดียวกับการผลิตกรดแลคติก โดยมีเซลล์เริ่มต้นจำนวน  $4.8 \times 10^5$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร และเพิ่มจำนวนเป็น  $6.2 \times 10^{11}$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 60 ซึ่งเมื่อเชื้อมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ปริมาณกรดแลคติกก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง และเมื่อเชื้อเริ่มมีจำนวนเซลล์ลดลง (หลังจากชั่วโมงที่ 60) ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ก็มีปริมาณลดลงตามการเจริญเติบโตของเชื้อ อีกทั้งยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการคัดค้าน  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

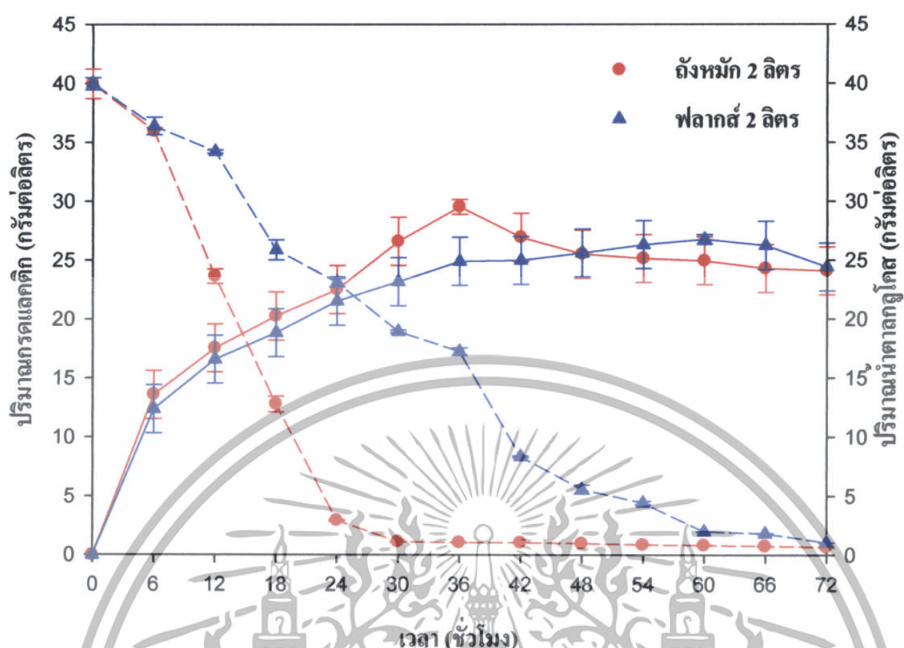
สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงในช่วงที่จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น จนกระทั่งจำนวนเซลล์เริ่มคงที่ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสก็จะคงที่ตามไปด้วย ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการหมัก จะเห็นได้ว่าพีเอชมีการลดลงอย่างรวดเร็ว จากพีเอชเริ่มต้น 6.5 ลดลงเป็น 3.9 ในชั่วโมงที่ 60 หลังจากนั้นพีเอชเริ่มสูงขึ้นจนกระทั่งมีพีเอชสุดท้ายเป็น 4.3 ในชั่วโมงที่ 120 เนื่องมาจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง มีการผลิตกรดแลคติกลดลง และมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง จนกระทั่งเมื่อสิ้นสุดการหมัก (ที่ 120 ชั่วโมง) จะมีน้ำตาลกลูโคสเหลือเพียง 0.77 กรัมต่อลิตร จึงอาจมีการดึงกรดแลคติกไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส จึงทำให้มีพีเอชสูงขึ้น และจากการศึกษาจะได้ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง และการเปลี่ยนแปลงพีเอชทุกๆ 12 ชั่วโมง จากการหมักเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 6.10 (ภาคผนวก ค)

จากผลการทดลองจึงกล่าวได้ว่า การผลิตกรดแลคติกขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของ เชื้อจุลินทรีย์หรือจำนวนเซลล์ การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์จะช่วยส่งเสริมการผลิตกรดแลคติก ซึ่ง แสดงว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และปริมาณกรดแลคติก ดังนั้นในการผลิตกรดแลคติกโดย กระบวนการทางชีวภาพจึงขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

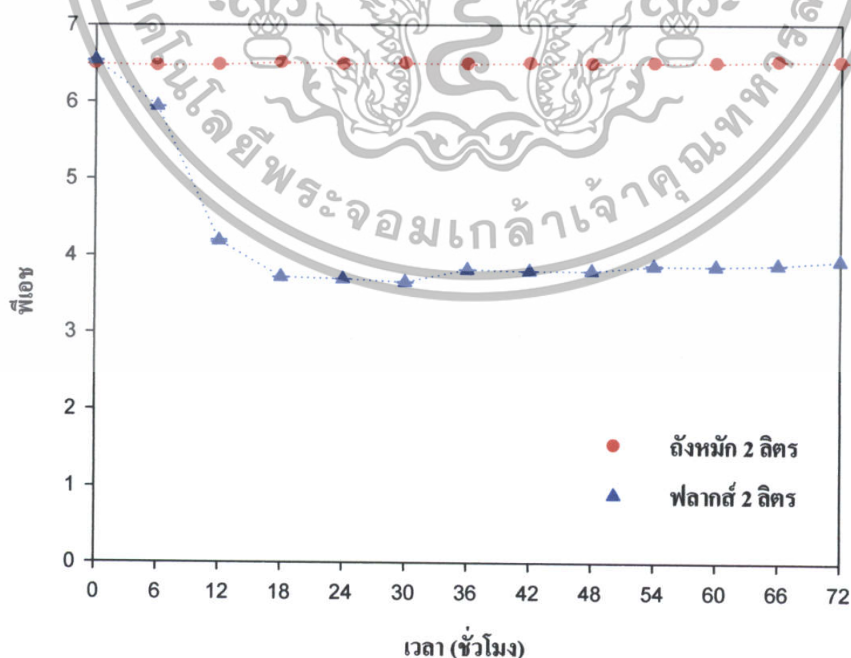
#### 4.3 ผลการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร

จากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต ร้อยละ 2.0 ในการตรึงเซลล์ ทำการหมักเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วย แคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารสังเคราะห์ ปริมาตร 1400 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อ ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่ง ไนโตรเจน (Youssef และคณะ, 2000 ; Vasala และคณะ, 2005) พร้อมทั้งมีการเติมแคลเซียม- คาร์บอเนตร้อยละ 2.0 เป็นสารปรับสภาพให้เป็นกลาง เนื่องจากช่วยควบคุมพีเอชให้เหมาะสมต่อ การผลิตกรดแลคติก (Chauhan และคณะ, 2005) การผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ทำ การหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 ส่วนใน ถังหมักขนาด 2 ลิตร ทำการหมักในสภาวะที่มีการกวนด้วยอัตราเร็วของใบพัด 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมพีเอชให้คงที่เป็น 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการเปลี่ยนแปลง พีเอช ดัง แสดงในรูปที่ 4.21, 4.22 และตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง จากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตร



รูปที่ 4.22 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.4** แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบความแตกต่าง จากการศึกษาศักยภาพ การผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง ในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร

	ระยะเวลา การหมักสูงสุด (ชั่วโมง)	กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคส ที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต สูงสุด (ร้อยละ)	อัตราการผลิต สูงสุด (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)
พลาสติก	60	26.80 <sup>b</sup>	38.93 <sup>a</sup>	66.99 <sup>b</sup>	0.45 <sup>b</sup>
ถังหมัก	36	29.57 <sup>a</sup>	39.29 <sup>a</sup>	71.57 <sup>a</sup>	0.82 <sup>a</sup>
ค่า p-value	-	0.02	0.798	0.02	0.00

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.5$ ) โดยวิเคราะห์ด้วย T-Test (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

จากรูปที่ 4.21 เห็นได้ว่าการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะนิ่ง สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 โดยสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 26.80 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่โดยเฉลี่ย 1.99 กรัมต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 72 จะเหลือน้ำตาลกลูโคสโดยเฉลี่ย 1.07 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการใช้น้ำตาลกลูโคสทั้งหมด 38.93 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร คิดเป็นการใช้น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 97.33

เมื่อพิจารณาการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการกวนด้วยอัตราเร็วของใบพัด 100 รอบต่อนาที จะสามารถผลิตกรดแลคติกได้เร็วกว่าการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะนิ่ง โดยสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งเร็วกว่าการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้สูงถึง 29.57 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าร้อยละ 21.53 เมื่อเทียบกับการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ณ ชั่วโมงเดียวกัน (ที่ชั่วโมง 36 ปริมาณกรดแลคติกในพลาสติกเท่ากับ 24.93 กรัมต่อลิตร) การใช้น้ำตาลกลูโคสของการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร จะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสอย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่โดยเฉลี่ย 2.96 กรัมต่อลิตร จากนั้นในชั่วโมงที่ 36 จะมีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่โดยเฉลี่ย 1.07 กรัมต่อลิตร และเหลือน้ำตาลกลูโคส 0.99 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มลดลงอย่างช้าจนสิ้นสุดการหมักใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงที่ 72 จะเหลือน้ำตาลกลูโคสโดยเฉลี่ย 0.71 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการใช้น้ำตาลกลูโคสทั้งหมด 39.29 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร คิดเป็นการใช้น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 98.22

การเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติของการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะนิ่งเมื่อสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 72 ถึงแม้จะมีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่สูงกว่าการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการกวนด้วยอัตราเร็วของใบพัด 100 รอบต่อนาที อย่างไรก็ตามถือว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสระหว่างการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ปริมาณกรดแลคติกและผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดที่ได้จากการผลิตในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งมีค่า p-value เท่ากับ 0.02 โดยการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร จะได้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดร้อยละ 66.99 และ 71.57 ตามลำดับ ซึ่งผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดในถังหมักขนาด 2 ลิตร จะสูงกว่าการผลิตในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ร้อยละ 6.40

แม้ว่าการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร จะใช้เวลาในการผลิตกรดแลคติกไม่เท่ากัน แต่สามารถเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดแลคติกได้จากค่าอัตราการผลิตกรดแลคติกสูงสุด ซึ่งพบว่าอัตราการผลิตกรดแลคติกสูงสุดในถังหมักขนาด 2 ลิตร จะสูงกว่าการผลิตในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ร้อยละ 45.12 โดยการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร มีอัตราการผลิตกรดแลคติกสูงสุด 0.45 และ 0.82 กรัมต่อลิตรชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (มีค่า p-value เท่ากับ 0.00)

จากรูปที่ 4.17 จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการผลิตกรดแลคติกโดยใช้พลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร จะมีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร จะสามารถควบคุมพีเอชให้คงที่ได้ที่ 6.5 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต แต่การผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร จะไม่สามารถควบคุมพีเอชได้ จึงทำให้พีเอชลดต่ำลง โดยมีพีเอชต่ำสุดเป็น 3.7 จากพีเอชเริ่มต้น 6.5 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกจึงทำให้ได้ปริมาณกรดแลคติกต่ำ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการผลิตกรดแลคติกในถังหมักสามารถควบคุมพีเอชให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกได้ดีกว่าการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร สามารถผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดแลคติกได้ในปริมาณที่สูงกว่าการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร โดยสอดคล้องกับการทดลองของ Idris และ Suzana (2006) ที่ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับประรดโดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วและให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูง

John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุด ในการผลิตกรดแลคติก

นอกจากการควบคุมพีเอชให้คงที่เป็น 6.5 ที่ช่วยส่งเสริมการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ยังมีการกวนด้วยใบพัด ซึ่งการกวนมีผลทำให้เกิดการผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อกับเชื้อที่ใช้ในการหมัก เชื้อจึงสามารถใช้สารอาหารที่อยู่ในถังหมักได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้ได้ปริมาณกรดแลคติกมาก และใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยลง โดยสอดคล้องกับการทดลองของ Gao และคณะ (2006) ที่ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเศษปลา โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* (NBRC 3863) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีการควบคุมอุณหภูมิ พีเอช และการกวนที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จะสูงถึง 87 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นเราจึงกล่าวได้ว่า การผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการกวนด้วยอัตราเร็วของใบพัด 100 รอบต่อนาที มีศักยภาพการผลิตกรดแลคติกดีกว่าการผลิตในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะนิ่ง เนื่องจากการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร สามารถควบคุมพีเอช และมีการกวน จึงทำให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตกรดแลคติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 อิสระ ที่ทำการทดลองในสภาวะเดียวกัน พบว่าการผลิตกรดแลคติกด้วยเซลล์ตรึงจะได้ปริมาณกรดแลคติก 29.57 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งสูงกว่าการผลิตกรดแลคติกด้วยเซลล์อิสระที่ได้ปริมาณกรดแลคติกเพียง 15.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ดังนั้นการใช้เซลล์ตรึงรูปจึงเป็นการปรับปรุงกระบวนการผลิตทางชีวภาพ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น (จิราภรณ์ และณัฐวาทิ, 2549 ; เชิดศักดิ์ และคณะ, 2549 ; มีทนา และคณะ, 2549 ; เสกสรรค์ และอรรถพนธ์, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก จะพบว่าการผลิตกรดแลคติกจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในทั้ง 3 ขนาด และการใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่แตกต่างกันทั้ง 5 ความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่อย่างไรก็ตามควรเลือกใช้สภาวะในการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0 เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด คือ 26.82 กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิเมตร จะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน กล่าวคือเมื่อเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น การผลิตกรดแลคติกก็จะเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังนั้นในการผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการทางชีวภาพจึงขึ้นอยู่กับ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเมื่อศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถึงหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงในถึงหมักขนาด 2 ลิตร มีศักยภาพดีกว่าในพลาสติกขนาด 2 ลิตร โดยปริมาณกรดแลคติก ผลผลิตและอัตราการผลิตสูงสุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร จะมีอัตราการผลิตกรดแลคติกสูงสุด 0.45 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ต่ำกว่าการผลิตกรดแลคติกในถึงหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอัตราการผลิตกรดแลคติกสูงสุด 0.82 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

จกมล จริยกุล. 2550. การผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341.

กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จิราภรณ์ ไพรัชทรกุล และณัฐวาทิ โห้สุวรรณ . 2549. ผลของแร่ธาตุปริมาณน้อยต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863. กรุงเทพฯ : โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชมรมเทคโนโลยีทางอาหารและชีวภาพ. 2550. การสกัดสารปรุงแต่ง กลิ่นรสจากยีสต์. [Online]. Available : [http://www.sc.chula.ac.th/clubs/FoodClub/page\\_116.htm](http://www.sc.chula.ac.th/clubs/FoodClub/page_116.htm) - 7k.

เจดศักดิ์ ฌ วิเชียร, เทิดศักดิ์ บัวสุทธา และสุวัฒน์ บุญจารุเนตร. 2549. ผลของพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863. กรุงเทพฯ : โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นิรนาม. 2550. High Performance Liquid Chromatography (HPLC). [Online]. Available : <http://www.kmitl.ac.th/sisc/HPLC/Model.htm> - 30k.

ประพันธ์ ทรธยานุกรม. 2549. The List of Cheese Manufactures in Thailand. จดหมายอิเล็กทรอนิกส์.

มัทนา ทองเลิศ, ณีฎฐพิชา ศรีอ่อนนวล และอัมทิกา เมืองวงษ์. 2549. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863. กรุงเทพฯ : โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิเชียร ตีลาวัชรมาศ. 2526. การผลิตและการใช้ immobilized enzymes. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวพร ศิวเวช. 2546. วัตถุเจือปนอาหารเล่ม 1. นครปฐม : ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สุรีย์ ทองวณิชนิม. 2543. การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล เพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต. กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เสกสรร มณีคำ และอรรรพณ์ ชันชิตต์. 2549. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863. กรุงเทพฯ : โครงการพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Abdel-Naby, M., Mok, K., Lee C. 1992. Production of organic acid from enzymatic hydrolyzate of starch by immobilized lactic acid bacteria. *UNIDO Proceedings*. 227-243.
- Adinarayana, K., Bapi R. and Ellaiah, P. 2004. Investigation on alkaline protease production with *B. subtilis* PE-11 immobilized calcium alginate gel beads. *Process Biochemistry*. 39 : 1331-1339.
- Altaf. M., Naveena, B.J. and Reddy, G. 2005. Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L(+) lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV 6 in single step fermentation. *Food Technology and Biotechnology*. 43(3) : 235-239.
- Anisha, G.S. and Prema, P. 2008. Cell immobilized technique for the enhanced production of  $\alpha$  galactosidase by *Streptomyces griseoloalbus*. *Bioresource Technology*. 99: 3325-330.
- A.O.A.C. 2000. Official Method of Analysis of A.O.A.C. International, 17<sup>th</sup> ed. A.O.A.C. International. The United States of America.
- Axelsson, L. 1993. Lactic acid bacteria : Classification and physiology In S. Salminen & A.von Wright (Eds), Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects 2<sup>nd</sup> ed. New York : Marcel Dekker.
- Bergmier, D., Champagne, C.P. and Lacroix, C. 2003. Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal Applied Microbiology*. 95 : 1049-1057.
- Bulet, S., Elibol, M. and Ozer, D. 2004. Effect of different carbon sources on l(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*. 21 : 33-37.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chauhan, K., Trivedi, Ujval. and Patel, K.C. 2005. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. *Bioresource Technology*. 98 : 98-103.
- Cote, A., Brown, W.A., Cameron, D. and Walson, G.P.V. 2004. Hydrolysis of lactose in whey permeate for subsequent fermentation to ethanol. *Journal Dairy Science*. 87 : 1608-1620.
- Dailey, O. D., Dowd, M.K. and Mayorga, J.C. 2000. Influences of lactic acid on the solubilization of protein during steeping. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48 : 1352-1357.
- Dembczynski, R. and Jancowski, T. 2002. Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. *Enzyme and Microbial Technology*. 31 : 111-115.
- Ding, S. and Tan, T. 2006. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*. 41 : 1451-1454.
- Dubois, M., Gijes, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substrate. *Analytical Chemistry*. 28 : 350-356.
- Ellaiah, P., Prabhaker, T., Ramakrishna, B., Thaeer Taleb, A. and Adinarayana, K. 2004. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*. 39 : 525-528.
- Fitzpatrick, J. J. and O’Keeffe, U. 2001. Influence of whey proteinhydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Process Biochemistry*., 37 : 183-186.
- Food and Drug Administration. 1998. Code of Federal Regulations, U.S. Government Printing Office, Washington. D.C. Title 21.
- Gao, Hirata, M.T., Toorisaka, M. and Hano, T. 2006. Acid-hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*. 97 : 2414-2420.
- Gardner, W. H. 1972. Acidulants in food processing. Hand book of food additive 2<sup>nd</sup> ed. Vol 1 : 225-270.
- Ghasem, N., Habibollah, Y. and Ku S. 2004. Ethanol fermentation in immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 92 : 251-260.
- Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 26 : 87-107.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Huang, L., P., Jin, B., Lant, P. and Zhou, J. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch waste water to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal*. 23 : 265-276.
- Idris, A. and Suzana, W. 2006. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *L. delbrueckii*. *Process Biochemistry*. 41 : 1117-1123.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2006. Solid state fermentation for L- lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*. 41 : 759-763.
- Jones, M.L., Maryoni, C., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T. and Prakash, S. 2005. Deconjugation of bile acids with immobilized genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pcBH11). *Applied Bionics and Biomechanics*. 2 : 31-38.
- Kadam, S. R., Patil, SS., Bastawde, KB., Khire, J. M. and Gokhale, D.V. 2006. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry*. 41 : 120-126.
- Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E. and Kanellaki, M. 2005. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*. 40 : 411-416.
- Kushal, R., Sanjeev, K. and Chander, H. 2006. In vivo demonstration of enhanced probiotic effect of co- immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. *International Journal of Dairy Technology*. 59 (4) : 265-371.
- Laskin, I.A. 1985. Enzyme and Immobilized Cell in Biotechnology. Canada : The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc.
- Mandel, S., Puniya, A.K., Singh, K. 2005. Effect of alginate concentration on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*. 16 : 1190-1195.
- Meng-Chun Chi, Rui-Cin Lyu, Long-Lin Lin, Hsien-Bin Huang. 2008. Characterization of *Bacillus kaustophilus* leucine aminopeptidase immobilized in Ca-alginate/K-carageenan beads. *Biochemical Engineering Journal*. 39 : 367-382.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Motoyoshi, H., Yoshiyuki, N. and Masayoshi, I. 1986. Novel Method of lactic acid Production by Electrolysis Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 52 (5) : 314-319.
- Muller, V. 2001. Bacterial fermentation. *Encyclopedia of life Science* : 1-7.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F. and Boudrant, J. 2001. The effect of supplementation by different nitrogen source on the production of lactic acid a from date juice by *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus*. *Bioresource Technology*. 78 : 149-153.
- Nancib, A., Nancib, N., Meziane Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M., Boudrant, J. and Sefh, O. 2005. Joint effect of on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus*. *Bioresource Technology*. 96 : 63-67.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A. 2004. L(+)-Lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal Biotechnology*. 7 : 167-179.
- Oh, H., Wee, Y., Yun, J., Han, J. S., Jung, S. H., Ryu, S. and H. W. 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology*. 96 : 1492-1498.
- Ohkouchi, Y. and Inoue, Y. 2006. Direct production of L(+) lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011. *Bioresource Technology*. 97 : 1554-1562.
- Pauli, T. and Fitzpatrick, J. J. 2002. Malt combing nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. *Process Biochemistry*. 38 : 1-6.
- Salminen, S., Wright, A. and Ouwehand, A. 2004. *Lactic acid bacteria*. 3 rd ed. New York : Marcel Dekker.
- Salminen, S. and Von Wright, A. 1993. *Lactic acid bacteria* . New York : Marcel Dekker .
- Senthuran, A., Senthuran, V., Kaul, R.H. and Mattiasson, B. 1999. Lactic acid production by Immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reator : a step towards optimization. *Journal of Biotechnology*. 73 : 61-70.
- Tanaka, T., Hoshina, M., Tanabe, S., Sakai, K., Ohtsubo, S. and Taniguchi, M. 2006. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. 97 : 211-217.
- Wee, Y.J., Kim, J.N., Yun, J.S. and Ryu, H.W. 2004. Utilization of sugar molasses for economical L(+) – lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* . *Enzyme and Microbial Technology* ., 35 : 568 – 573.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Wee, Y.J., Kim, H.O., Yun, J.S. and Ryu, H.W. 2006. Pilot – Scale lactic acid production via batch culturing of *Lactobacillus* sp.RKY2 Using Corn Steep Liquor As a nitrogen source. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2) : 293 – 298.
- Wee, Y.J., Kim, J.N. and Ryu, H.W. 2006. Biotechnological Production of Lactic acid and Its recent Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2) : 163 – 172.
- Vasala, A., Panula, J. and Neubauer, P. 2005. Efficient lactic acid production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* spp. *salicinius* with pretreatment by proteolytic microorganisms. *Journal of Biotechnology*, 117 : 421-431.
- Vasanthi, A., Senthuran, A. and Balasubramaniam, K. 1996. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 19 : 482-486.
- Vishu, C., Navee N.A., Altaf, B.J., Venkateshwar, M. 2006. Amylopullanase Anovel enzyme of *Lactobacillus amylophilus* GV 6 in direct fermentation of starch to L (+) lactic acid. *Enzyme and Microbial Technology*. 38 : 545-550
- Xu, Z., Wang, Q., Wang, P., Cheng, G., Ji, Y. and Jiang, Z. 2006. Production of lactic acid from soybean stalk hydrolysate with *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus casei*. *Process Biochemistry*. p 217-226.
- Yun, J.S., Wee, Y.J., and Ryu, H.W. 2003. Production of optically pure L(+) – lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY 1 . *Enzyme and Microbial Technology* ., 33 : 416 – 423.
- Young, T.K. and John, R.C. 1983. Microbial Production of Lysine and Threonine from whey permeate. *Applied and Environmental Microbiology*., 45(2) : 610-615.
- Youssef, C.B., Guillou, V. and Dichara, A.O. 2000. Modelling and adaptive control strategy in lactic acid fermentation process. *Control Engineering Practice*., 8 : 1297-1307.

**ภาคผนวก ก**  
**อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี**

**1. อาหารเหลว (MRS broth)**

อาหารเหลว MRS ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (Meat extract)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (Peptone)	10	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต ( $CH_3COONa$ )	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมอะซิเตต ( $CH_3COONH_3$ )	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ )	0.05	กรัม

**วิธีการ**

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 6.5 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้ึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
2. ชั่งน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร (สูตรอาหารปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร) ปรับพีเอช 6.5 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้ึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที
3. นำอาหารและสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้มาเทรวมกันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. อาหารแข็ง (MRS agar)

อาหารแข็ง MRS ประกอบด้วย

Meat extract	10	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (Peptone)	10	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต ( $CH_3COONa$ )	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมอะซิเตต ( $CH_3COONH_3$ )	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ )	0.05	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

### วิธีการ

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 6.5 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้ึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
2. ชั่งน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร (สูตรอาหารปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร) ปรับพีเอช 6.5 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้ึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที
3. นำอาหารและสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้มาเทรวมกันขณะที่ยังร้อนอยู่ เพื่อป้องกันการแข็งตัวของวุ้นภายใต้สภาวะปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### วิธีวิเคราะห์

#### 1. การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส วิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dobois, 1956)

##### 1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. คิวเวตแก้ว
3. ปิเปต

##### 1.2 สารเคมี

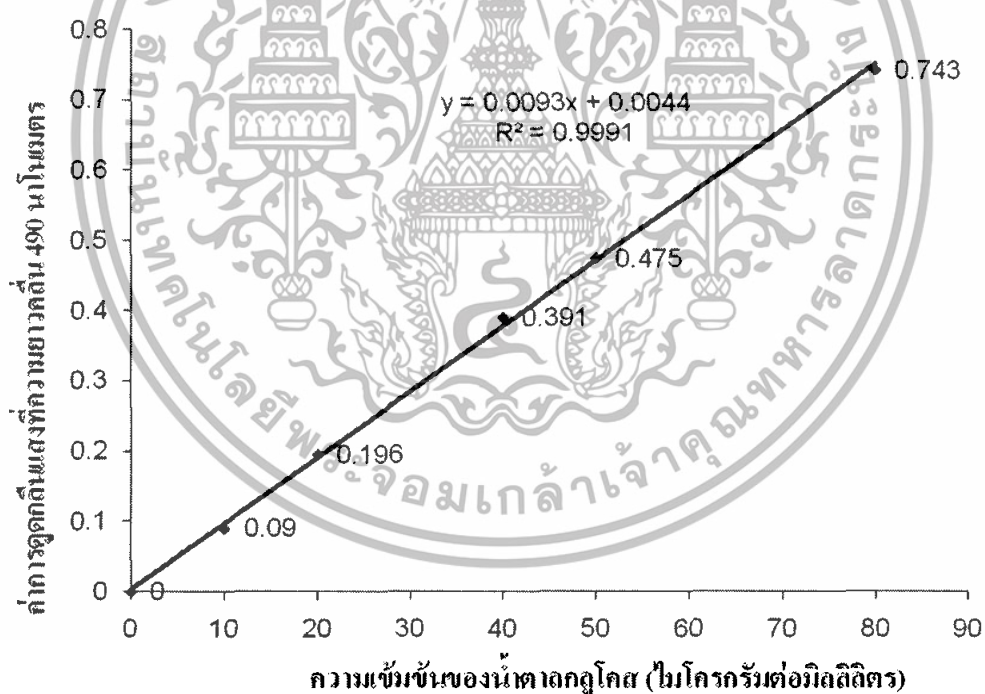
1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5 %, specific gravity 1.84)
2. ฟินอล 5% โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟินอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งน้ำตาลกลูโคสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่	สารละลายน้ำตาลกลูโคส (400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายน้ำตาลกลูโคส มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0	1000	0
2	25	975	10
3	50	950	20
4	100	900	40
5	125	875	50
6	200	800	80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3 วิธีการ

1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆปล่อยลงที่ข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าและนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จากสมการเส้นตรงของกราฟ



รูปที่ 6.1 แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## 2. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสกรองผ่าน เซลลูโลสเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์กึ่งเอกซอสานเป็นเอกซอสานที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Inertsil C8-3 โดยมีโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร นำพื้นที่ได้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

## 2.1 การเตรียมโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

### 2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (Stock solution)

เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.7 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (Deionize water) และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายกรดฟอสฟอริก ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยปีเปตกรดฟอสฟอริกเข้มข้นปริมาตร 3.4 มิลลิลิตร ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2.1.2 นำสารละลายมาตรฐานเข้มข้นโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ปรับพีเอชให้ได้พีเอช 3 ด้วยสารละลายมาตรฐานเข้มข้นกรดฟอสฟอริก

## 2.2 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

1. เปิดเครื่องทุกชนิดของ HPLC
2. ยก Sinker ใส่น้ำในขวดของ Mobile phase
3. เปิด Drain ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ให้สังเกตว่าในสายของ Sinker มีฟองอากาศหรือไม่ ถ้ามีอยู่ให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
5. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้ว ให้รองน Pump หยุดทำงานเอง หรือกด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน
6. ปิด Drain valve ที่ Pump
7. ตั้ง Flow rate , P max และ P min ที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับ Pump P max ( ดูจาก Pressure maximum ของ Column)
8. ตั้งอุณหภูมิที่ต้องการไว้ที่ CTO (ถ้ามี)
9. ตั้ง Parameter ให้กับ Detector
10. สั่งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 ขั้นตอนการเปลี่ยน MOBILE PHASE

1. ปิด Pump HPLC
2. เท Mobile phase ใหม่ลงในบีกเกอร์
3. เปิด Drain ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ยก Sinker ออกจาก Mobile phase แล้วจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มี Mobile phase ใหม่อยู่
5. รอจน Pump ดูด Mobile phase ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20-30 มิลลิลิตร
6. ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของ Sinker ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาดแล้ว นำ Sinker จุ่มลงในขวดของ Mobile phase ใหม่
7. ในระหว่างขั้นตอนที่ 1-6 ถ้า Pump หยุดทำงาน ให้กดปุ่ม Purge อีกครั้ง
8. ให้สังเกตว่าสายของ Sinker มีฟองอากาศหรือไม่ ถ้ามีให้กด Purge เพื่อให้ Pump ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
9. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้ว ให้รอจน Pump หยุดทำงานเอง หรือกด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน
10. ปิด Drain valve ที่ Pump แล้วสั่งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์

หมายเหตุ การเปลี่ยน Mobile phase ต้องคำนึงถึงด้วยว่า Mobile phase เก่าและใหม่เข้ากันได้หรือไม่ ถ้าไม่สามารถเป็นเนื้อเดียวกันได้ต้องใช้สารอื่นเป็นตัวเชื่อมกลางโดย run mobile phase ตัวเชื่อมกลางอย่างน้อย 20 นาที

- ตัวอย่าง 1.) Buffer Solution → น้ำกลั่น HPLC → Polar Original Solvent  
 2.) Non Polar Solvent → Iso-propanol Polar → Original Solvent

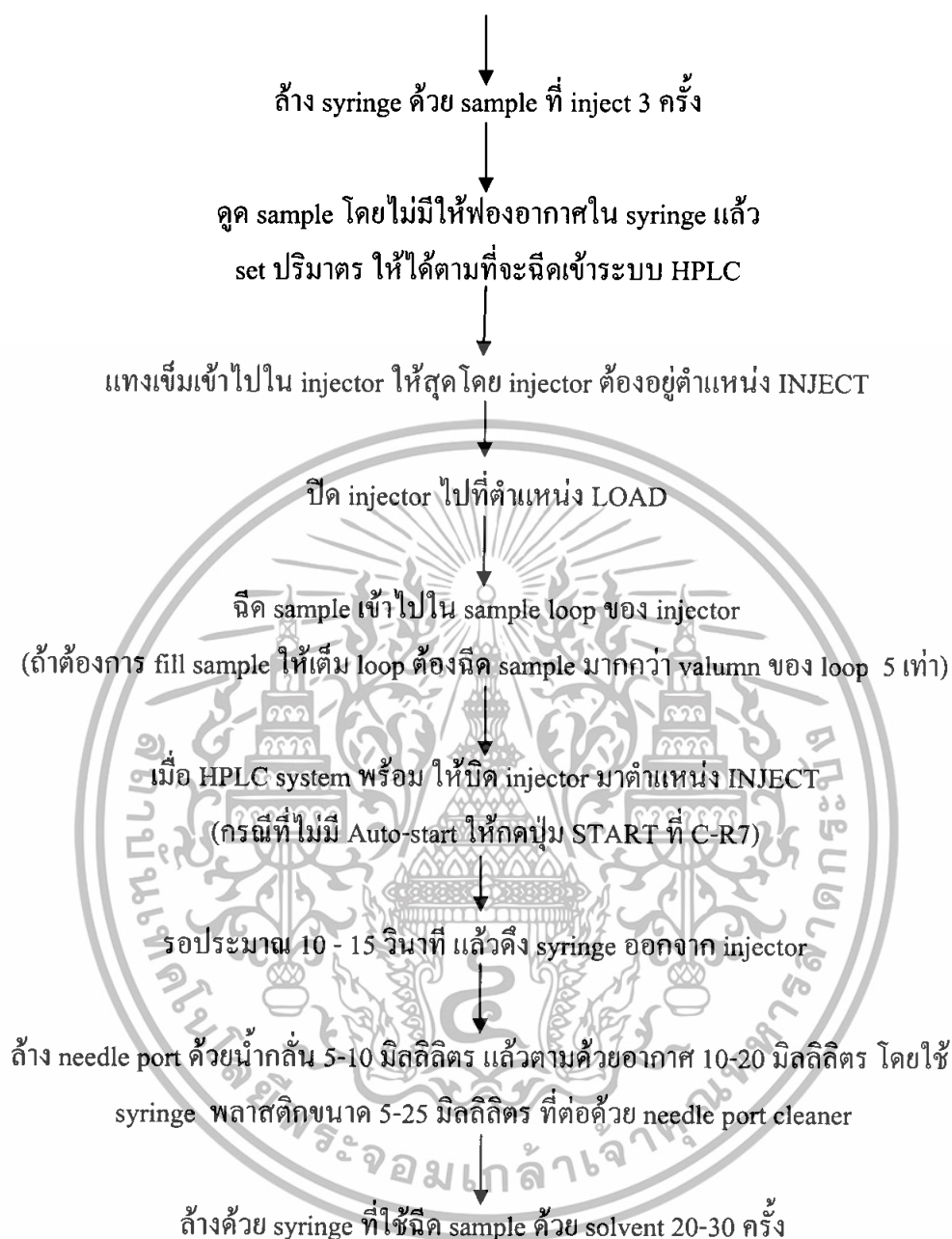
## 2.4 ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง

1. ตรวจสอบให้แน่ใจว่า LC อยู่ในสถานะ Ready
2. ตรวจสอบให้แน่ใจว่า Detector และ Autosampler อยู่ในสถานะ Ready
3. รอจน Baseline ก่อนข้างนี้
4. ถ้าต้องการให้เครื่องคำนวณ Slope ให้เลือกกด S
5. ถ้า Baseline นิ่งอยู่ที่ตำแหน่งสูงกว่าศูนย์เล็กน้อย สามารถตั้งศูนย์อัตโนมัติ โดยกด Z
6. ทำการ Inject Sample

### 6.1 Rhecdyne Manual Injector

ล้าง syringe ให้สะอาดด้วย solvent 5 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## 2.5 ขั้นตอนการปิดเครื่อง

1. หลังจาก inject sample สุดท้ายเสร็จแล้วให้ run mobile phase ต่ออีกประมาณ 30 นาที
2. ตั้ง Off pump
3. ปิด power ของ HPLC units แล้วยก Sinkers ให้พ้น Mobile phase

**หมายเหตุ** กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 2 วัน ต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

## 2.6 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

1. Run Mobile Phase ที่ใช้งาน 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Run Mobile Phase ที่ใช้เก็บ Column 30 นาที
3. ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

#### หมายเหตุ

1. การเปลี่ยน mobile phase ที่ใช้งานมาเป็น mobile phase ที่ใช้เก็บ column ต้องระวังการผสมกันระหว่าง mobile phase ทั้ง 2 ว่า สามารถผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันได้ดีต้องมี mobile phase ชั้นกลางอย่างละ 30 นาที
2. การล้างใช้ flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที หรือน้อยกว่าขึ้นกับชนิดของ column

ตัวอย่าง การล้างเครื่อง โดยมี mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็น buffer solution และ mobile phase ที่เก็บ column เป็น 70% MeOH



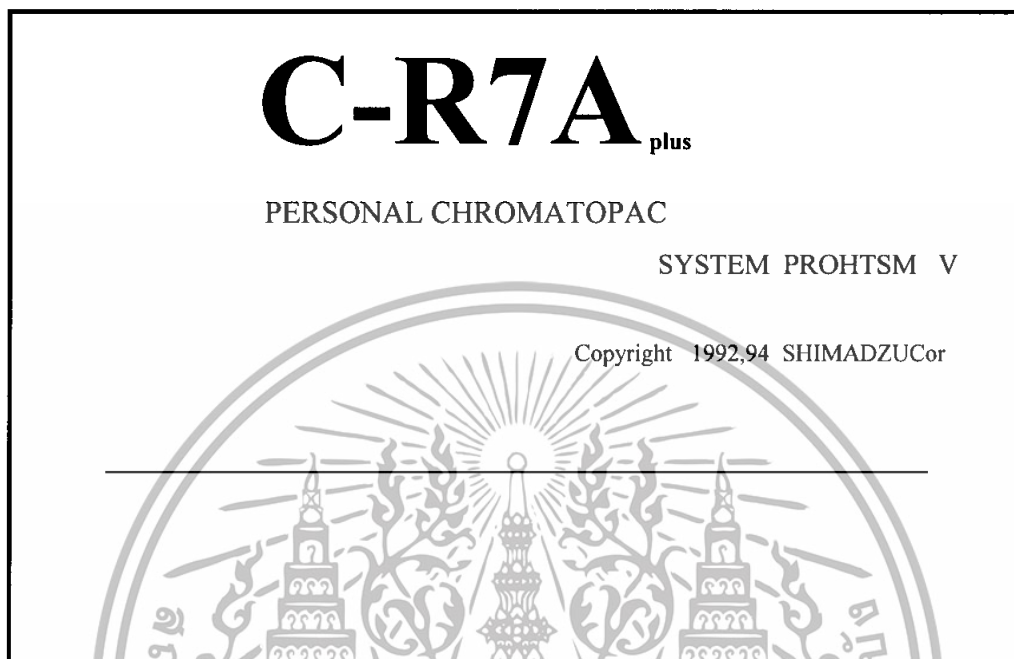
#### 2.7 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)

1. Run Mobile Phase ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run Mobile Phase ที่ใช้เก็บ Column 1 ชั่วโมง
3. หยุด Pump แล้วถอด column ออกจากระบบแล้วต่อ pipe เปล่าแทนที่ และปิด column ด้วย plug ให้แน่น
4. เปลี่ยน mobile phase เป็น 70%MeOH แล้ว run เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง
5. Off pump แล้วปิดเครื่องทุก unit
6. ยก sinker ออกจากขวด mobile phase แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

#### 2.8 ขั้นตอนการใช้งาน

1. กดปุ่มเปิด Power ที่เครื่อง C-R7A ในกรณีที่มี 2 Drive ให้ใส่แผ่น System disk ใน Drive 1 และแผ่นเก็บข้อมูลใน Drive 2 ในกรณีที่มี Board สำหรับเชื่อม HPLC กับ C-R7A ให้ทำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเชื่อมสัญญาณระหว่างเครื่องทั้งสองโดยพิมพ์ OPEN TRS 7 และ ENTER หลังจากปรากฏหน้าจอ ดังภาพ



2. กด WIN 1 จะปรากฏหน้าจอ Menu ของ WIN 1 เลือกหัวข้อ 2 แล้วตามด้วย ENTER

จะปรากฏ

เลือก L เพื่อเรียก Analysis File ในกรณีเคยสร้าง File เก็บไว้

E ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูกโหลดขึ้นมาใช้งาน

R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่าใน Analysis File ที่โหลดขึ้นมาใช้งานอยู่

A ในกรณีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File กับทุก ๆ ครั้งของการฉีด

การสร้าง Analysis File ใหม่

- เลือก E จะปรากฏหน้าจอของ Analysis File

- แก้ไข Parameter ดังต่อไปนี้

WIDTH                    5

DRIFT( $\mu$ V/min)        0

และ T.DBL(min)        1000

- กด EXIT เพื่อออกจากหน้าจอ จะปรากฏคำถาม Save FILE? Y: yes N:no กด Y

จะปรากฏ

Part 1:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

File Name 2:

- กำหนด Drive และชื่อ Analysis File ตามที่ต้องการตรงตำแหน่ง File Name ตามด้วย

ENTER เช่น

Part 1:
File Name 2: ALCOHOL

หลังจากการ save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN 1

3. ตั้งชื่อ File สำหรับ Save ข้อมูลของ Chromatogram เลือกข้อ 3 ตามด้วย ENTER จะ

ปรากฏ

Chromatogram Storage Mode [S:set R:reset C:cancel latest A:auto]
--

เลือก S เมื่อต้องการตั้งชื่อ File สำหรับ Save จะปรากฏ

Directory Part 1:
Chromatogram File [1:@CHRM1.C00] # of run (0 or 1~99) [] (0:serial)

กำหนด Drive และ File ตามด้วย “. C00” และ ENTER จำนวน Chromatogram ที่ต้องการ Save ในชื่อเดียวกันนี้ (สูงสุด 99) และ ENTER เช่น

Directory Part 1:
Chromatogram File [1:test-unk.C00] # of run (0 or 1~99) [] (0:serial)

เลือก R เมื่อต้องการยกเลิกการตั้งชื่อข้างต้น

C ยกเลิกการ Save ของ Chromatogram ชุดท้าย

A เมื่อต้องการให้เครื่อง Save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

4. เลือกข้อ 1 จากหน้าจอ Menu ของ WIN1 จากนั้นรอนจนสังเกตเห็นเส้น Baseline ก่อนข้างนี้ จากนั้นทำการ Zero สัญญาณจาก Detector โดยกดปุ่ม Zero ที่ Detector จนกว่าจะสามารถ Set 0 ที่ Detector ได้

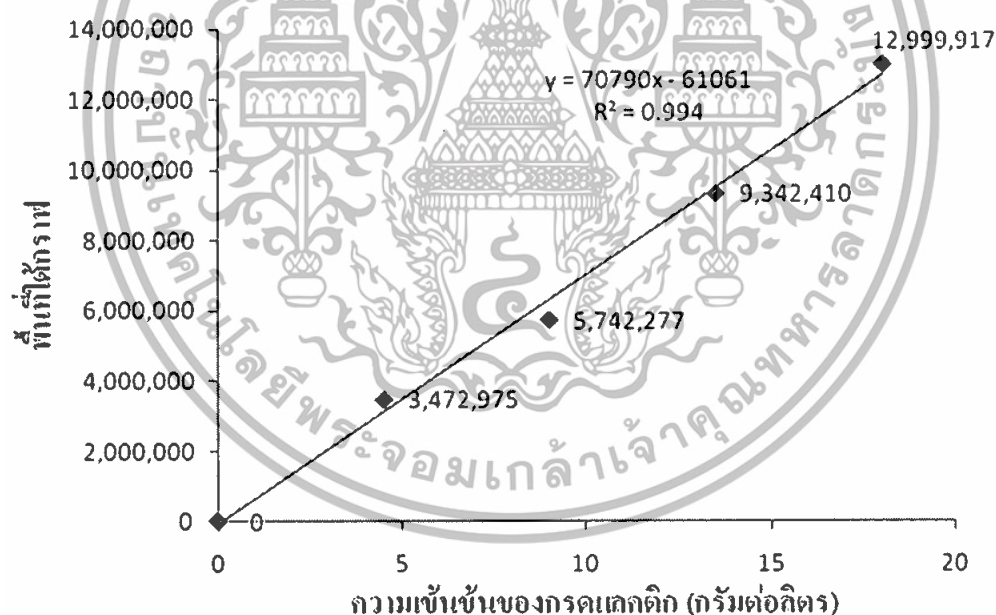
5. ทำการ Test slope ของสัญญาณที่ส่งมาโดยการกด S ที่เครื่อง C-R7A เครื่องจะใช้เวลาทดสอบประมาณ 10 เท่าของค่า Width ที่ตั้งไว้ใน Analysis File หลังจากการทดสอบสิ้นสุดค่า Slope ที่ได้จะถูก Save ใน Analysis File อัตโนมัติ ถ้าต้องการแก้ไขให้กลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis File

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณ และให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START ในกรณีที่เครื่อง C-R7A สามารถเชื่อมต่อและควบคุมการทำงานของ HPLC ได้จะสามารถขอดูค่าต่าง ๆ ของเครื่อง HPLC ผ่านเครื่อง C-R7A ได้จากหน้า Menu ของ WIN1 โดยเลือก 7 :LC Monitor ตามด้วย ENTER

## 2.9 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแลกติก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแลกติกความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดแลกติก โดยคำนวณความเข้มข้นของกรดแลกติกมาตรฐานที่มีหน่วยมิลลิโมลาร์เป็นหน่วยกรัมต่อลิตร ซึ่งกรดแลกติกความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ เมื่อเปลี่ยนหน่วยจะเท่ากับ 4.5, 9, 13.5 และ 18.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงกราฟมาตรฐานของกรดแลกติกดังรูปที่ 6.2

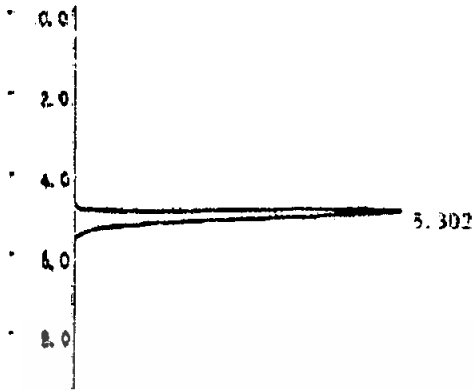


รูปที่ 6.2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแลกติกบริสุทธิ์

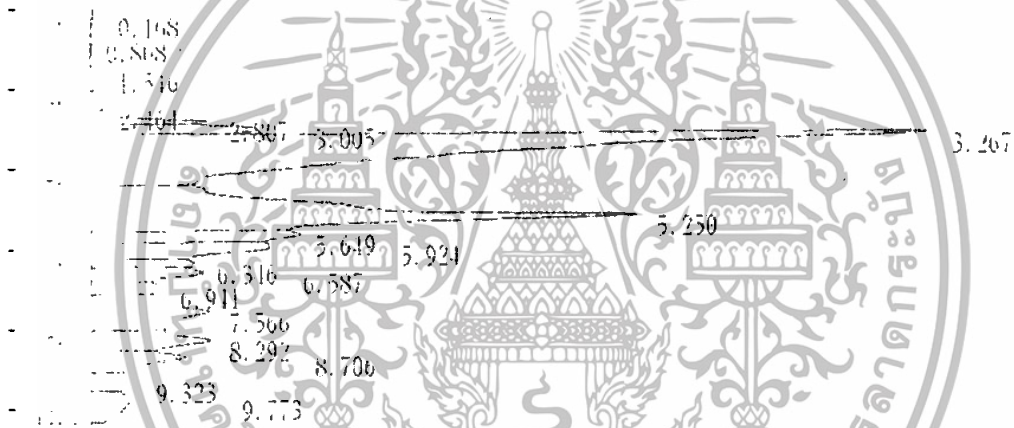
## 2.10 ตัวอย่างโครมาโตแกรม

โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดแลกติก ดังรูปที่ 6.3 แสดงให้เห็น retention time ของกรดแลกติก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.302 นาที

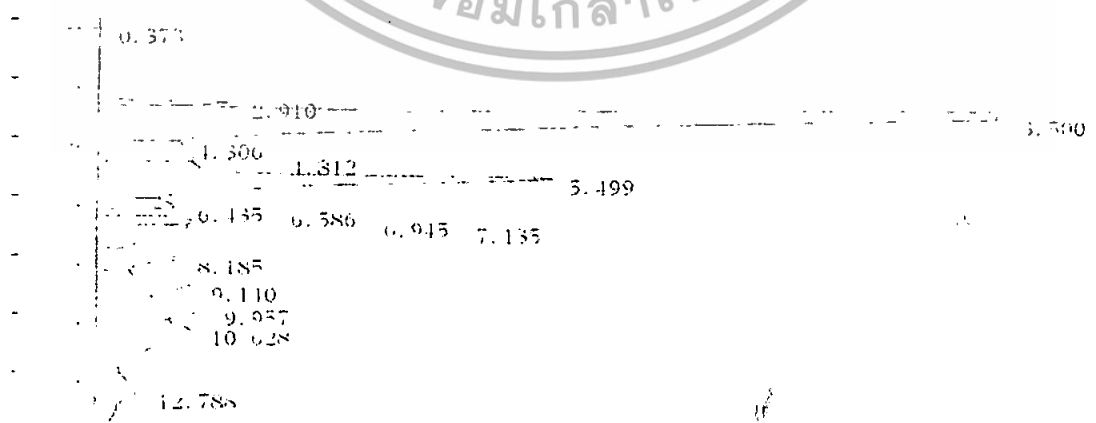
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6.3 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดแลคติก

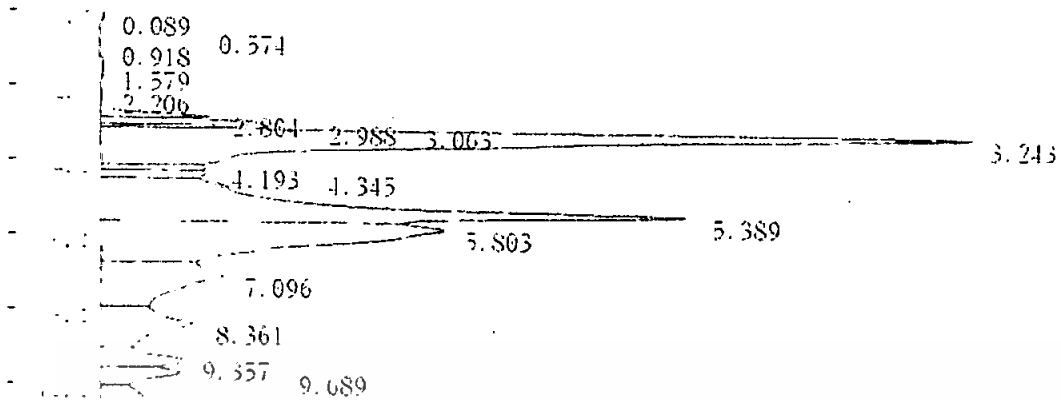


รูปที่ 6.4 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 0.5 ในชั่วโมงที่ 60

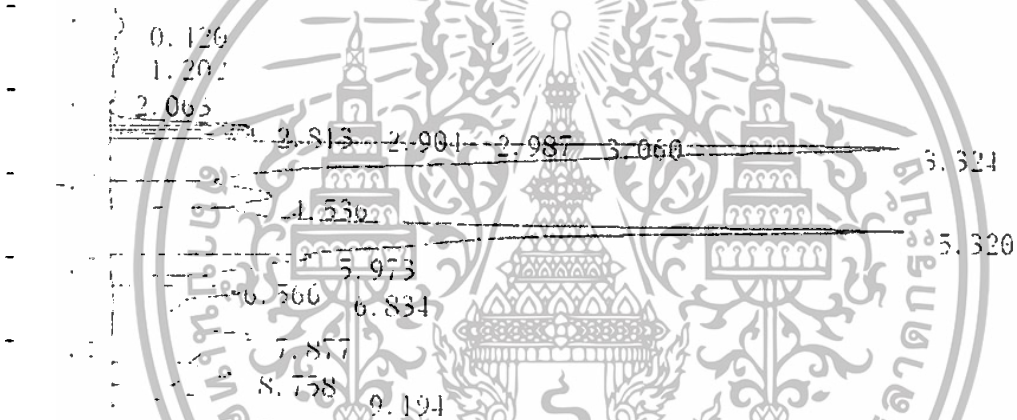


รูปที่ 6.5 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 1.0 ในชั่วโมงที่ 60

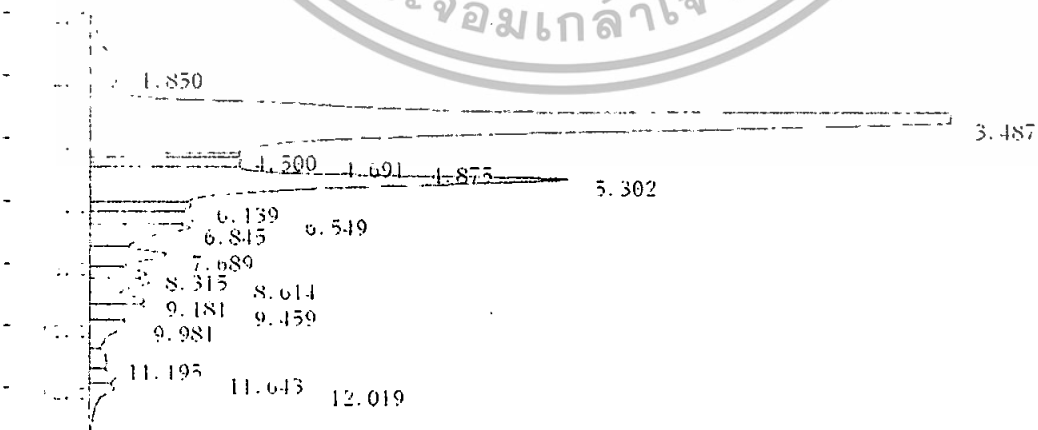
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 6.6** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 1.5 ในชั่วโมงที่ 60

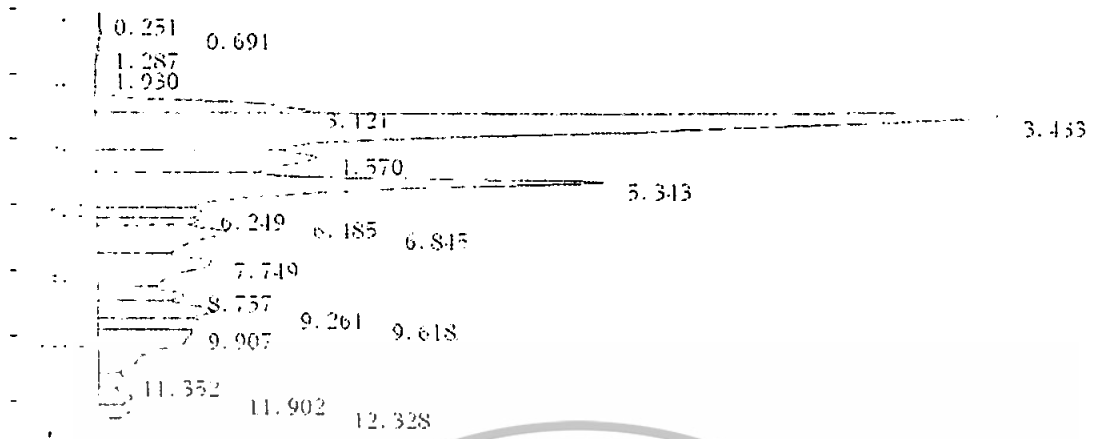


**รูปที่ 6.7** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2.0 ในชั่วโมงที่ 60

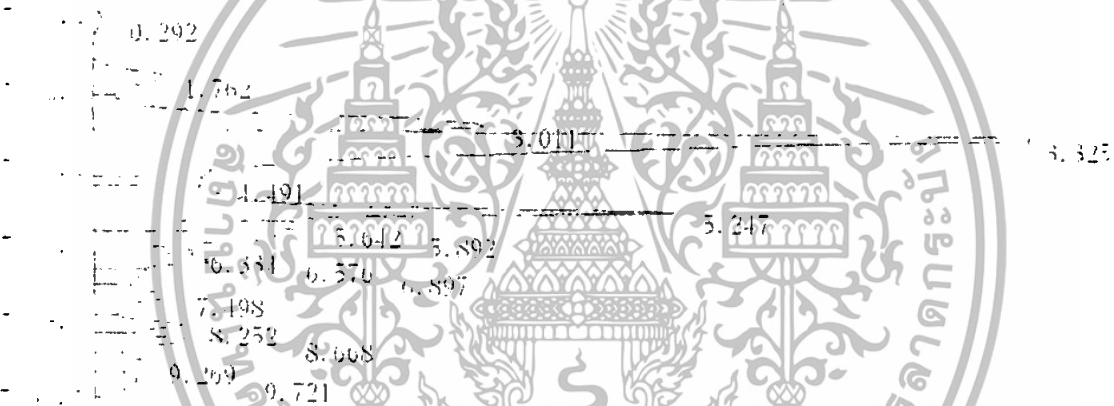


**รูปที่ 6.8** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2.5 ในชั่วโมงที่ 60

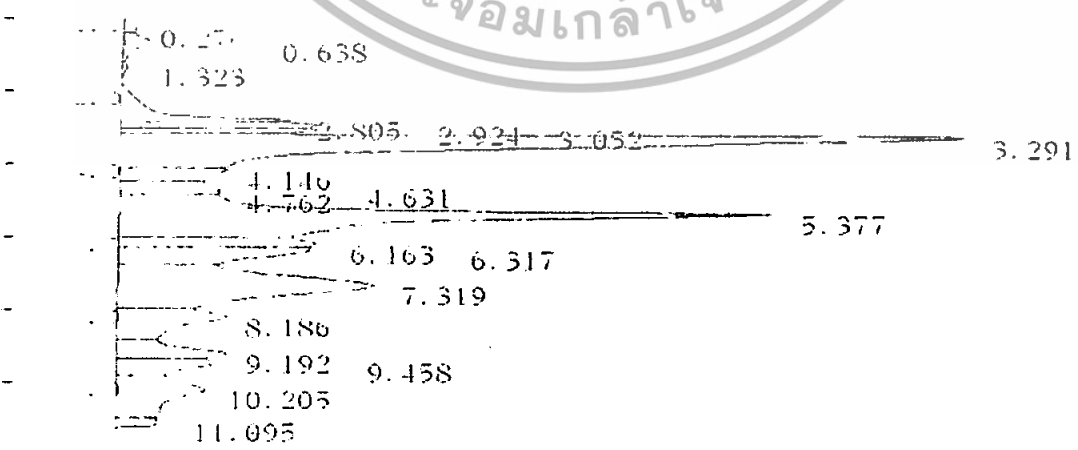
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 6.9** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 0.5 ในชั่วโมงที่ 60

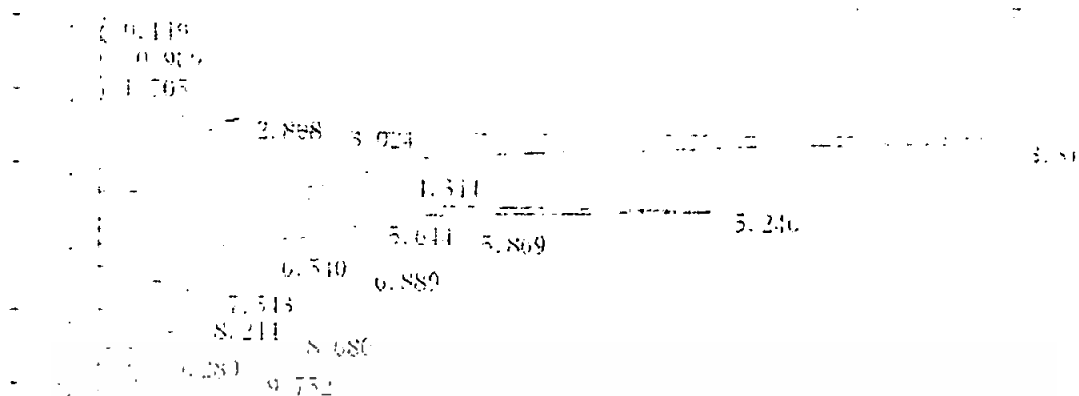


**รูปที่ 6.10** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.0 ในชั่วโมงที่ 60

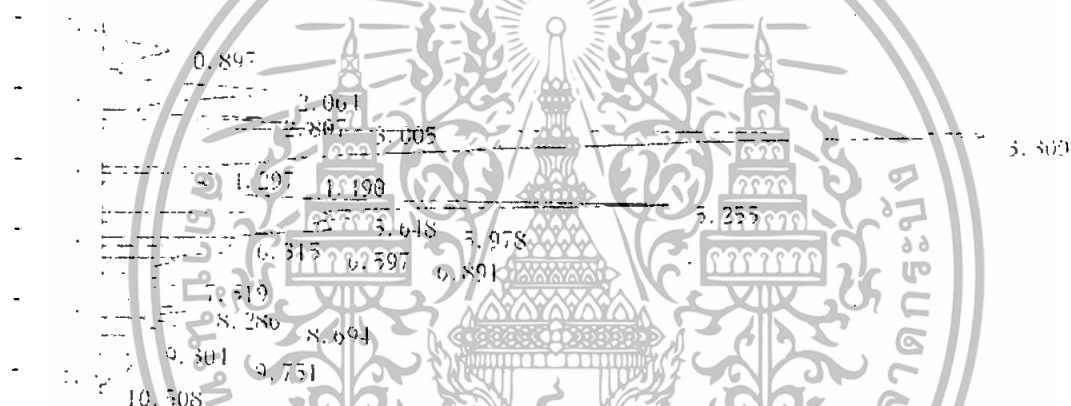


**รูปที่ 6.11** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.5 ในชั่วโมงที่ 60

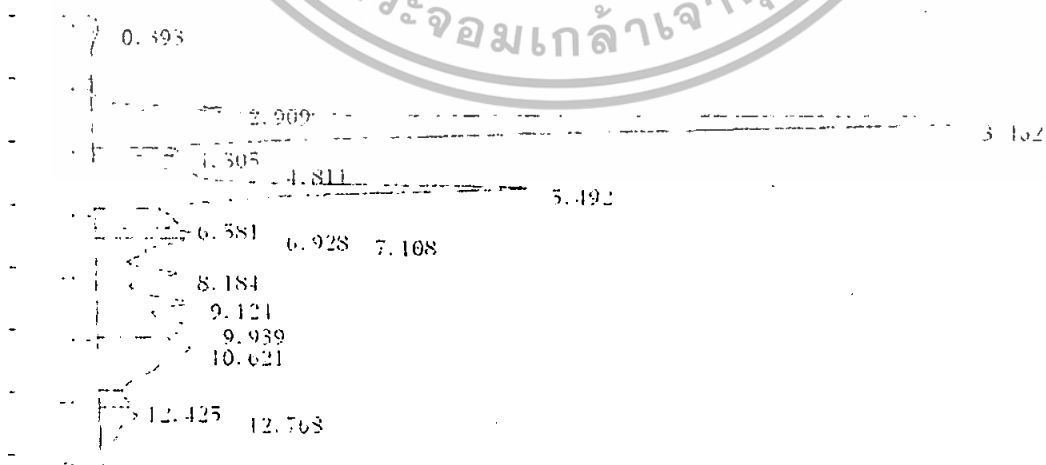
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 6.12** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2.0 ในชั่วโมงที่ 60



**รูปที่ 6.13** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2.5 ในชั่วโมงที่ 60

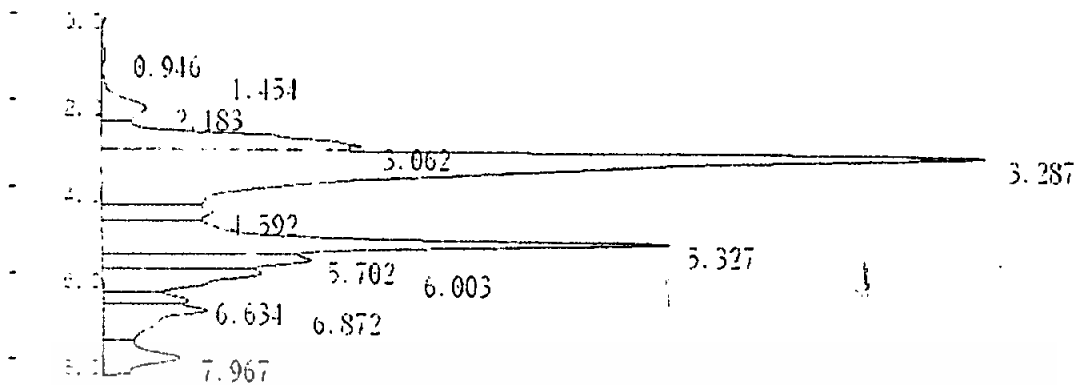


**รูปที่ 6.14** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

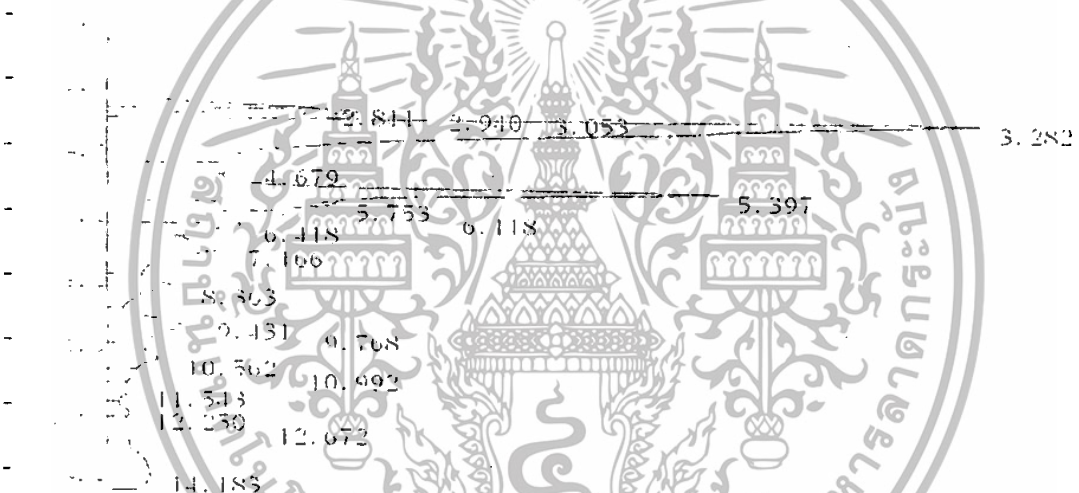
ภายใน 2.06 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 0.5 ในชั่วโมงที่ 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นาเป็เซประเษยนดานการค้

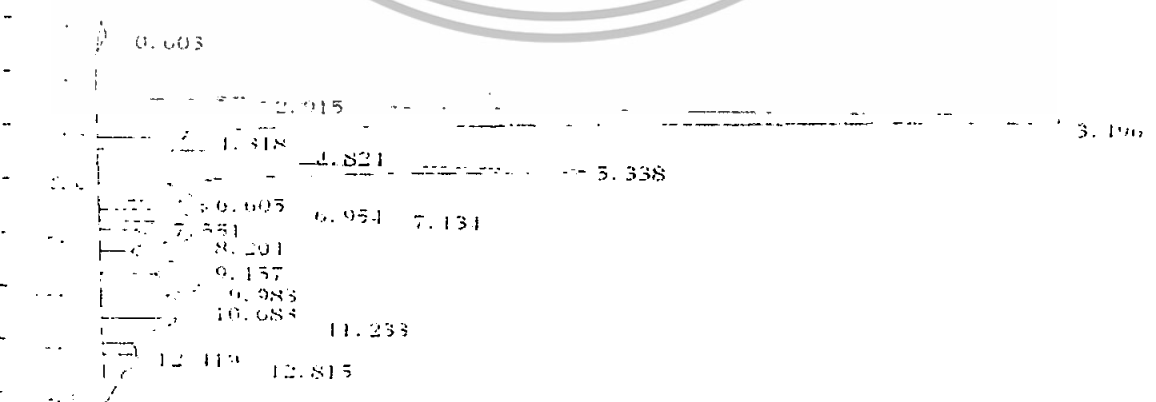
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 6.15** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 1.0 ในชั่วโมงที่ 60



**รูปที่ 6.16** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 1.5 ในชั่วโมงที่ 60

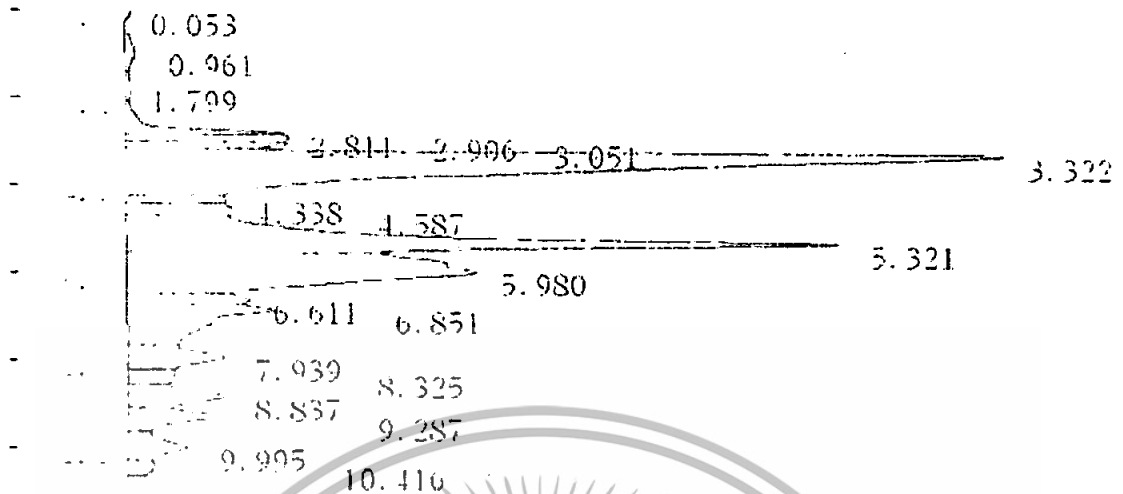


**รูปที่ 6.17** แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

ภายใน 2.06 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2.0 ในชั่วโมงที่ 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือนำไปใช้ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6.18 แสดง โครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 2.5 ในชั่วโมงที่ 60

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์ทั้งหมดโดยวิธี Total plate count (A.O.A.C., 2000)

#### 3.1 วิธีการเตรียมน้ำเกลือร้อยละ 0.85

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

#### 3.2 วิธีการละลายเม็ดเจต (Mandel, 2005)

1. เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.1 โมลาร์ ปรับพีเอช ประมาณ 7.4 โดยคำนวณหาปริมาณจากสลิปแท่งของปริมาณเม็ดเจตที่ชั่งได้ (เป็นปริมาตรต่อ 1 ฟลาสก์)

2. กรองเม็ดเจตด้วยผ้าขาวบางในตู้ปลอดเชื้อ แล้วนำเม็ดเจตใส่ลงไปในฟลาสก์ที่มีสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ซึ่งต้องทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

3. ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจตละลายและตกตะกอน

#### 3.3 วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจาง

2. ปิเปิดตัวอย่างแต่ละความเจือจางที่เหมาะสมใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ งานละ 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำอาหารแข็ง MRS ไปหลอมให้ละลายแล้วทิ้งให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร
4. เขย่าจาน โดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนอุ่นแข็ง
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน
6. นับจำนวน โคลิฟอร์มในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคลิฟอร์มระหว่าง 30-300 โคลิฟอร์มต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคลิฟอร์มรวมทั้ง 3 จาน แล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวน โคลิฟอร์มที่นับได้ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ 6.1 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต				
	ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 1.0	ร้อยละ 1.5	ร้อยละ 2.0	ร้อยละ 2.5
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	10.93	9.12	10.15	12.08	9.24
24	14.67	12.76	14.66	15.97	15.38
36	19.95	18.96	19.96	18.70	21.37
48	21.00	19.48	24.48	25.47	25.15
60	25.81	24.16	25.59	26.82	25.75
72	25.51	23.95	25.27	23.57	24.33
84	25.41	22.72	23.79	22.86	25.30
96	25.35	22.40	22.75	22.71	24.07
108	25.25	21.81	21.82	22.67	23.91
120	25.18	20.19	21.62	22.43	23.59
132	25.01	19.88	21.29	23.27	23.29
144	24.12	19.88	21.15	22.94	23.04
156	24.10	19.79	21.07	22.24	22.76
168	23.64	19.72	20.93	21.17	22.61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6.2 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต				
	ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 1.0	ร้อยละ 1.5	ร้อยละ 2.0	ร้อยละ 2.5
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	9.74	8.39	9.32	10.89	7.72
24	14.04	13.46	13.28	15.66	14.57
36	19.67	18.55	19.86	20.01	20.58
48	19.84	19.89	19.83	20.90	21.55
60	24.91	22.03	22.58	24.00	22.52
72	20.66	19.50	21.20	22.63	21.40
84	19.02	19.13	19.53	22.47	20.64
96	18.47	18.95	19.32	22.17	20.55
108	18.45	17.99	19.18	22.14	18.87
120	18.00	17.73	18.48	22.06	18.82
132	17.20	17.55	17.37	21.16	18.62
144	17.20	17.32	16.93	19.87	18.28
156	17.10	16.79	16.17	16.96	16.97
168	17.05	16.47	16.11	16.90	15.89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6.3 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต				
	ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 1.0	ร้อยละ 1.5	ร้อยละ 2.0	ร้อยละ 2.5
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	9.51	6.95	9.29	8.77	6.87
24	13.50	13.40	12.98	14.78	14.35
36	19.01	18.31	17.06	18.48	19.25
48	19.55	18.36	17.94	20.44	20.92
60	23.60	21.25	21.74	23.62	21.41
72	20.53	19.17	18.79	22.48	21.03
84	18.98	17.39	18.63	22.29	19.88
96	18.41	17.30	18.39	22.14	19.36
108	17.98	17.29	18.29	22.12	18.74
120	17.25	17.11	18.06	21.88	18.47
132	17.18	17.04	17.10	20.52	18.37
144	17.12	16.54	16.72	19.86	17.48
156	16.51	16.51	15.97	16.80	16.62
168	15.96	15.71	14.28	16.63	16.49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6.4 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาตกจากโคสที่ลดลงจากการรีจเซตด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต				
	ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 1.0	ร้อยละ 1.5	ร้อยละ 2.0	ร้อยละ 2.5
0	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
12	30.99	21.90	24.01	28.58	31.36
24	17.42	13.25	17.69	17.92	19.17
36	7.96	8.27	8.46	9.50	8.56
48	2.32	2.77	3.75	3.26	3.41
60	1.13	1.30	1.30	1.31	1.35
72	1.15	1.22	1.27	1.27	1.24
84	1.37	1.21	1.26	1.27	1.21
96	1.32	1.20	1.21	1.26	1.21
108	1.18	1.08	1.20	1.09	1.20
120	1.17	1.04	1.12	1.08	1.12
132	0.98	1.04	1.10	1.06	1.09
144	0.90	0.96	0.97	1.03	1.04
156	0.87	0.88	0.93	0.86	0.92
168	0.86	0.87	0.88	0.77	0.85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6.5 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต				
	ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 1.0	ร้อยละ 1.5	ร้อยละ 2.0	ร้อยละ 2.5
0.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
12	31.84	31.76	30.22	33.17	34.07
24	17.69	20.11	17.73	23.91	20.70
36	11.67	10.16	7.47	12.31	9.41
48	3.86	3.23	2.78	3.69	3.43
60	1.28	1.46	1.93	1.64	1.40
72	1.20	1.40	1.47	1.45	1.30
84	1.15	1.23	1.43	1.32	1.22
96	1.14	1.16	1.24	1.17	1.13
108	1.13	1.13	1.20	1.14	1.10
120	1.07	1.13	1.43	1.11	1.05
132	1.00	0.91	0.96	1.07	1.00
144	0.96	0.85	0.94	1.04	0.93
156	0.93	0.83	0.89	0.93	0.92
168	0.93	0.76	0.83	0.76	0.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6.6 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำศาลกฐโกศที่ลดลงจากการรีจันเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต				
	ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 1.0	ร้อยละ 1.5	ร้อยละ 2.0	ร้อยละ 2.5
0.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
12	30.41	36.15	36.73	33.75	32.39
24	18.06	24.24	29.72	24.89	20.85
36	14.32	10.88	11.63	11.07	8.15
48	4.22	4.23	4.54	5.71	3.71
60	1.26	1.45	1.22	1.83	1.25
72	1.26	1.26	1.22	1.34	1.17
84	1.13	1.20	1.19	1.26	1.16
96	1.13	1.17	1.13	1.24	1.15
108	1.11	1.14	1.06	1.12	1.11
120	1.03	1.00	1.03	1.11	1.03
132	0.95	0.99	1.01	1.06	1.03
144	0.92	0.98	0.99	1.05	1.01
156	0.92	0.98	0.99	0.91	1.00
168	0.91	0.96	0.97	0.90	0.97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6.7 แสดงค่าเฉลี่ยของพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต				
	ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 1.0	ร้อยละ 1.5	ร้อยละ 2.0	ร้อยละ 2.5
0	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
12	5.2	5.1	5.2	5.2	5.2
24	4.5	4.4	4.5	4.7	4.6
36	4.2	4.3	4.2	4.2	4.1
48	4.0	4.2	4.1	4.0	4.0
60	4.2	4.3	4.3	4.2	4.1
72	4.4	4.5	4.4	4.3	4.4
84	4.7	4.6	4.6	4.5	4.6
96	4.8	4.7	4.7	4.6	4.6
108	4.8	4.7	4.7	4.6	4.6
120	5.0	4.9	4.9	4.7	4.8
132	5.0	4.9	4.9	4.7	4.7
144	5.0	5.0	5.0	4.8	4.8
156	5.1	5.1	5.0	4.9	4.9
168	5.3	5.3	5.1	5.0	4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6.8 แสดงค่าเฉลี่ยของพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต				
	ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 1.0	ร้อยละ 1.5	ร้อยละ 2.0	ร้อยละ 2.5
0	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
12	4.5	4.5	4.5	4.4	4.4
24	4.2	4.3	4.4	4.2	4.3
36	4.2	4.2	4.2	4.3	4.2
48	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3
60	4.5	4.4	4.4	4.5	4.4
72	4.6	4.5	4.6	4.6	4.6
84	4.7	4.7	4.8	4.9	4.8
96	4.8	4.9	4.9	4.8	4.9
108	5.0	5.0	5.0	5.1	5.0
120	5.0	5.0	5.0	5.1	5.1
132	5.1	5.1	5.1	5.2	5.3
144	5.2	5.2	5.2	5.2	5.4
156	5.2	5.2	5.2	5.3	5.5
168	5.3	5.3	5.3	5.3	5.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6.9 แสดงค่าเฉลี่ยของพีเอชจากการตรึงเซลล์ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.06 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแตกต่างกัน

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต				
	ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 1.0	ร้อยละ 1.5	ร้อยละ 2.0	ร้อยละ 2.5
0	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
12	4.8	5.0	4.5	4.8	5.0
24	4.2	4.3	4.3	4.3	4.4
36	4.1	4.1	4.0	4.2	4.1
48	4.3	4.1	4.1	4.1	4.1
60	4.5	4.2	4.2	4.2	4.2
72	4.6	4.5	4.4	4.4	4.5
84	4.8	4.6	4.6	4.6	4.6
96	4.9	4.8	4.8	4.8	4.9
108	5.1	5.0	5.0	4.9	5.0
120	5.1	5.2	5.1	5.1	5.1
132	5.2	5.3	5.2	5.1	5.2
144	5.3	5.3	5.3	5.2	5.2
156	5.4	5.5	5.4	5.3	5.4
168	5.5	5.6	5.6	5.4	5.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6.10 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลคติก น้ำตาลกลูโคส พีเอช และจำนวนเซลล์ จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

ชั่วโมงที่	กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	จำนวนเซลล์
0	0.00	40.00	6.5	$4.80 \times 10^6$
12	10.01	33.10	4.8	$1.9 \times 10^7$
24	12.88	27.61	4.5	$1.03 \times 10^9$
36	15.75	25.00	4.4	$6.80 \times 10^9$
48	21.34	5.22	4.2	$5.40 \times 10^{10}$
60	24.54	2.49	3.9	$6.23 \times 10^{11}$
72	21.38	1.96	3.9	$3.10 \times 10^{11}$
84	18.36	1.51	4.0	$2.87 \times 10^{11}$
96	17.64	1.35	4.1	$7.63 \times 10^{10}$
108	17.43	1.04	4.1	$8.17 \times 10^9$
120	17.15	0.77	4.3	$4.87 \times 10^9$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6.11 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลกลูโคส และพีเอช จากการศึกษา  
 ศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร

ชั่วโมงที่	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)		น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)		พีเอช	
	ถังหมัก	พลาสติก	ถังหมัก	พลาสติก	ถังหมัก	พลาสติก
0	0.00	0.00	39.9995	39.9995	6.5	6.6
6	13.62	12.41	35.9852	36.4225	6.5	6.0
12	17.58	16.62	23.677	34.2647	6.5	4.2
18	20.29	18.88	12.8275	25.9135	6.5	3.7
24	22.54	21.56	2.9601	23.125	6.5	3.7
30	26.63	23.20	1.1318	18.9673	6.5	3.7
36	29.57	24.93	1.0723	17.2683	6.5	3.8
42	26.97	25.01	1.0619	8.3615	6.5	3.8
48	25.55	25.63	0.9866	5.5838	6.5	3.8
54	25.17	26.34	0.8755	4.444	6.5	3.9
60	24.97	26.80	0.8354	1.9866	6.5	3.9
66	24.32	26.28	0.7566	1.8404	6.5	3.9
72	24.12	24.46	0.7106	1.0683	6.5	3.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

### ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 6.12 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่ผลิตได้ จากการศึกษาผลของขนาดเมล็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินेटที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

#### Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors			
		Value Label	N
Innerradius (mm)	1	0.89	15
	2	1.52	15
	3	2.06	15
Concentration (%)	1	0.5	9
	2	1.0	9
	3	1.5	9
	4	2.0	9
	5	2.5	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### Descriptive Statistics

Dependent Variable:Lactic

Innerdiameter	Concentration	Mean	Std. Deviation	N
0.89	0.5	25.8095	2.81554	3
	1.0	24.1641	1.25632	3
	1.5	25.5881	2.82523	3
	2.0	26.8216	1.92742	3
	2.5	25.7497	2.82523	3
	Total		25.6266	2.22357
1.52	0.5	24.9083	3.01293	3
	1.0	22.0263	2.90608	3
	1.5	22.5822	.19247	3
	2.0	24.0008	3.79942	3
	2.5	22.5239	.03796	3
	Total		23.2083	2.41011
2.06	0.5	23.6037	4.31825	3
	1.0	21.2478	2.70820	3
	1.5	21.7360	1.60955	3
	2.0	23.6242	2.03486	3
	2.5	21.4084	3.33163	3
	Total		22.3240	2.73387
Total	0.5	24.7738	3.13616	9
	1.0	22.4794	2.45960	9
	1.5	23.3021	2.39295	9
	2.0	24.8155	2.80410	9
	2.5	23.2273	2.92966	9
	Total		23.7196	2.79147

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable:Lactic

F	df1	df2	Sig.
1.551	14	30	.153

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Innerdiameter + Concentration + Innerdiameter \*

Concentration

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Lactic

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	132.874 <sup>a</sup>	14	9.491	1.356	.234
Intercept	25317.943	1	25317.943	3.617E3	.000
Innerdiameter	87.685	2	43.843	6.264	.005
Concentration	38.405	4	9.601	1.372	.267
Innerdiameter *Concentration	6.784	8	.848	.121	.998
Error	209.988	30	7.000		
Total	25660.805	45			
Corrected Total	342.863	44			

a. R Squared = .388 (Adjusted R Squared = .102)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Post Hoc Tests

### Homogeneous Subsets

#### Lactic

##### Duncan

Innerdiameter	N	Subset	
		1	2
2.06	15	22.3240	
1.52	15	23.2083	
0.89	15		25.6266
Sig.		.367	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 7.000.

#### Lactic

##### Duncan

Concentration	N	Subset
		1
1.0	9	22.4794
2.5	9	23.2273
1.5	9	23.3021
0.5	9	24.7738
2.0	9	24.8155
Sig.		.103

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 7.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6.13 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่ผลิตได้จากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร

**T-Test**

**Group Statistics**

group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Lactic Flask	3	26.7967	.70631	.40779
Fermenter	3	29.5687	1.07890	.62290

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Lactic Equal variances assumed	.727	.442	-3.723	4	.020	-2.77199	.74451	-4.83909	-.70489
Equal variances not assumed			-3.723	3.448	.027	-2.77199	.74451	-4.97630	-.56769

ตารางที่ 6.14 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการศึกษาสภาพการผลิตกรดแลคติกในฟลาस्क และถังหมักขนาด 2 ลิตร

**T-Test**

**Group Statistics**

group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Glucose Flask	3	38.9312	.88903	.51328
Fermenter	3	39.2889	2.08347	1.20289

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Glucose	4.280	.107	-2.73	4	.798	-.35767	1.30782	-3.98877	3.27343
Equal variances not assumed			-2.73	2.705	.804	-.35767	1.30782	-4.78875	4.07341

ตารางที่ 6.15 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดที่ได้จากการศึกษาสัณยภาพการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตร

**T-Test**

**Group Statistics**

group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Yeid Flask	3	66.9925	1.76579	1.01948
Fermenter	3	73.9226	2.69729	1.55728

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Yeid	Equal variances assumed	.727	.442	-3.723	4	.020	-6.93007	1.86131	-12.09788	-1.76225
	Equal variances not assumed			-3.723	3.448	.027	-6.93007	1.86131	-12.44090	-1.41924