

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมา (*Cissampelos pareira* L.)

เพื่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108

และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339

ในการผลิตกรดแลคติก

APPLICATION OF CRUDE PECTIN EXTRACTS FROM KRUNG KHA

MAO LEAVES (*Cissampelos pareira* L.) FOR IMMOBILIZATION OF

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus* TISTR 108 AND

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* TISTR 1339

IN LACTIC ACID PRODUCTION



T110440

อรทัย วิลัยวัลย์

ORATHAI WILIWAN

ตงหมู่.....
เลขทะเบียน.....110440
วัน,เดือน,ปี.....2 11 2553

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2553

KMITL-2010-SC-M-020-031

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**APPLICATION OF CRUDE PECTIN EXTRACTS FROM KRUNG KHA
MAO LEAVES (*Cissampelos pareira* L.) FOR IMMOBILIZATION OF
Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus* TISTR 108 AND
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* TISTR 1339
IN LACTIC ACID PRODUCTION**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2010

KMITL-2010-SC-M-020-031

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2010

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) เพื่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 ในการผลิตกรดแลคติก

Application of crude pectin extracts from Krung Khamao leaves (*Cissampelos pareira* L.) for immobilization of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 in lactic acid production

นักศึกษา นางสาวอรัทัย วิไลวัลย์
รหัสประจำตัว 50068307
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.สุโขใจ พงษ์จันทร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมชาย ไกรวิเศษ	
ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไพวงค์	ว.ภ.ท. สงวนไชยไพวงค์
รศ.ดร.พรธณี สุตาภิชาติ	
รศ.สุโขใจ พงษ์จันทร์	

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY (ADKRABANG)
 วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 26 พฤษภาคม พ.ศ. 2553 เวลา 09.30 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาราม 1 คณะวิทยาศาสตร์ ห้อง 424

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว
 (รองศาสตราจารย์ ดร.อนันต์ ฐานะบริพัตร)
 คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สำนักทะเบียนและประมวลผล สจส.
 วันที่ส่งเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์ วันที่ 7/5/53
 วันที่.....เดือน.....ปี.....
 ๑๒

วันที่.....เดือน.....ปี.....
 ๒๖ เดือน.....ปี..... ๕๓

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมา (<i>Cissampelos pareira</i> L.) เพื่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> TISTR 108 และ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> TISTR 1339 ในการผลิตกรดแลคติก
นักศึกษา	นางสาวอรทัย วิไลวัลย์
รหัสประจำตัว	50068307
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมาเพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาस्क โดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต ที่สภาวะหนึ่ง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมาร้อยละ 4 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของสายยาง 1.52 มิลลิเมตร และปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 ได้กรดแลคติกเท่ากับ 25.03 และ 21.88 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 และ 108 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือก *L. casei* TISTR 108 ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นที่ผิวการตอบสนอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ พีเอชเริ่มต้น 6.39 อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 147 รอบต่อนาที ตามลำดับ สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 34.47 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 และเมื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ *L. casei* TISTR 108 ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมา โดยเปรียบเทียบกับเพคตินการค้า (เพคตินจากส้ม, เพคตินจากแอปเปิล, เพคตินเกรดอุตสาหกรรมอาหาร) และโซเดียมแอลจิเนต พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 34.47, 34.30, 34.32, 34.24 และ 33.49 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากนั้นศึกษาสัณฐานภาพของเซลล์ตรึงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชที่ 6.4 พบว่า สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดคือ 28.64 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.795 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลได้ 0.752 กรัมต่อกรัม ณ ชั่วโมงที่ 36 และสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้ 12 รอบการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และใช้ภายใต้เงื่อนไขการสงวนลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Application of crude pectin extracts from Krung Kha Mao leaves (<i>Cissampelos pareira</i> L.) for immobilization of <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> TISTR 108 and <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> TISTR 1339 in lactic acid production
Student	Miss Orathai Wilaiwan
Student ID	50068307
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2010
Thesis Advisor	Associate Professor Sukjai Choojun

ABSTRACT

Lactic acid production from whey utilized as substrate by immobilized cells of *L. casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 with crude pectin extracts from Krung Kha Mao leaves was studied. The optimum conditions for immobilized cells were 4% (w/w) crude pectin extracts from Krung Kha Mao leaves, 1.52 mm inner diameter silicone tube and 5% (v/v) inoculum. The concentrations of lactic acid were 25.03 and 21.88 g/L in steady state for 96 and 108 h, respectively, which were significantly different ($p \leq 0.05$). The optimization of lactic acid production from *L. casei* TISTR 108 and these conditions was carried on using Response Surface Methodology in Central Composite Design for the statistic design of this experiment. The results showed that the initial pH of 6.39, temperature of 37.4°C and shaking at 147 rpm were optimum conditions to produce 34.47 g/L lactic acid for 72 h of incubation. Efficiency of lactic acid production was compared on immobilized cells of *L. casei* TISTR 108 with crude pectin extracts from Krung Kha Mao leaves, commercial grade pectins (citrus pectin, apple pectin, food grade pectin) and sodium alginate as support materials. The concentrations of lactic acid were 34.47, 34.30, 34.32, 34.24 and 33.49 g/L, respectively, which were not significantly different ($p > 0.05$). The conditions for lactic acid production in 2 liters fermenter was controlled at 37.4 °C, 50 rpm of agitation rate and pH 6.4. The result was lactic acid concentration of 28.64 g/L, productivity of 0.795 g/Lh⁻¹ and yield of 0.752 g/g at 36 h. The immobilization of *L. casei* TISTR 108 could be reuse up to 12 batch cycles.

Key Words : lactic acid, whey, pectin, immobilization, Krung Kha Mao

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. สุขใจ ชูจันทร์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าในการให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ไขปัญหาในระหว่างการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งกรุณาตรวจทานและแก้ไข วิทยานิพนธ์ ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ดร. จิตภา ทิน้อย และ รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ รวมทั้งกรุณาตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บริษัท Minor Cheese Limited สำหรับความอนุเคราะห์น้ำเวย์ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นำมาใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาและญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนส่งเสริมการศึกษา และคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาโทและเอกทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา และขอขอบคุณ นายชลิต นพรัตน์ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในวางแผนการทดลองด้วยวิธีพื้นที่ผิวการตอบสนองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง ตลอดจนผู้ที่มีได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ที่ได้มีส่วนช่วยให้ช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่องผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

อรทัย วิไลวัลย์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญรูป.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 ขอบเขตของงานการศึกษา.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 กรดแลกติก	4
2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก	6
2.3 กระบวนการผลิตกรดแลกติก	7
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก	8
2.5 กระบวนการหมักกรดแลกติก	9
2.6 การขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลในแลกติกแอซิดแบคทีเรีย	11
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก	13
2.8 วิทยาการความก้าวหน้าของการผลิตกรดแลกติก	16
2.9 การตรึงเซลล์	17
2.10 แอลจิเนต	23
2.11 เพคติน	24
2.12 การสกัดเพคติน	30
2.13 กรุงเขมา	33
2.14 เวย์.....	36
2.15 Response Surface Methodology (RSM)	39
2.16 Central Composite Design (CCD)	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	43
3.1 อุปกรณ์การวิจัย	43
3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	43
3.1.2 สารเคมี.....	44
3.2 วัตถุดิบ	44
3.2.1 การเก็บวัตถุดิบ.....	44
3.2.2 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ.....	44
3.3 การสกัดเพคตินจากใบกรูงเขมา	45
3.3.1 การเตรียมตัวอย่างใบกรูงเขมา	45
3.3.2 ขั้นตอนการสกัดเพคตินจากใบกรูงเขมา	45
3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย	47
3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย	47
3.4.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง.....	47
3.5 อาหารสำหรับการผลิตกรดแลคติก.....	47
3.6 การตรึงเซลล์.....	48
3.6.1 การตรึงเซลล์ด้วยเพคติน.....	48
3.6.2 การตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมแอลจิเนต	48
3.7 การศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของ เชื้อ <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> TISTR 108 และ <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> TISTR 1339 ในระดับพลาสติก.....	48
3.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบ กรูงเขมาเพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับพลาสติก	49
3.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก	49
3.10 การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาโดย เปรียบเทียบกับเพคตินทางการค้าและโซเดียมแอลจิเนตในระดับพลาสติก.....	51
3.11 การศึกษาสัณยภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร	52
3.11.1 การศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเซลล์ตรึง ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.11.2 การศึกษาศักยภาพของเซลล์ที่ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา โดยการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำเพื่อผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	52
3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	52
3.13 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ	53
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์.....	54
4.1 ผลการศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกระหว่างเซลล์อิสระและ เซลล์ที่ตรึงของเชื้อ <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> TISTR 108 และ <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> TISTR 1339 ในระดับฟลาस्क	54
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจาก ใบกรูงเขมาเพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาस्क	57
4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกในการตรึงเซลล์ของ สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาเพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาस्क	64
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา โดยเปรียบเทียบกับเพคตินทางการค้าและ โซเดียมแอลจีเนตในระดับฟลาस्क	74
4.5 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัด เพคตินหยาบจากใบกรูงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	77
4.5.1 ผลการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเซลล์ ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร	77
4.5.2 การศึกษาศักยภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อผลิตกรดแลคติก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร	79
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	82
บรรณานุกรม.....	84
ภาคผนวก.....	94
ภาคผนวก ก	94
ภาคผนวก ข	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ก	99
ภาคผนวก ง	116
ประวัติผู้เขียน.....	136



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก	5
2.2	แสดงชนิดของกรดแลคติกที่สร้าง โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ	11
2.3	ปริมาณสารเพคติน (ร้อยละ) ในผักและผลไม้	31
2.4	องค์ประกอบ โดยประมาณของสปีทเว็และแอซิคเว็.....	37
2.5	ค่าแอลฟาที่ใช้ในจำนวนการทดลอง	40
3.1	แสดงการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์โดยการวางแผน การทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3	48
3.2	แสดงตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรอิสระทั้ง 5 ระดับตามแผน การทดลองแบบCCD	49
3.3	แสดงสภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก จากแผนการทดลองแบบCCD.....	50
4.1	แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 และ <i>L. delbrueckii</i> TISTR 1339 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วย สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง.....	51
4.2	แสดงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการตรึงเซลล์ในผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108และ <i>L. delbrueckii</i> TISTR 1339 โดยออกแบบ การทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3ในช่วง 96.....	57
4.3	แสดงตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ของการตรึงเซลล์ <i>L. delbrueckii</i> TISTR 1339 เพื่อผลิตกรดแลคติก โดยออกแบบแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3	58
4.4	แสดงตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ของการตรึงเซลล์ <i>L. casei</i> TISTR 108 เพื่อผลิตกรดแลคติก โดยออกแบบแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3	58
4.5	แสดงปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 และ <i>L. delbrueckii</i> TISTR 13 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test	60
4.6	แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวน ของการตรึงเซลล์ <i>L. delbrueckii</i> TISTR 1339 เพื่อผลิตกรดแลคติก โดยออกแบบแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3	61
4.7	แสดงปริมาณกรดแลคติกเมื่อหมักในอาหารเว็ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 โดยใช้สภาวะที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD	65
4.8	แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยแต่ละตัวแปร จากการศึกษาสภาวะ ที่เหมาะสมในการหมักกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.9	แสดงผลการวิเคราะห์การถดถอยของปัจจัยพีเอช อุณหภูมิ และอัตราการเขย่าตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีต่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108.....68
4.10	แสดงผลการวิเคราะห์สมการถดถอยที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 10869
4.11	แสดงการคาดคะเนปริมาณกรดแลคติกสูงสุดเมื่อหมักในอาหารเวย์โดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 ด้วยปัจจัยจำเพาะต่างๆ ซึ่งได้จากพื้นที่ตอบสนอง72
4.12	แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ อัตราการผลิตผลได้ และค่าพีเอช โดยใช้วัสดุตั้งเซลล์ชนิดต่างๆ ในการตั้งเซลล์เชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 10877
4.13	แสดงอัตราการกวนที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก อัตราการผลิต ผลได้ และปริมาณน้ำตาลแลคโตสทั้งหมดที่ถูกใช้ ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 ที่ถูกตั้งด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา ในถังหมักขนาด 2 ลิตร78
4.14	แสดงจำนวนรอบของการหมักกรดแลคติก อัตราการผลิต และผลได้ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 ที่ถูกตั้งด้วยด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ81

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างของ L(+)-lactic acid และ D(-)-lactic4
2.2	กลไกของการเกิดกรดแลคติกจากกรดไพรูวิก.....5
2.3	เชื้อแบคทีเรีย <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> และ <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>9
2.4	แสดงวิธีเมแทบอลิซึมของการใช้น้ำตาลกลูโคสแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (A) และเฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (B)..... 10
2.5	เมแทบอลิซึมของน้ำตาลกาแลคโตสในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย12
2.6	กระบวนการการผลิตกรดแลคติกในอุตสาหกรรม.....17
2.7	กระบวนการทำเอนไซม์ครึ่งรูปตามวิธีเชื่อมตัวพุง วิธีเชื่อมขวาง วิธีห่อหุ้ม18
2.8	โครงสร้างของแอลจินต24
2.9	การแบ่งชั้นของผนังเซลล์พืชและองค์ประกอบที่สำคัญในแต่ละชั้น25
2.10	โครงสร้างเพคตินชนิดต่างๆ26
2.11	โครงสร้างของเพคตินจากแอปเปิ้ล27
2.12	การเกิด Junction zone ของเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลสูง.....29
2.13	การเกิด Junction zone ของเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำ29
2.14	กรูงขเมา33
2.15	แสดงสูตร โครงสร้างของน้ำตาลแลคโตสที่ถูกไฮโดรไลซ์37
2.16	การกระจายของปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken Design (ซ้าย) และ Central composite Design (ขวา).....40
2.17	ตัวอย่างผลการทดลอง contour plot (a) และ surface plot (b).....41
2.18	กราฟพื้นผิวที่มีลักษณะเฉพาะ42
3.1	ขั้นตอนการกรองแยกกากและสารละลายส่วนใสออกจากกันด้วยปั๊มสุญญากาศ45
3.2	ขั้นตอนการนำสารละลายที่ได้จากการกรอง มาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ45
3.3	ขั้นตอนการตกตะกอนเพคตินด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 9546
3.4	ตะกอนเพคตินที่ได้หลังจากตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 9546
3.5	สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงขเมาบดละเอียดขนาด 100 mesh46
4.1	แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR สกัดเพคตินหยาบจากใบกรูงขเมา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะหนึ่ง.....55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.2	แสดงผลการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาที่ความเข้มข้นต่างๆ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยางที่ขนาดต่างๆ63
4.3	แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 และ <i>L. delbrueckii</i> TISTR 1339 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา.....64
4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก (ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) (ข) กราฟเส้น โครงร่าง 2 มิติ (Contour plot).....69
4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราการเขย่าและพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก (ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) (ข) กราฟเส้น โครงร่าง 2 มิติ (Contour plot) 70
4.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราการเขย่าและอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก (ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) (ข) กราฟเส้น โครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)71
4.7	แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ และค่าพีเอชของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาโดยเลี้ยงในสภาวะที่ได้จากการคาดคะเนของการทดลองแบบ CCD72
4.8	แสดงปริมาณกรดแลคติก และปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ โดยเปรียบเทียบวัสดุเซลล์ตรึงชนิดต่างๆที่ใช้ในการตรึงเซลล์เชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108.....75
4.9	แสดงการเปรียบเทียบวัสดุตรึงเซลล์ชนิดต่างๆสำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 ก่อนการหมักและหลังการหมักกรดแลคติกเป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....76
4.10	แสดงลักษณะ โครงสร้างทางกายภาพของเม็ดเจลด้วยกล้อง SEM76
4.11	แสดงอัตราการกวนที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก และปริมาณน้ำตาลแลคโตสทั้งหมดที่ถูกใช้ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 2 ลิตร78
4.12	แสดงจำนวนรอบของการหมักกรดแลคติกของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเคมี เกษษกรรม เครื่องสำอาง และปัจจุบันนี้กรดแลคติกเริ่มเข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมการผลิตพอลิเมอร์ โดยใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการชีวภาพ (biodegradable plastics) ซึ่งใช้กรดแลคติกที่อยู่ในรูปพอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid; PLA) แทนการใช้พลาสติกที่ได้จากปิโตรเลียม ซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Datta และคณะ, 1995) แต่ต้นทุนการผลิตยังสูงจึงพบพลาสติกประเภทที่ย่อยสลายได้ในท้องตลาดข้งน้อย แต่ในอนาคตคาดว่าจะมีการนำกรดแลคติกมาใช้เป็นส่วนประกอบการผลิตพลาสติกมากขึ้น เพื่อช่วยลดภาวะโลกร้อน และเป็นการแก้ปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมแบบยั่งยืน

กรดแลคติกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตกรดแลคติกทางเคมีจะได้กรดแลคติกที่อยู่ในรูปผสม (DL-Lactic) ซึ่งมีความยุ่งยากในการทำให้บริสุทธิ์และมีค่าใช้จ่ายสูง แต่การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพสามารถเลือกผลิตกรดแลคติกให้อยู่ในรูป D(-)Lactic หรือ L(+)-Lactic ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และสามารถลดต้นทุนการผลิตโดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกหรือของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเป็นซับสเตรดในการผลิตกรดแลคติก เช่น เวย์ และกากน้ำตาล เป็นต้น (Kadam และคณะ, 2006)

เวย์เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็งซึ่งการทิ้งเวย์ก่อให้เกิดปัญหาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากมีค่า BOD (Biochemical Oxygen Demand) สูง อยู่ระหว่าง 4000 – 4800 ซึ่งมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรมออกสู่สิ่งแวดล้อมกำหนดให้มีค่า BOD ไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฝ่ายตรวจและบังคับการ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2552) แต่พบว่าเวย์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เนื่องจากเวย์ประกอบด้วย น้ำตาลแลคโตส โปรตีน ไขมัน วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ (Marwaha และ Kennedy, 1988 ; Gonzalez-Siso, 1996) ซึ่งเหมาะสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นเวย์จึงเหมาะเป็นซับสเตรดในการผลิตกรดแลคติกเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเวย์ และยังช่วยลดต้นทุนการผลิตด้วย

การผลิตกรดแลคติกแบบกะเป็นที่นิยมในระบบอุตสาหกรรม แต่มักพบว่าการหมักนั้นได้ผลผลิตต่ำ เนื่องจากผลผลิตกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (product inhibition) หรือ ซับสเตรดที่เป็นสารตั้งต้นยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (substrate inhibition) ดังนั้นจึงได้พัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคการตรึงเซลล์ เพื่อป้องกันตัวเซลล์จากน้ำหมัก ทำให้เชื้อสามารถผลิตกรดแลคติกได้มากขึ้น นอกจากนี้การตรึงเซลล์ยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้ วัสดุค้ำจุณส่วนใหญ่ที่นิยมนำมาใช้ในการตรึงเซลล์ เช่น แอลจิเนต คาราจีแนน และวุ้น (Roy และคณะ, 1987; Roukas และ Kotzekidou, 1991; Gonzalez-Siso, 1996; Goksungur และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตามพบว่ามีปัญหาเรื่องความคงตัวของเม็ดเจลในการหมักในระยะยาว ดังนั้นจึงได้มีการประยุกต์ใช้เพคตินที่อยู่ในรูปเพคเตตเจล (pectate gel) เป็นวัสดุค้ำจุณในการตรึงเซลล์สำหรับการหมักกรดแลคติก พบว่ามีลักษณะดีมากเนื่องจากมีความคงตัวดีที่ค่าพีเอชต่ำ และสามารถยอมรับได้ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Panesar และคณะ, 2007)

กรูงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) เครือหมาน้อย กรูงบาดาล หรือใบก้นปิด เป็นพืชเถาที่อยู่ในวงศ์ *Menispermaceae* ขึ้นทั่วไปแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย เป็นพืชที่น่าสนใจเนื่องจากมีปริมาณเพคตินมาก เมื่อนำใบมาชกกับน้ำแล้วทิ้งไว้ สามารถเกิดเจลหรือวุ้นได้ง่ายในเวลาสั้นๆ ชาวพื้นเมืองของภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารทั้งหวานและคาว อีกทั้งยังมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคและบำรุงร่างกาย ได้แก่ แก้ไข้ แก้ปวดท้อง แก้ร้อนใน แก้จ้ำใน บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย เป็นยาระบาย แก้ท้องร่วง และเป็นยาอายุวัฒนะ เป็นต้น (พะยอม ดันติวัฒน์, 2521; วุฒิ ธรรมเวช, 2540; ชยันต์ พิเชียรสุนทร และคณะ, 2542) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยในการสกัดเพคตินจากใบกรูงเขมา และพบว่าปริมาณเพคตินประมาณร้อยละ 25-40 มีค่า DE (degree of esterification) ประมาณร้อยละ 41.7 และจัดเป็นเพคตินชนิดที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำ (low-methoxyl pectin) (พิเชษฐ เทบำรุง, 2546; จีราภรณ์ สังข์สุข, 2549; Singthonga, 2005) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานวิจัยใดที่ศึกษาการนำเพคตินที่สกัดจากใบกรูงเขมามาใช้เป็นวัสดุค้ำจุณในการตรึงเซลล์ ซึ่งการนำเพคตินที่สกัดจากใบกรูงเขมามาใช้ประโยชน์นั้นเป็นการเพิ่มมูลค่าของใบกรูงเขมา และลดการใช้เพคตินที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยยังคงต้องนำเข้าเพคตินในราคาที่สูง ในปี 2550 พบว่าประเทศไทยมีการนำเข้าเพคตินเป็นมูลค่าสูงถึง 423,810,155 บาท (กรมศุลกากร, 2550) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาใช้เป็นวัสดุค้ำจุณในการตรึงเซลล์เชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 เพื่อผลิตกรดแลคติกจากเวย์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาใช้ในการตรึงเซลล์เชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 สำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต

1.2.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจากสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาโดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคติน โดยเปรียบเทียบกับเพคตินทางการค้าและโซเดียมแอลจินेट

1.2.4 เพื่อศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา เพื่อผลิตกรดแลกติกโดยนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำ (cell recycle) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 การศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ในระดับฟลาสก์

1.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์

1.3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาในระดับฟลาสก์

1.3.4 การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา โดยเปรียบเทียบกับเพคตินทางการค้าและโซเดียมแอลจินेटในระดับฟลาสก์

1.3.5 การศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.3.6 การศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาโดยการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อผลิตกรดแลกติก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาใช้ในการตรึงเซลล์ เชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 สำหรับการผลิตกรดแลกติก

1.4.2 สามารถนำเวย์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็งมาใช้ประโยชน์ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าและลดปัญหาสิ่งแวดล้อม

1.4.3 สามารถนำสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาใช้ในการตรึงเซลล์ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของใบกรูงเขมา และลดการใช้เพคตินนำเข้าจากต่างประเทศ

1.4.4 เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาการผลิตกรดแลกติกไปสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ตารางที่ 2.1 แสดงสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

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)	1.37×10^{-4}
ค่าความร้อนของการเผาไหม้ (ΔH_c)	1361 KJ/mole
ค่าความร้อนจำเพาะ (C_p ที่อุณหภูมิ 20 °C)	190 J/mole/ °C

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

มนุษย์และสัตว์สามารถใช้กรดแลกติกในรูปของ L(+) เท่านั้น เพราะภายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์มีเอนไซม์ L-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส (L-lactate dehydrogenase) (รูปที่ 2.2) ดังนั้นมนุษย์และสัตว์จึงไม่สามารถใช้กรดแลกติกในรูปของ D(-) ได้ หากในร่างกายมีการสะสมกรดแลกติกชนิด D(-) ในปริมาณมาก (เกิน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัมต่อ 1 วัน) จะส่งผลให้มีการสะสมของกรดแลกติกดังกล่าวในเลือดสูงขึ้น ทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า hyperacidity (Akerberg และ Zacchi, 2000)



รูปที่ 2.2 กลไกของการเกิดกรดแลกติกจากกรดไพรูวิก

ที่มา : สาโรจน์ สิริสันตนิยกุล (2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ประโยชน์ของกรดแลคติก

กรดแลคติกถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังนี้ (ดิยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์, 2549)

2.2.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ส่วนใหญ่จะใช้กรดแลคติกเป็นส่วนประกอบของอาหารและเครื่องดื่มโดยใช้ในการแต่งกลิ่น รส และเนื้อสัมผัส (flavour development) รวมทั้งช่วยในการปรับสภาพความเป็นกรด (acidulant) ในอาหารและเครื่องดื่มทำให้พีเอชลดต่ำลงซึ่งช่วยในการป้องกันการเสื่อมเสีย (preservative) ของอาหารและเครื่องดื่ม

2.2.2 ด้านการแพทย์

นำกรดแลคติกมาประยุกต์ใช้ด้านการแพทย์ ดังนี้ ใช้พอลิแลคติกแอซิด (poly lactic acid) ในการทำไหมเย็บแผลที่ละลายได้และเป็นสารตั้งต้นในการทำฝื่ออ่อน ใช้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในอุตสาหกรรมเภสัชวิทยา ใช้เป็นยาแก้อักเสบ (anti-inflammatory drug) โดยใช้ในรูปแบบของเอทิลแลคเตต (ethyl lactate) ใช้เป็นสารห้ามเลือด (anti-inflammatory drug) ในระหว่างการถอนฟัน นอกจากนี้ยังใช้ในรูปแบบของแคลเซียมไตรไฮเดรต (calcium lactate trihydrate) เพื่อเป็นแหล่งแคลเซียม สำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคขาดแคลเซียม

2.2.3 ด้านการเกษตรกรรม

นำกรดแลคติกมาประยุกต์ใช้ด้านการเกษตรกรรม เช่น ใช้แอมโมเนียมแลคเตต (ammonium lactate) เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงสัตว์ ใช้แคลเซียมแลคเตตไตรไฮเดรต เพื่อยืดอายุผลผลิตทางการเกษตร ใช้ไอโซโพรพิลแลคเตต (isopropyl lactate) ในอุตสาหกรรมเภสัชวิทยา นำมาแมลง และยาปราบศัตรูพืช

2.2.4 อุตสาหกรรมพอลิเมอร์

ใช้กรดแลคติกเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตพอลิแลคเตต (polylactate) โดยใช้กรดแลคติกเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไคแลคโทล ซึ่งไคแลคโทลจะถูกพอลิเมอไรซ์เป็นพอลิแลคเตตที่มีคุณสมบัติที่ดีดังนี้คือ แข็งแรงและทนต่อความร้อนได้สูง สามารถขึ้นรูปและยืดหยุ่นได้ตลอดจนมีความโปร่งแสงที่ดี สามารถรองรับการพิมพ์ข้อความ สามารถปิดผนึกได้ด้วยความร้อนเพื่อใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ ทนต่อการพียงอ รวมถึงป้องกันกลิ่นและรสชาติได้ พอลิเมอร์ชนิดนี้ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สามารถใช้แทนพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเพื่อเป็นการช่วยรักษาสภาพแวดล้อมได้

2.2.5 อุตสาหกรรมอื่นๆ

กรดแลคติกสามารถใช้ในอุตสาหกรรมเคมี ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ พรอพิลีนไกลคอล กรดอะคริลิก เอสเทอร์ และผลิตภัณฑ์อนุพันธ์ อุตสาหกรรมการผลิตเซลโลเฟน (cellophane) อุตสาหกรรมการผลิตยาง อุตสาหกรรมการผลิตวงจรีเลคทรอนิกส์ อุตสาหกรรมการผลิตสบู่โดยใช้ในรูปแบบโซเดียมแลคเตต (sodium lactate) อุตสาหกรรมฟอกหนัง ใช้กรดแลคติกช่วยในการล้าง

สารประกอบแอลเซียมออกจากหนังสือ อุตสาหกรรมสิ่งทอ (textile) กรดแลคติกช่วยในการข้อมพิมพ์สีผ้า ช่วยทำให้เกิดความเงางามของผ้าไหม และผ้าไหมสังเคราะห์ (Waite และคณะ, 2001)

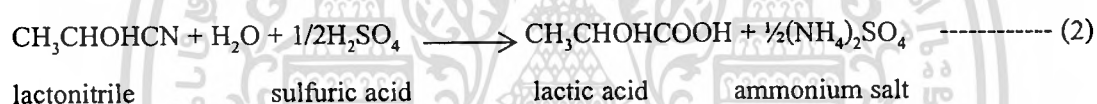
2.3 กระบวนการผลิตกรดแลคติก

2.3.1 การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางเคมี แบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอน

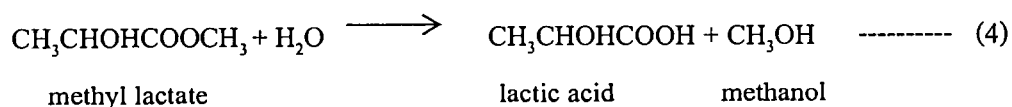
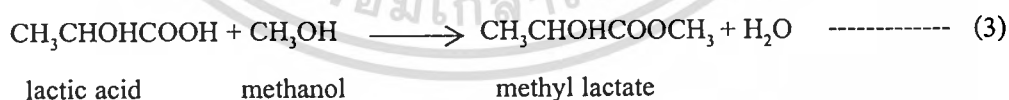
ขั้นตอนที่ 1 นำเอา hydrogen cyanide ทำปฏิกิริยากับ acetaldehyde ได้ lactonitrile ทำปฏิกิริยาที่ความดันบรรยากาศ ดังสมการที่ 1



ขั้นตอนที่ 2 นำ lactonitrile มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือซัลฟูริก จะได้กรดแลคติกและเกลือแอมโมเนียมซึ่งเป็นของเหลือทิ้งดังสมการที่ 2



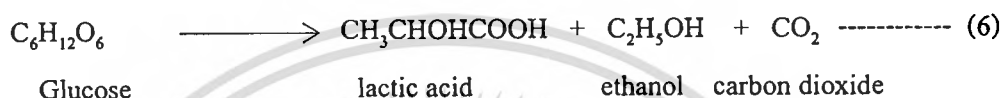
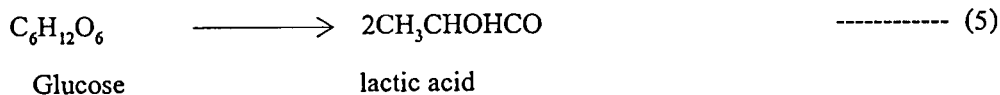
ขั้นตอนที่ 3 นำกรดแลคติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ คือ เมทิล-แลคเตต นำเมทิลแลคเตตมากลั่นและย่อยจะได้กรดแลคติก ส่วนเมทานอล hydrogen cyanide และสารปนเปื้อนอื่นๆ จะถูกกำจัดออกโดยนำมาผ่านถ่านกัมมันต์ และทำการ ionexchange ดังสมการที่ 3 และ 4



ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

2.3.2 การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก มี 2 ชนิด คือ โฮโมแลคติกแบคทีเรีย (homolactic acid bacteria) และเฮเทอโรแลคติกแบคทีเรีย (heterolactic acid bacteria) ซึ่งขั้นตอนในการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงดังสมการที่ 5 และ 6 ตามลำดับ (Muller, 2001)



2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria ; LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) มีรูปร่างกลม (cocci) หรือแท่ง (rod) เคลื่อนที่ไม่ได้ (nonmotile) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่ผลิตเอนไซม์คะตาเลส (catalase) ในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน มีความต้องการอาหารที่ค่อนข้างสลับซับซ้อนและสมบูรณ์ (Prescott และ Dunn, 1959) เชื้อจะเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารและวิตามินหลายชนิด และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส แหล่งที่สามารถพบแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์นม และอาหารหมักดองต่างๆ เป็นต้น (มัทนียา จงนิตยกาล, 2545)

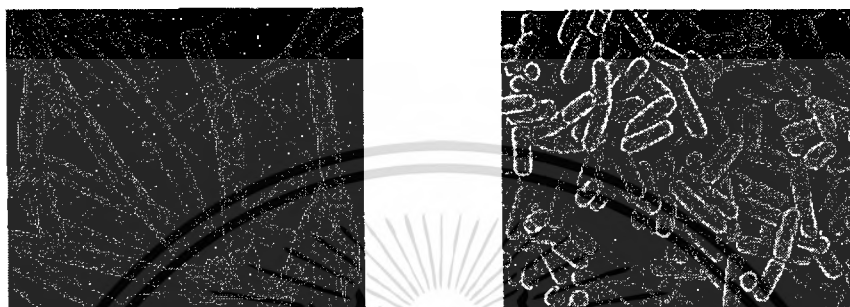
แลคติกแอซิดแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มโฮโมแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (homolactic acid bacteria) แลคติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติกได้มากกว่าร้อยละ 80 โดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis หรือ EMP pathway) จำนวน โมลของกรดแลคติกและพลังงานที่ได้มีค่าเท่ากับ 2 โมล (โมลของกรดแลคติกต่อ โมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้) และ 2 โมล ATP ตามลำดับ

กลุ่มของเฮเทอโรแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (heterolactic acid bacteria) จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติก เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยจำนวน โมลที่เท่ากัน โดยผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) (Axelsson, 1993) จำนวน โมลของกรดแลคติกและพลังงานที่ได้เท่ากับ 1 โมล (โมลของกรดแลคติกต่อ โมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้) และ 1 โมล ATP ตามลำดับ ตัวอย่างของแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้แก่ *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Enterococcus* เป็นต้น (Stiles และ Hozapfel, 1997)

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่สามารถนำออกจำหน่ายโดยไม่ได้รับอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาคือ *L. casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 เป็น facultative anaerobic ติดสีแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้และไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นท่อน (ดังรูปที่ 2.3) แบคทีเรียแลคติกที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม พบในน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากพืชและในบริเวณลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ได้มีการนำไปใช้ในงานวิจัยและอุตสาหกรรมต่างๆอีกมากมาย



L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*

L. casei subsp. *rhamnosus*

รูปที่ 2.3 เชื้อแบคทีเรีย *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *L. casei* subsp. *rhamnosus*

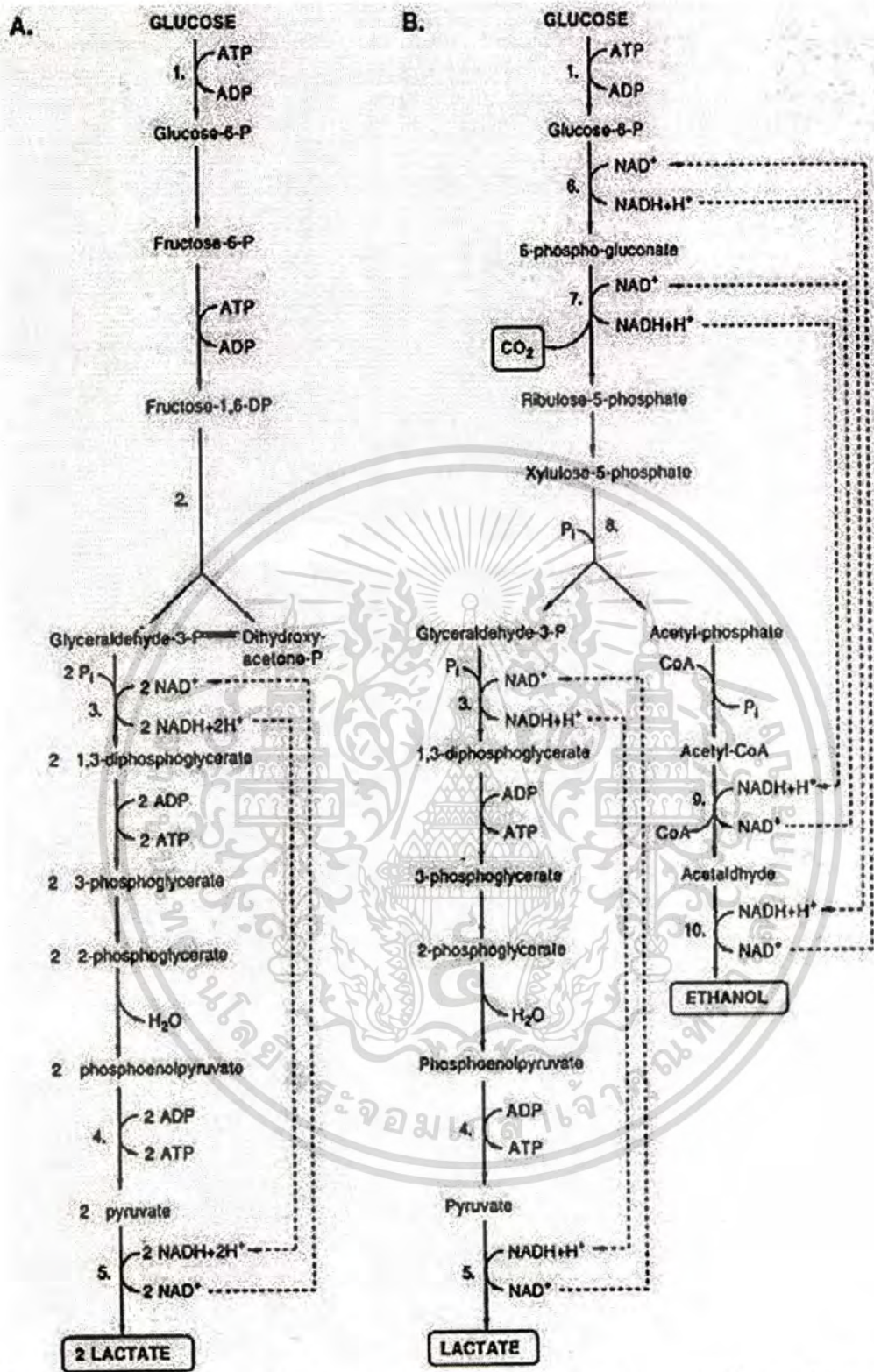
ที่มา : www.oley.org/images/Lactobacillus.jpg.

2.5 การหมักกรดแลคติก

กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมักกลูโคสของแบคทีเรียพวกที่สร้างกรดแลคติก กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสมี 2 แบบคือ

2.4.1 โฮโมแลคติกเฟอเมนเตทีฟ (homolactic fermentative) เป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยกลไกการเกิดกรดแลคติกคือการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ด้วยวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) แล้วเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแลคติกดังรูปที่ 2.4 (A)

2.4.2 เฮเทอโรแลคติกเฟอเมนเตทีฟ (heterolactic fermentative) เป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลคติก เอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือกรดอะซิติก กลไกการเกิดกรดแลคติก ดังรูปที่ 2.4 (B)



รูปที่ 2.4 แสดงวิถีเมแทบอลิซึมของการใช้น้ำตาลกลูโคสแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (A) และ เซโทโรเฟอร์เมนเตทีฟ (B)

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงชนิดของกรดแลคติกที่สร้างโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

ชนิดของกรดแลคติก	แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก
L(+) lactic acid (95%)	Streptococci ทุกสายพันธุ์ที่สร้างกรดแลคติก <i>L. casei</i> <i>L. xyloso</i>
D (-) lactic acid (100%)	<i>L. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>
สร้างได้ทั้ง L (+) และ D (-) lactic acid	<i>L. helveticus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. brevis</i>

ที่มา : Nakazawa และ Hosono (1992)

2.6 การขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (อาทิตย์ ธานี, 2548)

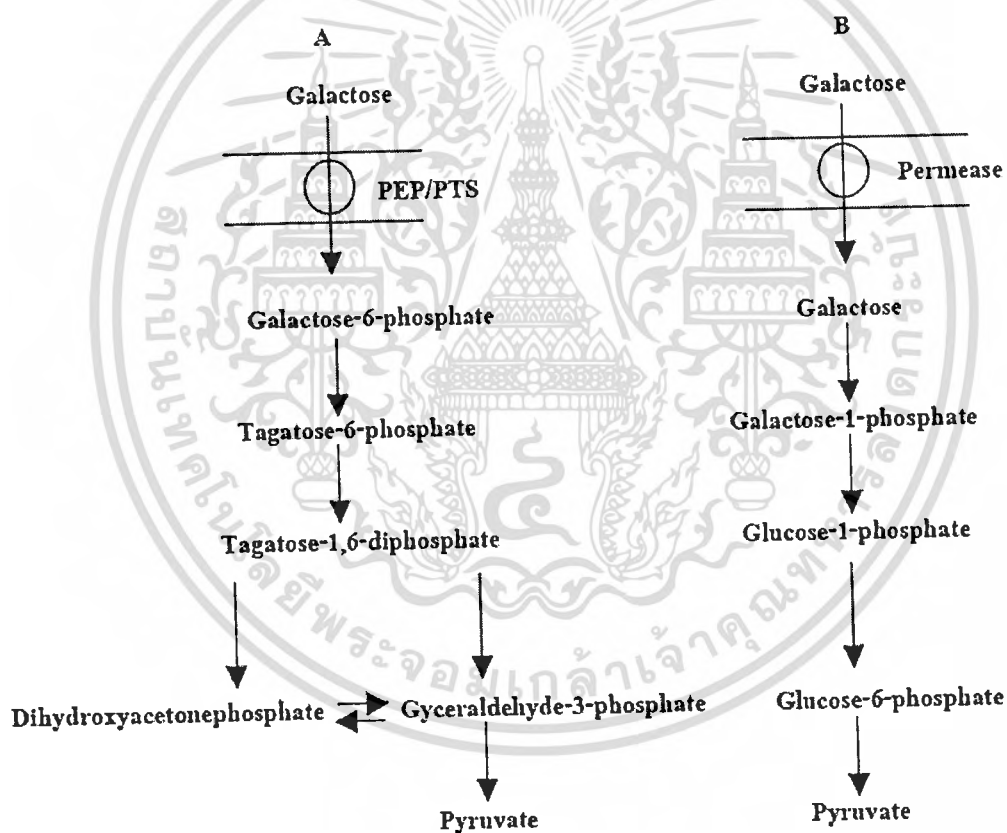
กลไกการขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลทั้งที่อยู่ในรูปของโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) หรือโมเลกุลคู่ (disaccharide) ผ่านเข้าสู่เซลล์ในแลคติกแอซิดแบคทีเรานั้น มีกลไกการขนส่งที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของน้ำตาลและแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เช่น การขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลกาแลคโตสโดยทั่วไปพบว่ามียกลไกที่สำคัญ 2 กลไก ในการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ในแลคติกแอซิดแบคทีเรียคือ

2.6.1 ระบบฟอสโฟอินอลไพรูเวต-ฟอสโฟทรานเฟอร์ส (phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system ; PEP/PTS)

การขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียด้วยวิธีนี้ ส่วนใหญ่จะพบในกลุ่มของ Lactobacilli ซึ่งพบว่าน้ำตาลที่ผ่านเข้าสู่เซลล์จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต โดยกระบวนการฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) จากนั้นจึงถูกเมแทบอลิไทต์ต่อ จากการรายงานของ Lawrence และ Thomas (1979) พบว่าการขนส่งน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) เข้าสู่เซลล์ของ *Lactococcus lactis* จะอาศัยกลไก PEP/PTS ซึ่งน้ำตาลกาแลคโตสที่เข้าสู่เซลล์จะอยู่ในรูปของ galactose-6-phosphate โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ phospho- β -D-galactosidase หรือ P- β -gal จากนั้น galactose-6-phosphate จะถูกเมแทบอลิไทต์ผ่านวิถี tagatose-6-phosphate (รูปที่ 2.5A)

2.6.2 ระบบเพอมีเอส (permease system)

น้ำตาลที่ถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีนี้ จำเป็นต้องอาศัยพลังงานจากเซลล์ในการขนส่ง โมเลกุลของน้ำตาลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนใหญ่จะพบใน *Leuconostocs* และในกลุ่มของแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรียที่เรียกกันว่าชอบความร้อน (thermophiles) เช่น *Streptococcus thermophilus*, *L. delbruckii*, *L. casei* และ *L. acidophilus* (Thompson, 1985) เป็นต้น จากการศึกษาการใช้น้ำตาลกาแลคโตสของ *L. casei* พบว่า น้ำตาลกาแลคโตสจะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยโปรตีนนำพา (carrier protein) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นน้ำตาลกาแลคโตสจะถูกเปลี่ยนเป็น galactose-1-phosphate โดยอาศัยเอนไซม์ β -galactosidase หรือ β -gal จากนั้น galactose-1-phosphate จะถูกเปลี่ยนเป็น glucose-1-phosphate และ glucose-6-phosphate แล้วเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส (Premi และคณะ, 1972) (รูปที่ 2.5 B)



รูปที่ 2.5 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลกาแลคโตสในแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรียที่เรียก A: phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system (PEP/PTS); B: permease system

ที่มา: Axelsson (1993)

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

2.7.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์ (สมใจ ศิริโชค, 2544) ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด คือ น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอล์ และคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ถ้าเป็นการเตรียมกล้าเชื้อจะใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งจะไม่มีผลต่อความสามารถในการหมัก ส่วนใหญ่มักใช้กลูโคสบริสุทธิ์เพื่อทำให้ได้กรดแลกติกบริสุทธิ์ ซึ่งง่ายต่อการแยกและทำให้บริสุทธิ์ แต่ไม่เหมาะกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากกลูโคสบริสุทธิ์มีราคาแพง (Hofvendahl และ Hagerdal, 1997) จึงได้มีการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมมาใช้ประโยชน์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น เวย์ (whey) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการผลิตเนยแข็ง กากน้ำตาล (molass) ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำตาล

Idris และ Suzana (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากสับปะรดเหลือทิ้งโดยตรง เซลล์ *L. delbrueckii* ด้วยโซเดียมแอลจิเนต พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์คือ การใช้แอลจิเนตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 เม็ดเจลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1 มิลลิเมตร พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยการตรึงเซลล์ *L. casei* โดยใช้เวย์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 94.37) ให้เป็นกรดแลกติก (32.95 กรัมต่อลิตร)

John และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากมันสำปะหลังโดยเชื้อผสมระหว่าง *L. casei* และ *L. delbruecki* สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต เมื่อใช้มันสำปะหลังร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ผสม 12.5 มิลลิตรต่อลิตร จากนั้นเติมแหล่งไนโตรเจนด้วย ยีสต์สกัด 7.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 3 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 81 กรัมต่อลิตร

Petrov และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้ง โดยเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากข้าวไรย์หรือข้าวฟ่างที่หมักตามธรรมชาติ สภาวะที่เหมาะสมในการหมักกรดแลกติก คืออุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส มีการกวนที่ 200 รอบต่อนาที พีเอช 6.0 พบว่าสามารถกรดแลกติกได้ 5.5 กรัมต่อลิตร จากแป้ง 18 กรัมต่อลิตร

Ge และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus niger* และ *Lactobacillus* sp. จากลำต้นใต้ดินของต้นแก่นตะวันหรือเขรุธาเล็มอาร์ดิไซค์ (jerusalem

artichoke tubers) โดยการหมักแบบ fed-batch พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 120.5 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลทั้งหมดเป็นกรดแลกติกร้อยละ 94.5

2.7.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอินทรีย์ แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ (สมใจ ศิริโชค, 2544) สำหรับแหล่งไนโตรเจน มีการศึกษาเกี่ยวกับแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเติมยีสต์สกัด มีผลต่อการเติบโตและสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดี (Hofvendahl และ Hagerdal, 1997 ; Pauli และ Fitzpatrick, 2002 ; Kadam และคณะ, 2006)

Yu และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *L. casei* CGMCC โดยใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีการเติมแหล่งคาร์บอน และแร่ธาตุต่างๆ พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 115.12 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้อาหารในการผลิตกรดแลกติก ดังนี้ กลูโคส 118.20 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาล 37.27 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำแช่ข้าวโพด 42.54 มิลลิลิตรต่อลิตร tween 80 1.52 มิลลิลิตรต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.30 กรัมต่อลิตร

2.7.3 แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุมีความสำคัญในการเจริญของเชื้อ ชนิดของแร่ธาตุเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียมและคลอไรด์ นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีก เช่น โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีสและซิงค์ แต่โดยทั่วไปมักจะพบแร่ธาตุเจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (สมใจ ศิริโชค, 2544)

2.7.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดแลกติก เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแตกต่างกันไป และอุณหภูมิมิมีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลกติกในแลกติกแอซิดแบคทีเรีย แต่โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 37-45 องศาเซลเซียส

John และคณะ (2006) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *L. delbrueckii* NCIM 2025 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียสสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด

Idris และ Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับประรด โดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีที่สุด

Panesar และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากเวย์ โดยใช้เซลล์ตรึงของ *L. casei* พบว่าที่อุณหภูมิช่วง 37-40 องศาเซลเซียสเหมาะสมในหมักกรดแลคติก โดยสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสสูงสุดถึงร้อยละ 94.37 และสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 32.91 กรัมต่อลิตร

2.7.5 พีเอช

แลคติกแอซิดแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 4.5-6.5) ในการผลิตกรดแลคติกจำเป็นต้องควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม จึงจะได้ผลผลิตปริมาณสูง การควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อให้ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่ละลายน้ำ ถ้าพีเอช ลดลง คาร์บอเนตจะสลายตัวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชคงที่ประมาณ 7 หรืออาจควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการให้กรดหรือด่าง เช่น กรดซัลฟิวริกและ โซเดียมไฮดรอกไซด์เติมลงไป (สมใจศิริ โภค, 2544)

Liu (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจาก *L. bulgaricus* พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกเป็นหลักจากการใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่เป็นกรด ในขณะที่เดียวกันเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เป็นด่าง พบว่า *L. bulgaricus* มีการสร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า พีเอชมีอิทธิพลต่อเมแทบอลิซึมของไพรูเวตและการผลิตกรดแลคติกของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

Idris และ Suzuna (2006) ศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรดโดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด

John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันสำหรั่งโดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าพีเอช 6.5 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด

Panesar และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากเวย์ โดยใช้เซลล์ตรึงของ *L. casei* พบว่า พีเอช 6.5 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด (32.93 กรัมต่อลิตร)

2.7.6 ออกซิเจน

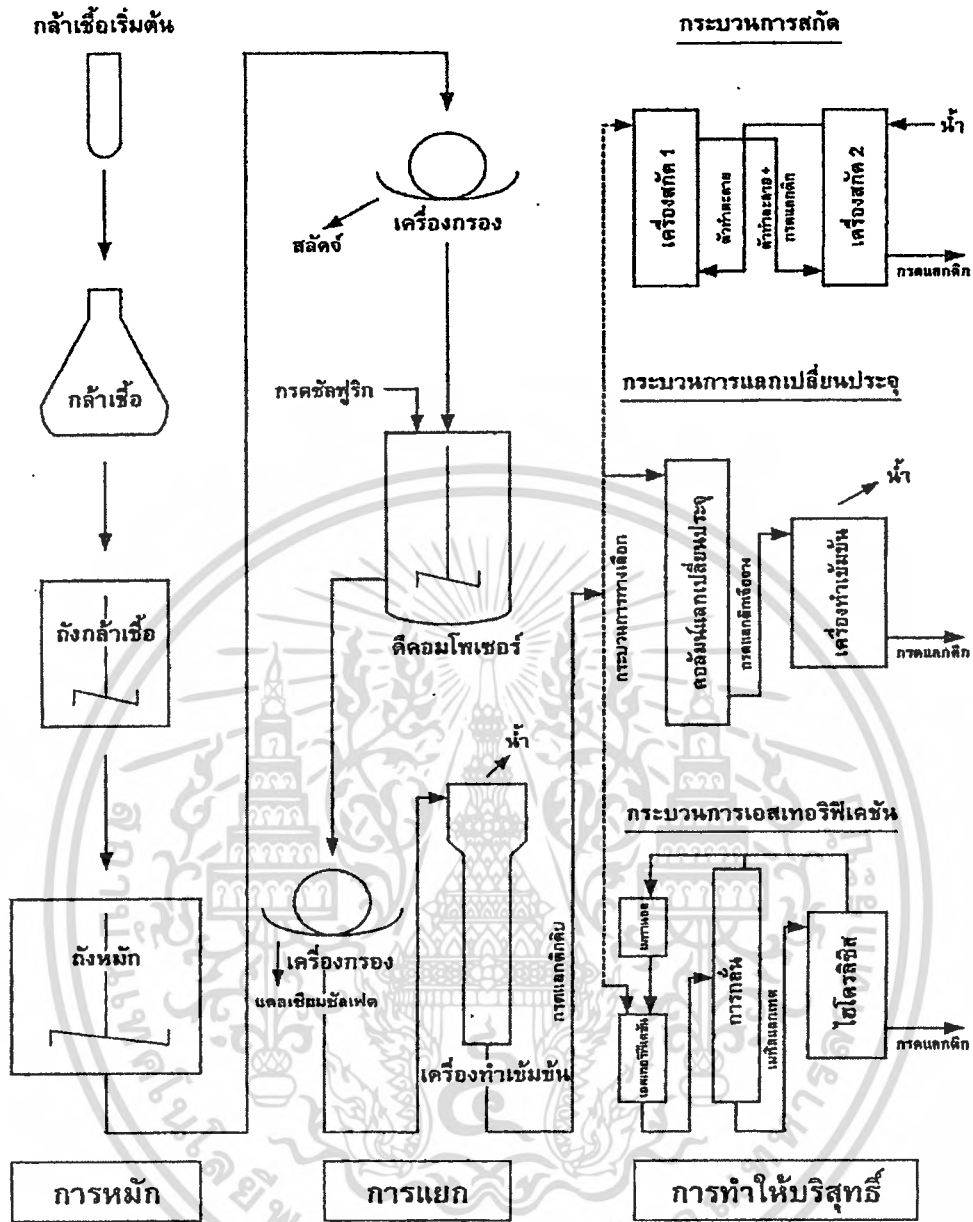
ออกซิเจนเป็นสิ่งสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศ (aerobe) ปริมาณออกซิเจนในอาหารจะป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญและการผลิตสารเมตาบอไลต์ (สมใจ ศิริ โภค, 2544) โดยทั่วไปแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าออกซิเจนมีผลต่อรูปแบบของการหมัก (โฮโมหรือเฮเทอโรเฟอเมนเตชัน) Condon (1987) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Leuconostoc* sp. ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่าเชื้อมีการผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่เดียวกันเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน พบว่าเชื้อออกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะผิดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการสร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่ Tseng และ Montville (1993) รายงานว่า ออกซิเจนมีผลต่อไพรูเวตเมแทบอลิซึมของ *L. plantarum* ซึ่งออกซิเจนจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแลคเตดไปเป็นอะซิเตดและคาร์บอน ไดออกไซด์ในระหว่างกระบวนการหมัก

2.8 วิทยาการความก้าวหน้าของการผลิตกรดแลคติก

การศึกษาการเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลคติกเพื่อลดต้นทุนของการผลิตกรดแลคติกเชิงพาณิชย์สามารถกระทำได้โดยวิธีการหมักแบบต่อเนื่องหรือการหมักต่อเนื่องแบบหมุนเวียนเซลล์ มีรายงานวิจัยสรุปผลเอาไว้ว่าสามารถผลิตกรดแลคติกด้วยการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่อาศัยเทคนิคการควบคุมอัตราการไหลสูงที่สามารถทำให้ได้อัตราการผลิตกรดแลคติกสูงถึง 50 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการบูรณาการเอาขั้นตอนของการหมักและการแยกกรดแลคติกเข้าด้วยกัน เพื่อวัตถุประสงค์ในการลดภาวะการยับยั้งกรดแลคติกความเข้มข้นสูงในระหว่างการหมัก หรือการประยุกต์ใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ในกระบวนการผลิตกรดแลคติกก็เป็นอีกหนทางเลือกหนึ่งของงานวิจัย กระบวนการการผลิตกรดแลคติกในอุตสาหกรรมแสดงดังรูปที่ 2.6

โลกทัศน์ในศตวรรษที่ 21 เป็นเรื่องของอยู่ร่วมกันของมนุษย์กับธรรมชาติอย่างเกื้อกูลและเป็นมิตรต่อกัน การลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นมาจากสังคมแบบอุตสาหกรรมในปัจจุบัน จึงกลายเป็นเรื่องที่ท้าทายของนักวิทยาศาสตร์และนักเทคโนโลยีทุกสาขาวิชาเป็นอย่างยิ่ง ในฐานะที่เป็นนักเทคโนโลยีชีวภาพก็มีโจทย์เชิงวิจัยที่สำคัญที่ต้องแก้ไขอยู่ด้วยเช่นเดียวกัน ดังตัวอย่างของการนำเอาแป้งมันสำปะหลังที่ผลิตได้เป็นจำนวนมากในประเทศไทยและมีราคาถูกมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลคติกด้วยเทคนิคการหมักต่อเนื่องสองขั้นตอนแบบหมุนเวียนเซลล์ ถือได้ว่าเป็นทางออกของปัญหาของการใช้ประโยชน์จากแป้งมันสำปะหลังด้วยการประยุกต์ใช้องค์ความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้กรดแลคติกที่ผลิตได้จากการหมักเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมต่อเนื่องในการผลิตพอลิแลคเตดซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพเพื่อใช้ทดแทนพลาสติกที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ก็จะเป็นการแก้ปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อมอย่างชาญฉลาดแบบยั่งยืนได้ (สาโรจน์ สิริสันตนิยกุล, 2544)



รูปที่ 2.6 กระบวนการการผลิตกรดแลกติกในอุตสาหกรรม
ที่มา: สาโรจน์ ศิริตันสนียกุล (2544)

2.9 การตรึงเซลล์ (สนใจ ศิริโชค, 2001)

เซลล์ตรึง (immobilized cells) คือ เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณที่ทำให้จุลินทรีย์ ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง หรือใช้ได้อย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์กำลังเจริญเซลล์ระยะพักตัว (resting cells) หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (death cells)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัด 110440 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.1 การคัดเลือกวัสดุพาหะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ มีหลักเกณฑ์ดังนี้

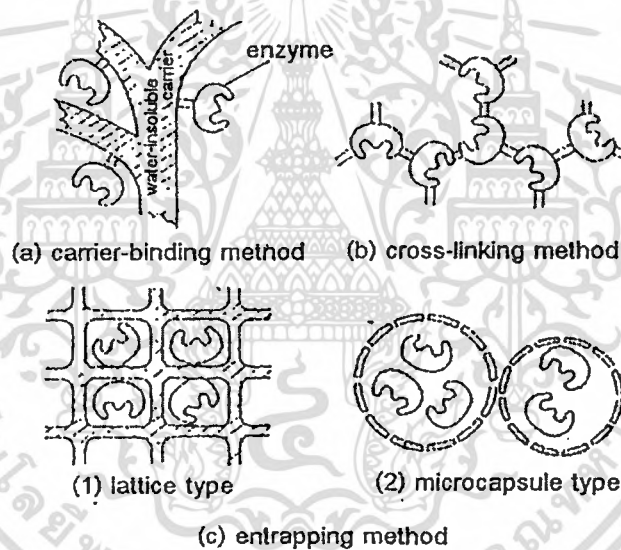
2.9.1.1 สมบัติในการละลาย ควรเป็นสารที่ละลายได้ง่าย และสารที่ได้ควรมีความคงตัว อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

2.9.1.2 สมบัติในการเกิดเจล สารผสมที่ได้ควรเกิดเจลได้ง่ายในสภาวะปกติและไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์

2.9.1.3 สมบัติของเจล เจลที่ได้ควรมีความแข็งแรง มีความคงตัวสูง และรูที่อยู่ภายในเจลควรมีขนาดเล็กพอที่จะป้องกันการรั่วไหลของเซลล์ได้ ในขณะเดียวกัน ซับสเตรตและผลิตภัณฑ์สามารถซึมผ่านได้อย่างอิสระ

2.9.2 วิธีการตรึงเซลล์

วิธีการตรึงเซลล์แบ่งเป็น 3 วิธีหลักๆ ได้แก่ การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method) และการห่อหุ้ม (entrapping method) แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 กระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูปตามวิธีเชื่อมตัวพุง วิธีเชื่อมขวาง วิธีห่อหุ้ม
ที่มา : สมใจ ศิริโกท (2001)

2.9.2.1 การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method)

การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งวิธีที่นิยมใช้แบ่งย่อยได้เป็น 2 วิธี คือการดูดซับ (adsorption) และการยึดด้วยแรงโควาเลนต์ (covalent binding method)

2.9.2.1.1 การดูดซับ

เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับกับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิก หรือพันธะไฮโดรเจน โดยอาศัยหลักทางเคมี เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย หรือยีสต์ ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนไพเมลิก (diaminopimelic acid) และเฮกโซซามีน (hexosamines) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาไอออนิก (ionic interaction) กับตัวนำที่ใช้ได้ โดยแรงดูดซับนี้จะขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของเซลล์รวมทั้งปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องด้วย การตรึงเซลล์วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนและมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนพีเอช การเกิดฟองอากาศ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการผลผลิตที่ปราศจากการปนเปื้อนของเซลล์ สำหรับข้อเสียอีกประการคืออัตราการดูดซับของเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยตัวนำค่อนข้างต่ำ แต่อาจปรับแก้ไขได้โดยใช้สารที่มีรูพรุนเป็นตัวดูดซับ

2.9.2.1.2 การยึดด้วยแรงโควาเลนต์

เป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่เชื่อมเซลล์โดยตรงกับแอคทีเวทซ์พอร์ต (activated support) โดยสารที่ใช้เชื่อมนั้นสามารถต่อกับส่วนประกอบที่ผิวเซลล์ ได้แก่ กลุ่มอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มไฮดรอกซิล กลุ่มอิมิดาโซล หรือกลุ่มฟีนอลของโปรตีน วิธีนี้มีข้อดีคือเซลล์จะเชื่อมกับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดีและมีการรั่วไหลของเซลล์ได้น้อย แต่ก็มีข้อเสียเนื่องการวิธีนี้ใช้สภาวะค่อนข้างรุนแรงและความเป็นพิษของสารที่ใช้ อาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการเอนไซม์เพียงชนิดเดียวและเอนไซม์ที่ต้องการนั้นเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งไม่ต้องสัมผัสกับสารเคมีที่ใช้ระหว่างการเตรียม สารที่ใช้เป็นตัวยึดเซลล์ด้วยวิธีนี้ได้แก่ ไททาเนียม (titanium) เม็ดแก้ว (glass bead) เซอร์โคเนียมไฮดรอกไซด์ (zirconium hydroxides) เป็นต้น

2.9.2.2 การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method)

เป็นการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวก bi หรือ multifunctional reagent เช่น กลูทาร์ลดีไฮด์ (glutaraldehyde) โทลูอีน (toluene) และไดไอโซไซยาเนต (diisocyanate) เป็นต้น (Chibata และคณะ, 1970) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ต่างจากวิธีอื่นๆ คือ เซลล์ไม่ได้ถูกตรึงอยู่กับสารที่เป็นตัวดูดซับหรือถูกห่อหุ้มอยู่ในเจล หรือในเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) แต่เป็นการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันโดยใช้สารเคมีภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างจะรุนแรง ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับใช้ในปฏิกิริยาเชิงเดี่ยวเท่านั้น

2.9.2.3 การห่อหุ้ม (entrapping method)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบคือ การห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูล (microcapsulation) และการห่อหุ้มแบบร่างแห (lattice type)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2.3.1 การห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูล หมายถึง การห่อหุ้มเซลล์ด้วยพอลิเมอร์ เยื่อบางกึ่งซึมซาบได้ (semipermeable membrane) เช่น คอลลอยเดียน หรือ ซิลิโคน ซึ่งป้องกันการ ซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้ซับสเตรตและผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงเซลล์วิธีนี้เป็น วิธีที่ง่าย แต่ไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาการคกตะกอนของเซลล์ เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นการใช้ประโยชน์จึงมีจำกัด นิยมใช้ในการผลิตยารักษาโรคและงานวิเคราะห์ ทั่วไป (Cheetham, 1980)

2.9.2.3.2 การห่อหุ้มแบบร่างแห หมายถึงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ไว้ใน ช่องว่าง 3 มิติ ในเจลของสารพอลิเมอร์ที่ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ (matrix) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยม และประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์เกือบทุกชนิด ในขณะที่วิธีการอื่นมี ความจำเพาะและข้อเสียเปรียบมากกว่า (Cheetham, 1980) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการห่อหุ้มนี้นิยมใช้ สารพวก biochemically inert hydrogel เป็นตัวห่อหุ้มโดยใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดโครงร่าง 3 มิติ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน โดยกลไกในการเกิดเจลนั้นมีหลายแบบ คือ การจับแบบโควาเลนต์ (covalent binding) เช่น การเกิดพอลิเมอร์โซ่ของพอลิอะคริลาไมด์ การใช้แรงไอออนิก เช่น แคลเซียมแอลจินेट การกระจาย (precipitation) โดยพีเอช อุณหภูมิ หรือการเปลี่ยนแปลงตัวทำ ละลาย เช่น คอลลาเจน คาราจีแนน พอลิสไตรีน สำหรับสารที่นิยมใช้เป็นตัวห่อหุ้มและประสบ ความสำเร็จในระดับอุตสาหกรรมมาแล้วได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ คาราจีแนน และแคลเซียม แอลจินेट

2.9.3 ข้อดีและข้อเสียของเซลล์ที่ถูกตรึง

2.9.3.1 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมี

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะปกติ และใช้ พลังงานต่ำปฏิกิริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูงปัญหาการเกิดมลภาวะ มีน้อย

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ ต้องการสารประกอบเชิงซ้อนเช่น โคแฟกเตอร์ ต่างๆ ในการเกิดปฏิกิริยา และมีความคงทนน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี

2.9.3.2 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือ สามารถใช้ซ้ำในระบบกะ (batch) หรือระบบต่อเนื่อง ได้ง่ายกว่า มีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้น้อยลง การแยกผลผลิตทำได้ง่ายกว่า เซลล์ที่ถูก ตรึงซึ่งเป็นเซลล์ในระยะพักต้องการพลังงานน้อย เพียงเพื่อรักษาสภาพความอยู่รอด ทำให้ได้ผล ผลิตสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ และอาจสูญเสีย ความสามารถระหว่างการตรึงได้

2.9.3.3 การเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือ สามารถใช้ซ้ำในระบบกะ (batch) หรือระบบต่อเนื่องได้ และการแยกผลผลิตทำได้ง่ายกว่า ในขณะที่การแยกเอนไซม์ออกจากผลผลิตทำได้ยาก ทำให้การนำกลับมาใช้ซ้ำหรือการใช้อย่างต่อเนื่องทำได้ยากด้วย

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ เซลล์อาจสูญเสียความสามารถบางส่วนในระหว่างการตรึง และเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเนื่องจากภายในเซลล์มีเอนไซม์หลายชนิด

2.9.3.4 การเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึง

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือ ราคาถูกกว่า เนื่องจากไม่จำเป็นต้องสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์และไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ ช่วยลดการสูญเสียความสามารถของเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ สามารถเตรียมได้ปริมาณมากๆ และใช้ได้ในปฏิกิริยาที่ต้องใช้เอนไซม์หลายชนิด

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งสามารถผลิตสารที่ไม่ต้องการออกมาซึ่งผลผลิตได้ และเซลล์ที่ถูกตรึงยังถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของซับสเตรตและผลผลิตโดยสารที่ใช้ตรึงเซลล์ นอกจากนี้อาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตจากตัวเซลล์ หรือสารที่ขับออกจากเซลล์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองเนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานานหรือเซลล์รั่วไหลเนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงมีการเจริญเพิ่มจำนวน

2.9.4 การประยุกต์ใช้เซลล์ตรึง

เซลล์ตรึงสามารถนำมาใช้ในการผลิตสารอินทรีย์ เช่น การผลิตกรดอะมิโน กรดอินทรีย์ กรดนิวคลีอิก สารปฏิชีวนะ ฮอร์โมน และน้ำตาล เป็นต้น ในการวิเคราะห์ทางคลินิกและทางเคมี เช่น ตัวรับรู้ชีวภาพ (microbial sensor) สำหรับโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์ชีวภาพ (biodegradable polymer) และการศึกษากลไกปฏิกิริยาของเอนไซม์ ยังมีการใช้เซลล์ตรึงในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตเนยแข็ง และการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น

Boyaval และ Goulet (1988) ศึกษาสถานะการผลิตกรดแลคติกจากหางนมที่ได้จากการผลิตเนยแข็งด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus helveticus* ในถังหมักแบบ packed bed เมื่อเปรียบเทียบกับระบบเซลล์อิสระ ที่ระดับพีเอชที่เหมาะสม พบว่า ระบบเซลล์ตรึงจะมีการผลิตกรดแลคติกดีกว่าระบบเซลล์อิสระ

Senthuran และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากหางนมแบบเบ็ดเสร็จระบบหมุนเวียนเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 100 กรัมต่อลิตร โดยการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* พบว่า สามารถใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลได้สูง และให้อัตราการผลิตกรดแลคติก 4.3 ถึง 4.6 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง พบว่าการใช้เซลล์ตรึงช่วยให้เซลล์สามารถทนต่อความ

เข้มข้นสูงของกรดแลคติกที่ผลิตขึ้น และเซลล์ที่รีงที่ได้สามารถนำมาใช้ผลิตกรดแลคติกในสภาวะที่มีสารอาหารจำกัดได้

Mostafa (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกแบบต่อเนื่องจากหางนม ด้วยเซลล์ที่รีงในถังหมักแบบ packed tubular ควบคุมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเจือจาง 0.33 ต่อชั่วโมง ที่มีระบบหมุนเวียนเซลล์และไม่มีระบบหมุนเวียนเซลล์ พบว่าอัตราการผลิตเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 9.36 และ 7.28 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

Yoo และคณะ (1996) ได้ใช้แอลจิเนตเป็นวัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้มเชื้อ *L. casei* ในการผลิตกรดแลคติก พบว่ามีข้อเสียคือมีช่องว่างที่เชื้อสามารถเจริญได้น้อยและ โครงสร้างของแอลจิเนตไม่เสถียรเนื่องจากสูญเสียแคลเซียมในเม็ดเจลเนื่องจากกรดแลคติกในระหว่างการหมักแบบกะ

Ciesarova (1998) ศึกษาการเปรียบเทียบระหว่างระบบตรึงเซลล์และเซลล์อิสระของเชื้อ *Saccharomyces uvarum* ในการทนต่อเอทานอล โดยใช้แอลจิเนตร้อยละ 2.5 และเพคเตตร้อยละ 5 ในการตรึงเซลล์ พบว่าระบบตรึงเซลล์สามารถทนเอทานอลได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

Rosenberg (1999) ศึกษาการผลิตกรดทาร์ทาริกจากเชื้อ *Nocardia tartaricans* โดยการเปรียบเทียบวัสดุตรึงเซลล์ ดังนี้ คาราจีแนนร้อยละ 4 แคลเซียมแอลจิเนตร้อยละ 3 และแคลเซียมเพคเตตร้อยละ 5 พบว่าการใช้แคลเซียมเพคเตตเม็ดเจลมีความคงตัวมากที่สุดและสามารถผลิตกรดได้มากที่สุด

Dembczynski และ Jakowski (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเซลล์ที่รีง *L. casei* ในเยื่อแซนแทนกัม (xanthan gum) และเซลล์ที่รีง *L. rhamnosus* ในเยื่อแอลจิเนต

Tango และ Ghaly (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกด้วยเซลล์ที่รีง *L. helveticus* ในถังหมักแบบ packed bed พบว่าอัตราการผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 3.9 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแลคโตส 100 กรัมต่อลิตร

Bergmaier และคณะ (2003) เปรียบเทียบการใช้เซลล์ที่รีงและเซลล์อิสระโดยเชื้อ *L. rhamnosus* RW-9595M เพื่อผลิต exopolysaccharide พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ และสามารถผลิตได้ 1.7 กรัมต่อลิตร

Kourkoutas และคณะ (2005) ศึกษาการตรึงเซลล์ *L. casei* บนซินแอปเปิลและควินซ์ ในการผลิตกรดแลคติกโดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต พบว่าสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการหมักแบบกะได้ทั้งหมด 15 รอบ

Adinarayana และคณะ (2005) ศึกษาชนิดของสารที่ใช้ในการตรึงเซลล์ประกอบด้วย แคลเซียมแอลจิเนต พอลิอะคริลาไมด์ เจลาติน วุ้น และคาราจีแนน ในการผลิต alkaline protease โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* PE-11 พบว่าแคลเซียมแอลจิเนตมีประสิทธิภาพดีที่สุด

Idris และ Suzana (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากกากสับประรดเหลือทิ้งโดยตรึงเซลล์ *L. delbrueckii* ด้วยโซเดียมแอลจิเนต พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์คือ การใช้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอลจินตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 เม็ดเจลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Rao และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยการตรึงเซลล์เชื้อ *L. delbrueckii* ด้วยแอลจินตและอนุพันธ์ของแอลจินต คือ succinylated alginate และ palmitoyl alginate พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 63.5, 76.2 และ 80.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เซลล์อิสระผลิตกรดแลคติกได้เพียง 51 กรัมต่อลิตร

Liouni และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์โดยการตรึงเซลล์เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ห่อหุ้มเซลล์สองชั้น ด้วยแอลจินตและโคโคซาน พบว่าช่วยเพิ่มความแข็งแรงและความคงตัวของเม็ด นอกจากนี้ยังช่วยลดการหลุดร่วงของเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเจล

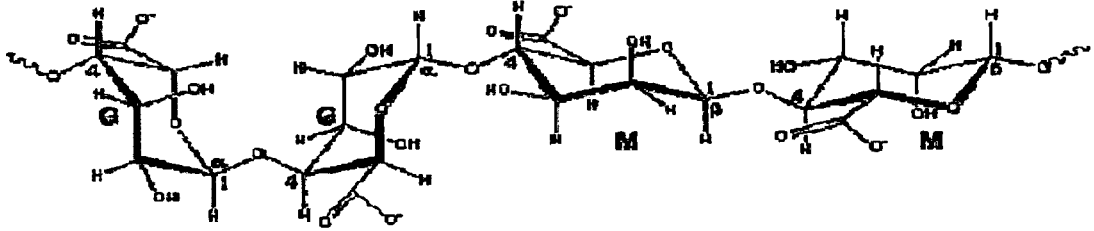
Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการประยุกต์ใช้เพคตินในการตรึงเซลล์ *L. casei* สำหรับการผลิตกรดแลคติกจากเวย์ พบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 94.37) ให้เป็นกรดแลคติก (32.95 กรัมต่อลิตร) และสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงนำกลับมาใช้ใหม่ ได้ถึง 16 รอบ

Giordano และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยการตรึงเซลล์เอนไซม์กลูโคสไมเลสร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วยเพคติน พบว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

Mirdamadi และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยการตรึงเซลล์เชื้อ *L. casei* subsp. *casei* ATCC 39392 ด้วยวัสดุตรึงเซลล์ชนิดต่างๆ คือ แบเรียมแอลจินต ฟู้น และพอลิยูรีเทนโฟม (polyurethane foam cubes) พบว่าการใช้แบเรียมแอลจินตสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุด (60.13 กรัมต่อลิตร) และเม็ดเจลมีความแข็งแรงสามารถนำมาใช้ซ้ำในการหมักได้มากกว่า 40 วัน

2.10 แอลจินต (Alginate)

แอลจินตเป็น polyuronic acid ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล เป็นโคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโครงสร้างของ β -D-manuronic acid และ α -L-guluronic acid เชื่อมกันด้วย พันธะ β และ α ตามลำดับ แสดงโครงสร้างของแอลจินตดังรูปที่ 2.8 แอลจินตสามารถเกิดเจลชนิด ไอโอโนโทรปิกในสารละลายแคลเซียมไอออน หรือสารละลายที่เป็น multivalent cation เช่น Ba^{2+} Cu^{2+} หรือ Al^{3+} เป็นต้น เกิดเป็นเจลที่เป็นโครงร่างสามมิติที่มีความหนืด และสามารถดักจับเซลล์ไว้ภายในที่สภาวะไม่รุนแรง และพบว่าไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ (ดิยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์, 2549 ; Brodelius และ Vandamme, 1987)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของแอลจินेट

ที่มา : www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html.

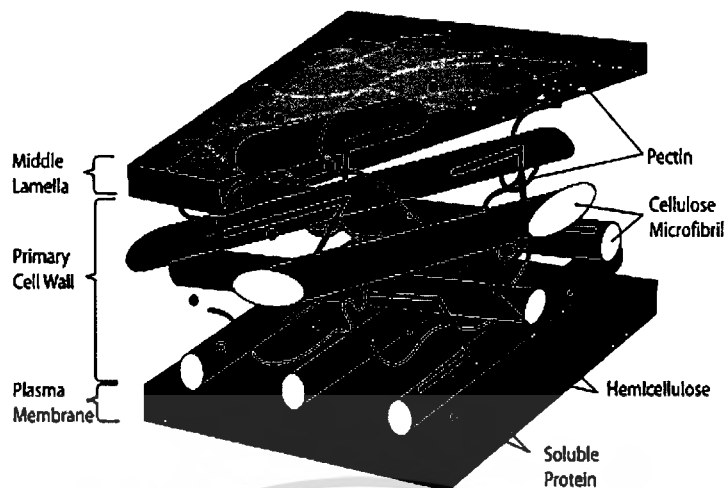
การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมแอลจินेटสามารถทำได้โดยผสมเซลล์แขวนลอยคั่งลงในสารละลายโซเดียมแอลจินิต แล้วนำไปหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดแคลเซียมแอลจินิต เจลขึ้นทันที หลังจากนั้นควรแช่เจลไว้ในสารละลายแคลเซียมอย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดเจลอย่างสมบูรณ์ (สนใจ ศิริโชค, 2544)

ข้อดีของการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมแอลจินิตคือ ทำได้ง่าย ภายใต้สภาวะปกติสะดวกและรวดเร็ว ดังนั้นจึงเป็นที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้ยังปลอดภัยเนื่องจากการได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร เซลล์ที่ถูกตรึงสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ภายในเจล ทำให้ใช้ได้เป็นเวลานานและเจลที่ได้สามารถละลายในน้ำเกลือ (normal saline) จึงสามารถศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ภายในเจลหลังการตรึงเซลล์ได้ด้วย

ข้อเสียของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินิต คือ เจลไม่แข็งแรง เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีตัวจับแคลเซียม (calcium-chelating agent) เช่น ฟอสเฟต และ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ซึ่งสามารถดึง Ca^{2+} ออกจากเจลได้ หรือเมื่อมีแคทไอออนบางชนิด เช่น Mg^{2+} หรือ K^+ ซึ่งสามารถเข้าไปแทนที่ Ca^{2+} ได้ ทำให้เจลไม่คงตัว เกิดการละลาย และเซลล์รั่วออกมาได้ นอกจากนี้เซลล์ยังรั่วออกมาจากเจลได้กรณีที่เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกิดขึ้นภายในเจล และในกรณีที่ใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักที่มีเครื่องกวน

2.11 เพคติน (Pectin)

สารกลุ่มเพคตินเป็นโพลีแซกคาไรด์เชิงซ้อนในพืช ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ และเป็นสารที่สำคัญในบริเวณชั้นมิดเดิลลามেলা (middle lamella) ที่ยึดเหนี่ยวเซลล์เข้าด้วยกัน (รูปที่ 2.9) โดยจับกับเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และไกลโคโปรตีนของผนังเซลล์พืช (Christensen, 1986) พบในพืชชั้นสูงโดยปรากฏในชั้นระหว่างเซลล์หรือจุดเชื่อมต่อระหว่างผนังเซลล์ ทำให้เกิดช่องสำหรับอาหารและน้ำผ่าน ในผนังเซลล์ สารกลุ่มเพคตินเป็นสารเคลือบเส้นใยเซลลูโลสที่สำคัญและอาจจะเชื่อมต่อกับพันธะโควาเลนต์กับโพลีเมอร์อื่นๆ



รูปที่ 2.9 การแบ่งชั้นของผนังเซลล์พืชและองค์ประกอบที่สำคัญในแต่ละชั้น

ที่มา: <http://filing.fda.moph.go.th/library/e-learning>

2.11.1 โครงสร้างของเพคติน

เพคตินในทางการค้า มีองค์ประกอบหลักเป็นสารโพลีเมอร์ของหมู่กาแลคทูโรนิกที่ต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1-4) โดยโมเลกุลของเพคตินประกอบด้วยกรดกาแลคทูโรนิกที่เชื่อมต่อกันประมาณ 200-1000 หน่วย ส่วนใหญ่เพคตินจะถูกเอสเทอร์ไฟด์ หรือแทนที่ด้วยหมู่เมทอกซิล โดยใช้สารเอทิลหรือเมทิลแอลกอฮอล์ในการเอสเทอร์ไฟด์ แต่ในทางธรรมชาติเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์พืช หรือเอนไซม์จากเชื้อยีสต์และเชื้อรา (May, 1997)

สารประกอบเพคติน จากสูตร โครงสร้างสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด (Wong, 1995)

ชนิดที่ 1 เพคตินที่ละลายน้ำได้ โดยมีโครงสร้างที่เป็นกรดแกลคทูโรนิกที่มีหมู่เมทิลเอสเทอร์อยู่ในโครงสร้าง ซึ่งมีสูตร โครงสร้างดังรูปที่ 2.17 และเพคตินชนิดนี้ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทตามปริมาณหมู่เมทิลเอสเทอร์คือ (Whistler และ Bemiller, 1997; Femmerma, 1996)

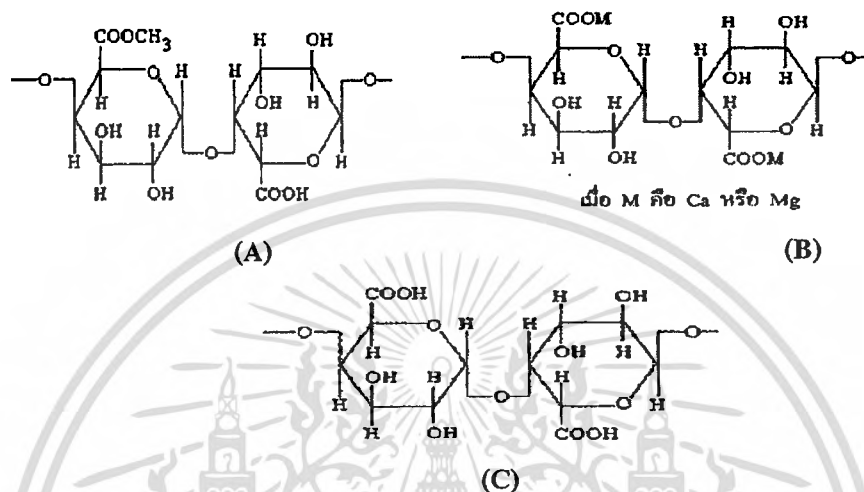
เพคตินกลุ่มที่มีเมทอกซิลสูง (High Methoxyl Pentins ; HMP) เป็นเพคตินที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์มากกว่าร้อยละ 8.16 คุณสมบัติของเพคตินชนิดนี้คือ สามารถเกิดเจลได้ในสภาพที่มีน้ำตาลและกรดในปริมาณที่เหมาะสม และจะใช้น้ำตาลในการเกิดเจลสูงประมาณร้อยละ 60-65

เพคตินกลุ่มที่มีเมทอกซิลต่ำ (Low Methoxyl Pentins ; LMP) เป็นเพคตินที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าร้อยละ 8.16 เพคตินชนิดนี้เกิดเจลได้เมื่อมีไอออนของโลหะอยู่ด้วยเช่น แคลเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน

ชนิดที่ 2 เพคตินที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่เมื่อนำไปไฮโดรไลส (hydrolyse) ด้วยกรดจะสามารถละลายน้ำได้ เนื่องจากไฮโดรเจน จะเข้าไปแทนที่แคลเซียมหรือแมกนีเซียม จึง

ทำให้เกิดเป็นกรดเพคตินิก (pectinic acid) ที่สามารถละลายน้ำได้ หรือใช้เอนไซม์ทำให้กลายเป็นกรดเพคตินิกชนิดนี้เรียกว่า โปรโตเพคติน (protopectin) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.10

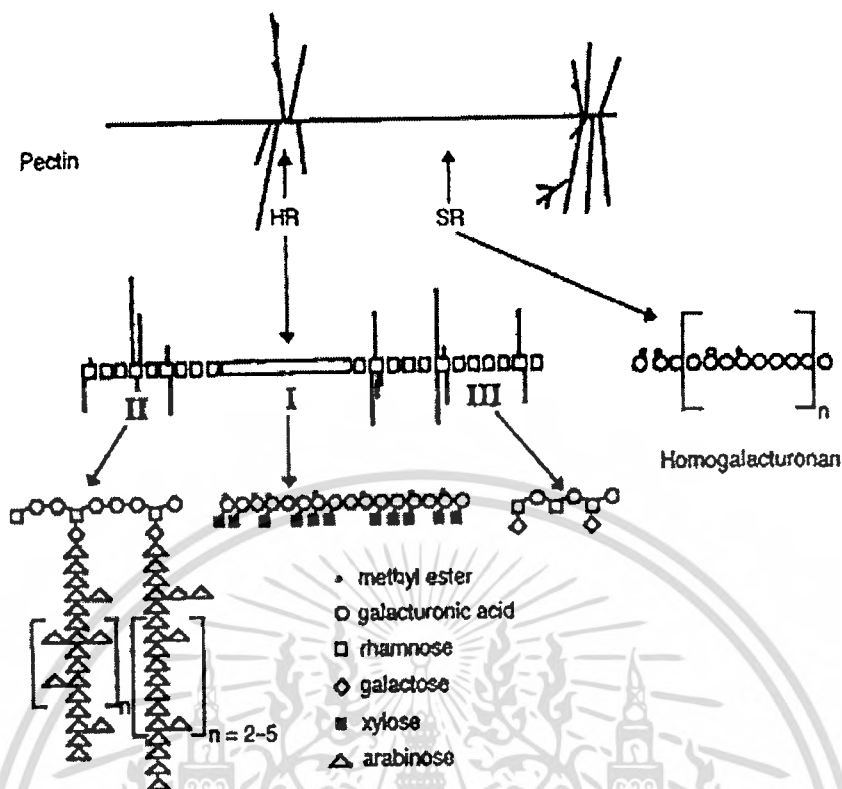
ชนิดที่ 3 เพคตินมีโครงสร้างประกอบด้วยกรดแลคทอโรนิกที่เชื่อมต่อกันอย่างเดี่ยว ไม่มีหมู่เมทิลเอสเทอร์อยู่ในโครงสร้างเลย เพคตินชนิดนี้จะไม่สามารถเกิดเจลได้ทุกสภาวะ ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 โครงสร้างเพคตินชนิดต่างๆ (A)โครงสร้างของเพคตินชนิดที่ 1 (B)โครงสร้างของเพคตินชนิดที่ 2 และ (C)โครงสร้างของเพคตินชนิดที่ 3

ที่มา: Meyer และ Anderson (1952)

เพคตินได้จากการสกัดโปรโตเพคตินที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืช จะประกอบไปด้วยน้ำตาลธรรมดา (neutral sugars) หลายชนิด เช่น แรมโนส กาแลคโตส อะราบิโนส และน้ำตาลอื่นๆ จำนวนเล็กน้อย เพคตินเป็น heteropolysaccharide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประกอบด้วยโพลิเมอร์ของ D-galacturonic acid (ประมาณร้อยละ 65 โดยน้ำหนัก) เป็นสายหลักหรือที่เรียกว่า smooth regions และมีกิ่งแขนง (hair regions) อาจเป็น แรมโนส กาแลคโตส อะราบิโนส และบางส่วนของหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ที่ D-galacturonic acid จะถูกเอสเทอร์ไฟด์ด้วยหมู่เมทิล (-CH₃) เป็นเมทิลเอสเทอร์และมี degree of methylation (DM) แตกต่างกัน จึงทำให้เพคตินจากวัตถุดิบแต่ละแหล่งมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน และเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนมากดังรูปที่ 2.11 เป็นโครงสร้างตามสมมติฐาน (hypothetical structure) ของเพคตินจากแอปเปิล



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเพคตินจากแอปเปิล

ที่มา: http://eu.lib.kmutt.ac.th/elearning/Courseware/BCT611/Chap4/chapter4_3.html

2.11.2 การแบ่งเพคตินตามค่า Degree of esterification

เพคตินแต่ละชนิดจะมีหมู่คาร์บอนิลของกรดกาแลคทูโรนิกที่ถูกเอสเทอร์ไฟด์ (esterified) ด้วยหมู่เมทิลได้ต่างกัน อัตราส่วนของหมู่เมทิลที่ถูกเอสเทอร์ไฟด์จะแสดงในรูปของระดับการเกิดเอสเทอร์ไฟด์ (Degree of esterification ; DE) ซึ่งค่า DE นี้เป็นจำนวนร้อยละของกรดกาแลคทูโรนิกที่ถูกเอสเทอร์ไฟด์ต่อจำนวนกรดกาแลคทูโรนิกทั้งหมด การแบ่งเพคตินตามค่า DE สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มดังนี้

2.11.2.1 เพคตินกลุ่มที่มีเมทอกซิลสูง (High methoxyl pectin)

เป็นเพคตินที่มีค่าร้อยละ DE ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 50 ในทางการค้าจะมีค่า ร้อยละ DE อยู่ในช่วง 55-75 การเกิดเจลของเพคตินชนิดนี้จะต้องมีองค์ประกอบที่เหมาะสม คือ มีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 55-65 ค่าความเป็นกรดค่า 2.9-3.1

2.11.2.2 เพคตินกลุ่มที่มีเมธอกซิลต่ำ (low methoxyl pectin)

เป็นเพคตินที่มีค่า DE ต่ำกว่า ร้อยละ 50 ส่วนใหญ่จะมีค่า DE อยู่ในช่วงร้อยละ 20-50 ในทางการค้าจะมีค่า DE อยู่ในช่วงร้อยละ 20-40 เพคตินชนิดนี้สามารถเกิดเจลได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยต้องมีไอออนของโลหะบางชนิดช่วยในการเกิดเจล เช่น Ca^{2+} และสามารถเกิดเจลได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 3.0-4.5 ในการผลิตเพคตินกลุ่มนี้จะต้องมีการดีเอสเทอร์ไฟด์โดยใช้เอธิลหรือเมทิลแอลกอฮอล์ หรือด่าง

2.11.3 คุณสมบัติของเพคติน (ณรงค์ ศิริรัมย์, 2546)

2.11.3.1 สมบัติการละลายของเพคติน

เพคตินสามารถละลายได้ในน้ำเย็นและน้ำร้อนให้สารละลายที่มีความข้นหนืด แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยทั่วไปความสามารถในการละลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อมวลโมเลกุลลดลงและการเกิดเอสเทอร์ไฟด์ของหมู่คาร์บอกซิลเพิ่มขึ้น

2.11.3.2 ความหนืดของเพคติน

ความข้นหนืดของเพคตินนั้นขึ้นอยู่กับอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่าง เช่น ความเข้มข้นของเพคติน ชนิดของเพคติน ขนาดของมวลโมเลกุล อุณหภูมิ พีเอช และปริมาณแคลเซียม พบว่า เพคตินที่มีมวลโมเลกุลสูงจะทำให้สารละลายมีความหนืดสูงขึ้นด้วย

2.11.3.3 การเกิดเจลของเพคติน

สามารถแบ่งกลไกการเกิดเจลของเพคติน ออกเป็น 2 ลักษณะ คือ

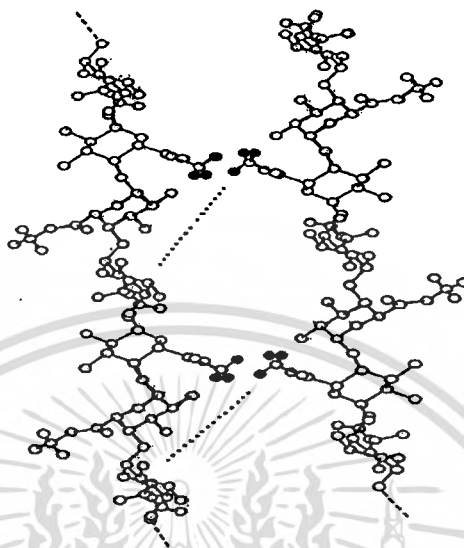
2.11.3.3.1 เจลของเพคติน (pectin gel) เป็นเจลที่เกิดจากเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลสูง เพคตินมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophobic) เมื่อละลายน้ำจะเกิดพันธะระหว่างเพคตินกับน้ำ ได้สารข้นหนืด เพคตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิลส่วนใหญ่เกิดเป็นเอสเทอร์ ($-\text{COOCH}_3$) และส่วนน้อยจะเกิดเป็นคาร์บอกซิลอิสระ ($-\text{COOH}$) จะมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน และจะแตกตัวมากขึ้นกับพีเอช ที่พีเอชสูงจะแตกตัวได้มากขึ้นให้ประจุที่ผลักกันเอง ทำให้โมเลกุลเรียงตัวเป็นเส้นตรงของเหลวจะหนืดแต่ไม่เกิดเจลขึ้น เจลจะเกิดได้เมื่อเพคตินมาเชื่อมเข้าด้วยกันตรงบริเวณที่เรียกว่า junction zone เกิดเป็น โครงสร้างร่างแหสามมิติขึ้น ดังรูป 2.12

กรณีนี้จะเกิดขึ้นได้เมื่อมีการเติมน้ำตาลลงไปเพื่อดึงน้ำออก และเติมกรดเพื่อลดพีเอชให้อยู่ในช่วง 2.9-3.4 ทำให้กลุ่มคาร์บอกซิลลดการแตกตัว โมเลกุลของเพคตินจะเปลี่ยนสภาพเป็นของแข็งที่มีความยืดหยุ่น กลุ่มโพลาร์ (polar groups) ของโมเลกุลของเพคตินที่อยู่ใกล้กันจะเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยพันธะไฮโดรเจน เกิดเป็นร่างแหสามมิติที่กักของเหลวไว้ภายในความแข็งของเจลขึ้นกับความแข็งแรงและความต่อเนื่องของร่างแหของเพคติน

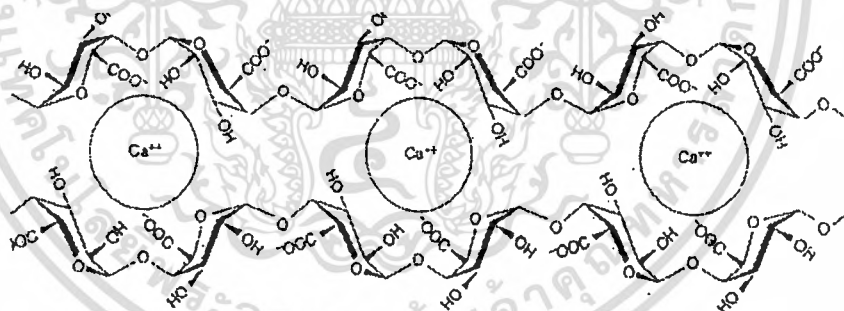
2.11.3.3.2 เจลของแคลเซียมเพคเตต (calcium pectate gel) เจลชนิดนี้เกิดกับเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำ จะเกิดที่พีเอชสูงกว่าพวกแรก คือในช่วง 3.4-6.0 โดยร่างแหสามมิติเกิดขึ้นจากการที่ไอออนของแคลเซียม (Ca^{2+}) หรือ แมกนีเซียม (Mg^{2+}) เป็นตัวเชื่อมกลุ่มคาร์บอกซิล

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่แตกตัวของ โมเลกุลเพคตินที่อยู่ใกล้กัน (เช่นเดียวกับการเกิดเจลของ โซเดียมแอลจินेट) เกิดการพอร์มตัวของ junction zone ด้วยไอออนของแคลเซียมเพื่อเชื่อมสายโมเลกุลและมีการจัดรูปร่างใหม่ที่เรียกว่า egg box model ดังรูปที่ 2.13 เจลชนิดนี้สามารถเกิดเจลได้โดยไม่ต้องมีน้ำตาล



รูปที่ 2.12 การเกิด junction zone ของเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลสูง
ที่มา : Oakenfull (1991)



รูปที่ 2.13 การเกิด junction zone ของเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำ
ที่มา : May (1997)

2.11.4 ประโยชน์ของเพคติน

เพคตินเป็นสารธรรมชาติที่มีการนำมาใช้ในอาหารอย่างแพร่หลาย และได้รับอนุญาตกันทั่วโลก คณะกรรมการ JFECFA (Joint FAC/WHO Expert Committee on Food Additive) ได้จัดเพคตินเป็นวัตถุเติมแต่งอาหาร (food additive) ที่ปลอดภัยและไม่จำกัดปริมาณในการได้รับต่อวัน ได้มีการนำเพคตินมาใช้เพื่อทำหน้าที่ต่างๆ ในอาหาร เช่น ใช้เป็นสารก่อให้เกิดลักษณะเจล (gelling agent) สารให้ความหนืด (thickener) สารให้ลักษณะเนื้อสัมผัส (texturizer) สารก่อให้เกิดอิมัลชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(emulsifier) และสารเสริมความคงตัว (stabilizer) และยังมีการนำเพคตินมาใช้เป็นสารทดแทนไขมันและน้ำตาลในอาหารแคลอรีต่ำ การที่เพคตินสามารถใช้ได้หลายหน้าที่เนื่องจากโมเลกุลของเพคตินมีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ซึ่งสามารถเข้าได้กับอาหารที่มีระบบแตกต่างกัน สิ่งที่เป็นตัวบ่งชี้ว่าเพคตินสามารถใช้ในหน้าที่ใดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ระดับการเกิดเอสเทอร์ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพของเพคตินในอุตสาหกรรม (Thakur และคณะ, 1997)

นอกจากนี้ยังสามารถนำเพคตินมาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการประยุกต์ใช้เพคตินในการตรึงเซลล์ *L. casei* สำหรับการผลิตกรดแลคติกจากเวย์ เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมแอลจิเนตพบว่า มีข้อดี และข้อเสีย ดังนี้

ข้อดีของการตรึงเซลล์ด้วยเพคตินหรือแคลเซียมเพคเตต คือ เจลมีความแข็งแรง และมีความคงตัวดีที่ค่าพีเอชต่ำ แคลเซียมเพคเตตมีความไวต่อไอออน และสารเคมีน้อยกว่าแคลเซียมแอลจิเนตทำให้ถูกทำลายได้ยากกว่า นอกจากนี้ยังปลอดภัย เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารและยา (Gemeiner และคณะ, 1996)

ข้อเสียของการตรึงเซลล์ด้วยเพคตินหรือแคลเซียมเพคเตต คือ เพคตินมีราคาแพงกว่าโซเดียมแอลจิเนต และในการตรึงเซลล์มีความยุ่งยากกว่าการใช้โซเดียมแอลจิเนต เนื่องจากต้องมีการเตรียมเพคตินในรูปเพคเตต โดยนำเพคตินมาทำปฏิกิริยา de-esterification เช่น โพลีแทสเซียมเพคเตตเตรียมโดยนำเพคตินมาปฏิกิริยา de-esterification ด้วยโพลีแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Smogrovicova และ Domy, 1997)

2.12 การสกัดเพคติน (กษพรรณ วงศ์เจริญ, 2548)

การสกัดเพคตินที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสามารถสกัดออกมาได้โดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด โดยกรดจะสกัดเพคตินด้วยการไฮโดรไลซ์เพคตินในรูปที่ไม่ละลาย (insoluble pectin) ให้เป็นเพคตินที่อยู่ในรูปที่ละลายได้ (soluble pectin) ดังนั้นชนิดและความเข้มข้นของกรดเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งในการสกัดเพคตินจากเนื้อเยื่อพืช โดยทั่วไปสาร เพคตินในเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ เช่น โปรโตเพคติน และอยู่ร่วมกับสารอื่น เช่น อยู่ร่วมกับเซลลูโลส แคลเซียม และไอออนอื่นๆ สามารถทำให้เพคตินเหล่านี้ละลายออกมาได้โดยการสกัดด้วยสารละลายกรดหรือด่างที่ร้อนและอาจมีการใช้ chelating agent เช่น สารประกอบพอลิฟอสเฟต (polyphosphate) ร่วมด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด โดยจับไอออนที่มาเกาะกับ โมเลกุลเพคตินทำให้เพคตินละลายออกมาได้ เพคตินที่สกัดได้จากพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณของเพคติน (ร้อยละ) ในพืชผักผลไม้

ผักและผลไม้	% น้ำหนักแห้ง	ผักและผลไม้	% น้ำหนักแห้ง
กุยช่าย (<i>Allium tuberosum</i> Rottler.)	0.584	มะขามเปียก (<i>Tamarindus indica</i> Linn.)	7.255
หอมแดง (<i>Allium ascalonicum</i> Linn.)	0.948	มะขามอ่อน (<i>Tamarindus indica</i> Linn.)	4.614
ผักโขม (<i>Amaranthus viridis</i> Linn.)	0.534	มะกรูด (<i>Citrus hystrix</i> DC.)	2.285
มะละกอ (<i>Carica papaya</i> Linn.)	0.463	มะนาว (<i>Citrus aurantifolia</i> Swing.)	2.702
กะหล่ำดอก (<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis Linn.)	0.216	มะเขือเทศ (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	0.338
กะหล่ำปลี (<i>Brassica oleracea</i> var. capitata Linn.)	0.051	มะเขือเปราะ (<i>Solanum aculeaessimum</i>)	0.127
ผักกวางตุ้ง (<i>Brassica campestris</i> L.)	0.181	มะเขือพวง (<i>Solanum torvum</i> SW.)	0.713
ผักกาดหัว (<i>Brassica campestris</i> Linn.)	0.083	มะเขือยาว (<i>Solanum melongena</i> Linn.)	0.274
คะน้า (<i>Brassica alboglabra</i> Linn.)	0.099	คื่นฉ่าย (<i>Apium graveolens</i> Linn.)	0.208
แตงกวา (<i>Cucumis sativus</i> Linn.)	0.215	แครอท (<i>Daucus carota</i> Linn.)	0.436
แตงโมอ่อน (<i>Citrulus lanatus</i>)	0.709	ผักชีฝรั่ง (<i>Petroselinum crispum</i> Linn.)	0.325
บวบเหลี่ยม (<i>Luffa acutangula</i> Roxb.)	0.507	กระชาย (<i>Boesenbergia pandurata</i> Holtt.)	0.964
ตำลึง (<i>Coccinia grandis</i> Linn.)	0.396	ขิง (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.)	1.097
ผักเขียว (<i>Benincasa cerifera</i> San.)	0.397	มะกอกน้ำ (<i>Spondias cytherea</i> Sonn.)	2.119
ผักทอง (<i>Cucubita moschata</i> Decne.)	0.166	ลำไย (<i>Euphoria longana</i> Lamk.)	0.821
กะเพรา (<i>Ocinum sanctum</i> Linn.)	0.557	น้อยหน่า (<i>Annona squamosa</i> Linn.)	1.647
แมงลัก (<i>Ocinum canum</i> Linn.)	0.474	มะเฟือง (<i>Averrhoa carambola</i> L.)	0.510
สะระแหน่ (<i>Mentha arvensis</i> Linn.)	0.399	แตงไทย (<i>Cucumis melo</i> Linn.)	0.364
โหระพา (<i>Ocinum basilicum</i> Linn.)	0.309	มะขามป้อม (<i>Phyllanthus emblica</i> Linn.)	3.189
กระถิน(ผักอ่อน) (<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de wit.)	0.601	มังคุด (<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)	2.154
ซีเหล็ก (<i>Cassia siamea</i> Britt.)	0.269	กระเทียม (<i>Sandoricum indicum</i> Mars.)	3.792
ถั่วฝักยาว (<i>Vigna unguiculata</i> Linn.)	0.142	ลองกอง (<i>Lansium domesticum</i> Correa)	1.600
ถั่วลันเตา (<i>Pisum sativum</i> Linn.)	0.151	ชมพู (<i>Eugenia javanica</i> Lamk.)	0.196
กะเจ็ด (<i>Neptunia oleracea</i> Lour.)	0.182	ฝรั่ง (<i>Psidium guajava</i> Linn.)	1.294
ผักบุ้งแดง (<i>Lpomoca aquatica</i> Frosk.)	0.604	แอปเปิ้ล (<i>Malus domestica</i> Borkn.)	0.656

ที่มา : วราภรณ์ ชัยโอภาส (2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.1 การเตรียมวัตถุดิบ

ในการสกัดเพคตินนั้นควรทำการเตรียมวัตถุดิบในการสกัดให้เหมาะสมเพื่อให้ได้เพคตินที่มีคุณภาพดีและปริมาณสูง โดยการนำวัตถุดิบที่แห้งไปบดและทำการขจัดสารแปลกปลอม ต่างๆ เช่น สี สารให้รสขม กรด น้ำตาล ตลอดจนสารอื่นๆออก ซึ่งการขจัดสารเหล่านี้ทำได้ 2 วิธี คือ การใช้น้ำเย็นล้าง และการใช้แอลกอฮอล์ล้าง ในการใช้น้ำล้างนั้นจะมีเพคตินบางส่วนละลายไปกับน้ำ เพคตินส่วนใหญ่ยังอยู่ในรูปโปรโตเพคติน ซึ่งเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ การล้างด้วยน้ำนี้ควรเปลี่ยนน้ำล้างหลายๆ ครั้ง พร้อมทั้งคนไปด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการล้าง ซึ่งการล้างน้ำนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากเพคตินที่สกัดออกมาจะมีคุณภาพดีหรือเลวขึ้นอยู่กับวิธีการล้าง และการล้างที่ดีจึงไม่ควรให้มีของแข็งที่ละลายน้ำได้เหลืออยู่ในน้ำล้างขั้นสุดท้ายเลย เมื่อล้างด้วยน้ำเสร็จแล้วนำมาล้างต่อในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เพื่อขจัดสารละลายได้ในแอลกอฮอล์ออกโดยมีการให้ความร้อนช่วยในการสกัดเป็นเวลา 12-18 นาที ความร้อนจะสามารถทำลายสาร เพคติน เอนไซม์ได้ (Kertesz, 1951)

2.12.2 ขั้นตอนการสกัดเพคติน

เมื่อได้วัตถุดิบที่จัดสิ่งเจือปนหรือสารประกอบต่างๆ ออกข้างแล้ว จึงนำมาสกัดเพคตินโดยวิธีการไฮโดรไลซ์ ในการสกัดเพคตินโดยวิธีนี้อาจใช้กรดแร่หรือกรดอินทรีย์ แต่ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเพคติน คือ กรดเกลือหรือกรดไฮโดรคลอริก บางครั้งการสกัดเพคตินในเนื้อเยื่อพืชอาจมีเพคตินที่อยู่ในรูปของแคลเซียมเพคติน (calcium pectinate) ซึ่งไม่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายกรด จึงมีการใช้สารพวก chelating agent เติมลงไปในการละลายที่ใช้สกัดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด โดยจะมีผลทำให้แคลเซียมเพคติน สามารถแปรสภาพไปอยู่ในรูปเพคตินที่ละลายได้มากขึ้น สารที่นิยมใช้เพิ่มประสิทธิภาพได้แก่ สารพวกพอลิฟอสเฟต (Kertesz, 1951)

2.12.3 การทำสารละลายเพคตินให้เข้มข้น

หลังจากผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายกรดแล้วนำมากรองเอากากออกจากสารละลายเพคติน นำสารละลายนั้นมาทำให้เข้มข้นโดยการระเหยน้ำออกจากสารละลายเพคติน (Kertesz, 1951)

2.12.4 การตกตะกอนเพคติน

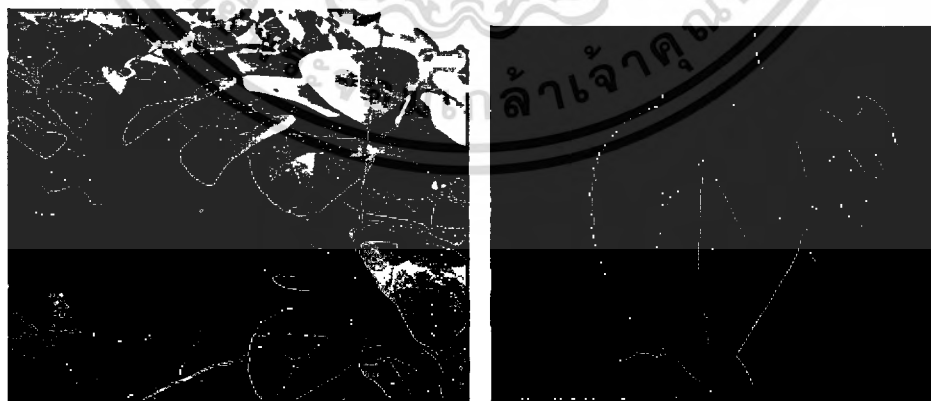
เมื่อผ่านขั้นตอนการทำสารละลายเพคตินให้เข้มข้นแล้ว นำสารละลายเพคตินนั้นมาทำให้ตกตะกอนเพื่อแยกเพคติน เอทานอลเป็นสารที่นิยมใช้ในการตกตะกอนเพคติน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการตกตะกอนแล้วกรองแยกตะกอน และทำการตกตะกอนด้วยเอทานอลอีกครั้งหนึ่งเพื่อให้เพคตินมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น นำตะกอนเพคตินที่ได้ไปทำให้แห้งแล้วบดให้เป็นผงจะได้ผงเพคติน

2.13 กรุงเขมา

2.13.1 ลักษณะทั่วไปของกรุงเขมา

กรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) นอกนี่ยังมีชื่อเรียกในท้องถิ่นอื่น เช่น ขงเขมา พระพาย กรุงบาดาล ใบกั้นบิด (ภาคกลาง), สีฟัน (เพชรบุรี), เครือหมาน้อย (ภาคตะวันออก เชียงเหนือ), เปล้าเลือด (แม่ฮ่องสอน), อะคามินเยาะ (มลายู-นราธิวาส) กรุงเขมาเป็นไม้เถาที่เลื้อยไปตามต้นไม้อื่น ไม่มีมือเกาะ มีคุณสมบัติพิเศษคือเมื่อนำมาขยี้กับน้ำแล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เกิดลักษณะเป็นเจลหรือวุ้น เนื่องจากมีเพคตินเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก (สัมภาษณ์ คำผุย, 2533; เทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอกาส และคณะ, 2545 ; พิเชษฐ เทปารุง, 2546) การกระจายพันธุ์ในประเทศไทยพบที่สามารถพบอยู่ทั่วไปแทบทุกภาคของประเทศโดยเฉพาะภาคตะวันออก เชียงเหนือ นอกจากนี้พบที่มีการกระจายพันธุ์ที่ประเทศอินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย แอฟริกา และอเมริกา สภาพที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ ริมแม่น้ำลำธาร ในป่าผลัดใบ ตั้งแต่พื้นที่ราบระดับน้ำทะเลจนถึงพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,100 เมตร (ราชบัณฑิตยสถาน, 2538; พิเชษฐ เทปารุง, 2546; กษพรธม วงศ์เจริญ, 2548) มีอนุกรมวิธานดังนี้ (สัมภาษณ์ คำผุย, 2533)

Kingdom	Plantae
Division	Anthophyta
Class	Dicotyledonae
Order	Ranales
Family	Menispermaceae
Genus	<i>Cissampelos</i>
Species	<i>pareira</i>



รูปที่ 2.14 กรุงเขมา

ที่มา : <http://thrai.sci.ku.ac.th/node/879>

2.13.2 ลักษณะพฤกษศาสตร์

สัมภานนท์ คำสุข (2533); กชพรรณ วงศ์เจริญ (2548); Francis (2004) ได้รายงานลักษณะของกรงเขมาไว้ดังนี้

ราก เป็นรากที่มีลักษณะอวบใหญ่ สีน้ำตาล มีหน้าที่สะสมอาหาร

ใบ มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปกลม รูปหัวใจหรือรูปไต กั้นปิด ใบกว้าง 5.6-6.6 เซนติเมตร ยาว 6.9-7.6 เซนติเมตร ปลายแหลมหรือเป็นติ่งหนาม โคนมน ตัดหรือ เว้าเล็กน้อย หน้าใบและหลังใบมีขนสีน้ำตาลยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ปกคลุมหนาแน่น หลังใบมีขนปกคลุมหนาแน่นมากกว่าหน้าใบ ก้านใบมีขน ก้านใบยาวประมาณ 1.7-2.5 เซนติเมตร เมื่อยังอ่อนมีขนอ่อนนุ่มหนาแน่นทั้ง 2 ด้าน และตามขอบใบ แต่จะร่วงไปเมื่อใบแก่

ดอก มีขนาดเล็กแยกเพศเป็นดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ต่างต้น มีสีเขี้ยวอม เหลืองหรือเหลืองอ่อน ดอกเพศผู้ออกเป็นช่อกระจุกที่ง่ามใบ ช่อดอกยาวประมาณ 2.0-8.5 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยง กลีบดอก 4 กลีบ โคนติดกันเป็นรูปถ้วย ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยง ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของกลีบเลี้ยงเกสรเพศผู้ มีดัดเดี่ยวยาวกว่ากลีบเลี้ยง อับเรณูติดกันเป็นรูปจาน ดอกเพศเมียออกเป็นช่อที่ง่ามใบ ช่อดอกยาวประมาณ 10-18 เซนติเมตร ก้านดอกสั้นมาก ใบประดับรูปกลม หรือรูปไต ซ้อนเหลื่อมกันแน่นไม่ร่วง ปลายเป็นติ่งหนาม มีขน กลีบเลี้ยง 1 กลีบ รูปขอบขนานแกมรูปไข่ กลีบดอก 1 กลีบ ออกตรงข้ามกับกลีบเลี้ยง และสั้นกว่า

ผล ผลสดเป็นแบบ drupe ค่อนข้างกลม เมื่อสุกจะมีสีแดง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.2 เซนติเมตร มีขน

เมล็ด เป็นเมล็ดเดี่ยว เล็ก แข็ง รูปโค้ง หรือเป็นรูปเกือบกลม ผิวขรุขระ

2.13.3 การใช้ประโยชน์จากกรงเขมา

สรรพคุณของกรงเขมาในตำรายาไทยมีมากมาย เนื่องจากทุกส่วนของกรงเขมาสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคและช่วยบำรุงร่างกาย ได้แก่

ราก สรรพคุณในการแก้ไข้ แก้ดีริ้ว ดีช่าน เป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงอวัยวะเพศให้แข็งแรง แก้ลม โลหิต กำเดา แก้โรคตา ขับปัสสาวะ แก้อาการบวม น้ำ แก้ทางเดินปัสสาวะอักเสบกระเพาะปัสสาวะอักเสบ แก้กระหายน้ำ แก้จ้ำใน แก้ปวดท้อง แก้โรคฝีดาษ บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย เป็นยาระบาย แก้ท้องร่วง ในรากมีสารสำคัญพวกอัลคาลอยด์ในปริมาณสูง (พยอม ต้นติ้วฉิม, 2521; วุฒิ ธรรมเวช, 2540)

เถา สรรพคุณในการขับพิษไข้ทุกชนิด บำรุงโลหิตสตรีให้สมบูรณ์ แก่ระดูพิการ

ใบ สรรพคุณในการใช้ทาแก้โรคผิวหนัง แก้หิด รักษางูกัด พอกแผลฝี แก่ร้อนใน ใบจะมีสารพวกเพคติน (พยอม ต้นติ้วฉิม, 2521; ชยันต์ พิเชียรสุทนต์ และคณะ, 2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนั้นมีการนำใบกรงเขมามาบริโภค โดยนำใบที่เจริญเต็มที่มาช้ำกับน้ำสะอาด กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวขึ้น แล้วปล่อยให้เกิดเจลหรือที่เรียกว่า ฐุ่น หนามน้อยจึงนำมา รับประทาน (จรัสศักดิ์ ศรีสมศักดิ์ และ ธนากร อัมมะเทา, 2543)

2.13.4 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการสกัดเพคตินจากใบกรงเขมา

ศิริวรรณ ศรีสรณ์ตร และคณะ (2532) ได้ศึกษาวิธีการสกัดเพคตินจากใบหนามน้อย และ ใบบัวโคก โดยวิธีการต้มสกัดกับน้ำโดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักสดต่อน้ำ 1: 80 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที พบว่าเพคตินที่สกัดได้จากใบสดและใบแห้งได้ปริมาณไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบเป็นน้ำหนักแห้ง โดยใบหนามน้อยและใบบัวโคกได้ปริมาณเพคตินร้อยละ 27.80 และ 9.13 ตามลำดับ

สัมพันธ์ คำสุข (2533) ศึกษาการสกัดเพคตินจากใบหนามน้อย พบว่าปริมาณสาร เพคตินที่สกัดได้จากใบสดและใบแห้งของต้นหนามน้อยมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยได้ปริมาณเพคติน 2.576 กรัมต่อใบหนามน้อย 10 กรัม

เทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอกาส และคณะ (2545) โดยศึกษาวิเคราะห์ปริมาณเพคตินจาก ใบหนามน้อยด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี โดยปริมาณเพคตินที่วิเคราะห์ได้ปริมาณเฉลี่ย 0.25 กรัม ต่อน้ำหนักใบหนามน้อย 1 กรัม

พิเชษฐ เทบารุง (2546) ศึกษาหาปริมาณและคุณภาพของเพคตินจากใบหนามน้อย ทำ การสกัดแบบร้อนด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล และสารละลาย โซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.1 สภาวะที่ใช้การสกัดคืออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที พบว่าการใช้สารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.1 ทำให้ได้ ปริมาณเพคตินมากที่สุดเนื่องจากเป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพโดยจะไปไฮโดรไลส์โปรตีนเพคตินให้ เป็นเพคตินที่ละลายน้ำได้ และพบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่นได้เพคตินมีคุณภาพมากที่สุดโดยคุณภาพ ของเพคตินวัดจากปริมาณเมทิลเอสเทอร์ และกรดกาแลคทูโรนิกในเพคติน และพบว่าเพคตินที่ สกัดจากใบหนามน้อยเป็นเพคตินชนิดที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำ

จิราภรณ์ สังข์ผุด (2549) ศึกษาการผลิตเพคตินผงจากกรงเขมาด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือน้ำกลั่น และกรดซิตริกร้อยละ 7 ใช้อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย 1:40 พบว่าสภาวะที่ เหมาะสมในการผลิตเพคตินประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ สกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ฟอกสีด้วยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 0.2 ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนด้วย แอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 จากนั้นอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณ เพคตินเท่ากับร้อยละ 21.65±0.18 และ 48.48±0.35 (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับพบว่าการสกัดด้วยน้ำ กลั่น มีปริมาณกรดกาแลคทูโรนิกสูงสุด (ร้อยละ 76.45±0.13) มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 8.08 จัด อยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำ

น้ำทิพย์ นาเชียงใต้ และชวภา ทศบุตร (2550) ศึกษาผลของ พีเอช และอุณหภูมิต่อคุณภาพของเพคตินที่สกัดได้จากใบหมาน้อย พีเอชและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ พีเอช 2, 4 และ 6 อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสได้ปริมาณเพคตินมากกว่าที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพบว่าการสกัดที่ พีเอช 2 มีปริมาณได้น้อยที่สุดส่งผลให้เพคตินที่สกัดได้มีการละลายน้ำได้ง่าย พบว่า พีเอช มีผลต่อเวลาการเกิดเจลของเพคติน การสกัดที่พีเอช 6 เพคตินจะเกิดเจลได้เร็วและเจลที่ได้มีลักษณะอ่อนนุ่ม แต่การสกัดที่ พีเอช 2 จะเกิดเจลได้ช้าแต่เจลมีความแข็งแรงกว่า ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีของเพคติน

Singthonga (2005) ศึกษาการสกัดเพคตินและลักษณะทางกายภาพของเพคตินจากเครือหมาน้อย สกัดด้วยน้ำกลั่นใช้อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย 1 : 40 อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส พีเอช ธรรมชาติ (3.8-4.0) พบว่าเพคตินที่สกัดจากเครือหมาน้อยเป็นชนิดที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำ และมีกรดกาแลกทูโลนิคเป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 70-75)

2.14 เวย์ (whey)

เวย์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็งหรือการแยกเคซีนจากนมสด เวย์มีลักษณะเป็นของเหลวใสมีสีค่อนข้างเขียวอมเหลือง (Marshall, 1982) องค์ประกอบของเวย์โดยทั่วไปพบวาประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตสร้อยละ 4-5 โปรตีนร้อยละ 1 และเกลือแร่ร้อยละ 1 (Roukas และคณะ, 1998)

2.14.1 ประเภทของเวย์

เวย์แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามความเป็นกรด (Titable acidity) ได้แก่

2.14.1.1 สวีทเวย์ (Sweet whey) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งชนิดแข็ง เช่น เชดดา (Cheddar cheese) เกาดา (Gouda cheese) สวิส (Swiss cheese) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.10-0.20 และมีค่าพีเอชระหว่าง 5.8-6.1

2.14.1.2 แอซิดเวย์ (Acid whey) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนนม โดยการเติมกรดหรือเกลือแร่ลงไปโดยตรงในการผลิตเนยแข็งชนิดอ่อน เช่น คอทเทจ (Cottage) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.40-0.60 และมีค่าพีเอชระหว่าง 4.0-5.0 (Kosikowski, 1977) สรุปองค์ประกอบที่แตกต่างของเวย์ทั้งสองชนิดดังตารางที่ 2.4

2.14.2.2 โปรตีน โปรตีนในเวย์เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนในน้ำนมซึ่งเป็นโปรตีนตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง โปรตีนในเวย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ เบตาแลคโตโกลบูลิน (β -lactoglobulin) และแอลฟาแลคทอลบูมิน (α -lactalbumin) โดยเบตาแลคโตโกลบูลินจะมีอยู่ประมาณร้อยละ 50-60 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือเจือจาง สามารถตกตะกอนได้ด้วยเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตและเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในแง่การให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลว (วรรณ ตังเจริญชัย, 2532) ส่วนแอลฟาแลคทอลบูมิน มีอยู่ประมาณร้อยละ 15-20 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนได้เมื่อถูกความร้อน ส่วนที่เหลือ คือ ซีรัมอัลบูมิน อิมมูโนโกลบูลิน เอนไซม์ต่างๆ และโปรตีนอื่นๆ

2.14.3 การใช้ประโยชน์จากเวย์

ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง พบว่าจะมีน้ำเวย์ซึ่งเป็นผลพลอยจากการผลิตนั้นเป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปเวย์จะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง ถ้าเปรียบเทียบค่า BOD ระหว่างน้ำเสียที่ปล่อยลงแม่น้ำลำคลองควรบำบัดน้ำจมน้ำมีค่า BOD เหลือประมาณ 20 แต่เวย์มีค่า BOD อยู่ระหว่าง 4000-4800 ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม (Scott, 1986) ดังนั้นการนำน้ำเวย์ที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งมาใช้ประโยชน์จึงน่าจะเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มคุณค่าให้กับน้ำเวย์และลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียได้ ดังนั้นนักวิจัยจึงได้ศึกษาหาทางนำเวย์มาใช้ประโยชน์มีรายงานดังนี้

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาการนำเวย์มาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. delbrueckii* โดยเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรที่ช่วงเวลาที่ 36 และยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร พบว่ากรดแลคติกที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างได้คือ 40 กรัมต่อลิตร ภายใน 84 ชั่วโมง

Bogdanova (1974) ได้ศึกษาการนำเวย์มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโดยการนำเวย์มาพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 95-97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหมักเหวี่ยงเอาเฉพาะส่วนในสมาเติมหัวเชื้อ *L. acidophilus* และเติมเชื้อยีสต์ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 30-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

Fitzpatrick และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *L. casei* โดยเติมยีสต์สกัด มอลต์ และถั่ว เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *L. casei* พบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 94.37) ให้เป็นกรดแลคติก (32.95 กรัมต่อลิตร)

2.15 การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Methodology)

การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Methodology ; RSM) เป็นเทคนิคทางสถิติเพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลลัพธ์ (Response Variable) หรือ ตัวแปรตาม (Dependent Variable) และเซตของปัจจัยหรือตัวแปรอิสระ (Independent Variable) ที่เป็นตัวแปรเชิงปริมาณ วิธีนี้จะนำมาใช้หลังจากที่ผู้ทดลองทราบแล้วว่าปัจจัยใดบ้างที่มีความสำคัญในกระบวนการผลิต และต้องการทราบว่าระดับของปัจจัยเหล่านี้ระดับใดที่จะทำให้เกิดผลผลิตสูงสุด หรือในระดับที่น่าพอใจ แผนการทดลองนี้ใช้เมื่อผู้ทดลองคาดว่ารูปแบบความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นโค้ง (มาริษา ไชยโอสถ, 2549)

วัตถุประสงค์ในการใช้ Response Surface Methodology

1. เพื่อหาระดับของปัจจัยที่ทำให้ได้ผลผลิตสูงสุด
2. เพื่อหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสมกับข้อจำกัดของกระบวนการผลิต
3. เพื่อหาเงื่อนไขของการผลิตใหม่ที่สามารถใช้ในการพัฒนาคุณภาพของการผลิตจากระดับเดิม

4. หาสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเชิงปริมาณและผลผลิต

ขั้นตอนของ Response Surface Methodology

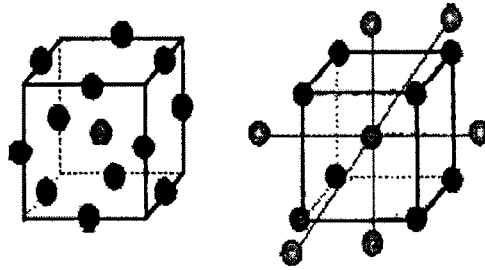
1. เลือกแผนการทดลอง Response Surface Methodology สำหรับการทดลอง ยกตัวอย่างเช่น Central Composite Design หรือ Box Behnken Design
2. สร้างแผนการทดลอง Response Surface
3. ทำการทดลองตามแผนที่สร้างไว้
4. สร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและผลลัพธ์ และวิเคราะห์ความเหมาะสมของสมการ
5. สร้าง Contour Plot และ Surface Plot เพื่อจุดที่ดีที่สุดของผลลัพธ์
6. หาค่าระดับของปัจจัยที่ให้ผลลัพธ์ดีที่สุด

2.16 การวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

การออกแบบการทดลองด้วยวิธี full fractional factorial โดยอาศัยค่ากลางของข้อมูลจากระดับปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าตอบสนองสูงสุดในอันดับต้นๆ ที่ได้รับความนิยมมีอยู่ 2 วิธีคือ Central composite Design (CCD) กับ Box-Behnken Design (BBD) โดยใช้การกระจายระดับของข้อมูลออกสู่ศูนย์กลางเพื่อศึกษาระดับของปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าตอบสนองสูงสุด ลักษณะการวางตำแหน่งการกระจายระดับของปัจจัยแสดงในรูปที่ 2.15 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการออกแบบการทดลองแบบ BBD จะเน้นที่จุดรอบๆ ค่ากลางโดยไม่รวมค่าการกระจายในระดับแกน (axial point) และค่าที่มุม (factorial

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

point) ทำให้ค่าที่ได้ไม่ครอบคลุมปลายสุดของระดับปัจจัยดังนั้นการออกแบบการทดลองแบบ CCD จึงได้รับความนิยมมากกว่า (Montgomery, 2001)



รูปที่ 2.16 การกระจายของปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken Design (ซ้าย) และ Central composite Design (ขวา)

ที่มา : Draper (1988)

การกำหนดค่ารหัส (code value) ของระดับปัจจัยให้ 0 แทนค่ากลาง (center point) ซึ่งในการทดลองทั่วไปนิยมทำค่ากลางไว้หลายจุดเพื่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองในการประมวลผลทางสถิติน้อยที่สุด ถ้าการทดลองที่ 2 ปัจจัยจะมีจำนวนการทดลองเป็น 2^k คือ 4 ในแต่ละชนิดของปัจจัยค่ามุม (factorial point) จะมีอยู่ 4 จุดให้ค่าเป็น +1 สำหรับค่าสูงและ -1 สำหรับค่าต่ำ และค่าแกน (axial point) จะมีอยู่ 4 จุดให้ค่าเป็น $+\alpha$ และ $-\alpha$ แทนค่าสูงและต่ำตามลำดับ โดยค่า α สามารถหาได้จากรากที่ 4 ของ 2^k เมื่อ k คือจำนวนปัจจัยที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 2.5 โดยค่า α ที่ได้จะต้องนำไปคูณกับค่าคงที่ของความกว้างช่วงการแปรของระดับปัจจัยดังนั้นการออกแบบการทดลองแบบ CCD จึงมี 5 ระดับคือ $+\alpha$, $+1$, 0 , -1 และ $-\alpha$ ตามลำดับจากมากไปน้อย

ตารางที่ 2.5 ค่าแอลฟาที่ใช้ในจำนวนการทดลอง

จำนวนการทดลอง	2	3	4	5	6
ค่า α	1.414	1.682	2.000	2.378	2.828

ที่มา : Draper (1988)

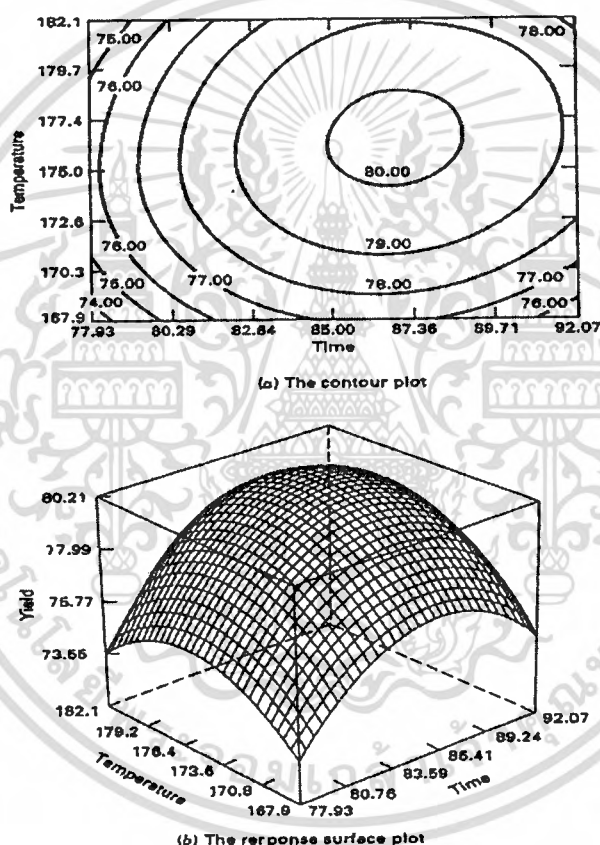
การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติใช้วิธี Response surface methodology (RSM) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่จะศึกษากับค่าตอบสนองที่สนใจเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโดยใช้การวิเคราะห์แบบ Multiple regression analysis ซึ่งหากตัวแปรใดที่มีผลต่อค่าตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตัวแปรนั้นจะปรากฏในสมการอันดับสอง (Second order model) ในสมการที่ 1 มีลักษณะเส้นกราฟเป็นเส้นโค้ง (Montgomery, 2001) ทำการประมวลผลทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สร้างกราฟรูปร่าง (contour plot) และกราฟพื้นผิว (surface plot) ในรูปที่ 2.17 เพื่อช่วยในการประมวลผลระหว่างปัจจัยร่วม

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \dots\dots\dots(2.1)$$

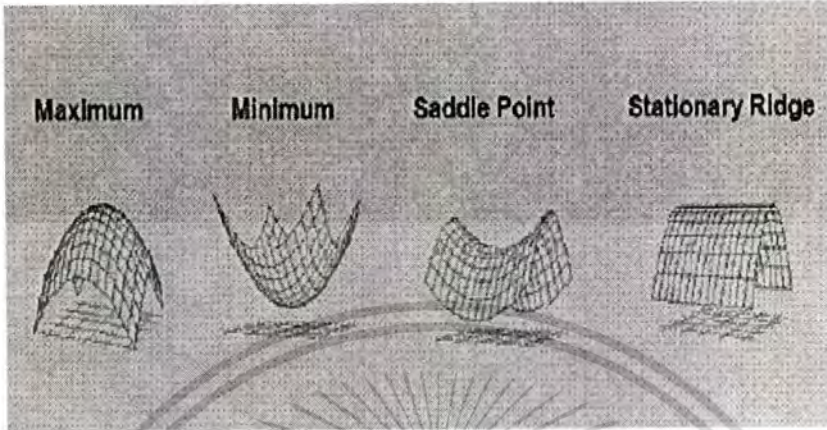
จากสมการที่ 2.1 กำหนดให้ตัวแปร y คือค่าตอบสนอง β คือค่าสัมประสิทธิ์ x คือชนิดของปัจจัย k คือจำนวนปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง ϵ คือค่าผิดพลาดจากปัจจัยภายนอก และ i, j เป็นจำนวนเต็มใดๆ



รูปที่ 2.17 ตัวอย่างผลการทดลอง contour plot (a) และ surface plot (b) ที่มา : Montgomery (2001)

จากรูปที่ 2.17 การแสดงรูปร่าง (contour plot) ที่จุดศูนย์กลางวงกลมเป็นตำแหน่งที่ให้ผลค่าตอบสนองสูงสุดโดยอ้างอิงแกนที่ระดับปัจจัยของอุณหภูมิ 177.4 ฟาเรนไฮต์และเวลาประมาณ 87.36 นาที แต่เมื่อพิจารณาแผนภาพพื้นผิว (surface plot) ที่จุดเนินเขาสูงสุดจะให้ผลค่าตอบสนองสูงสุดที่ปริมาณร้อยละ yield 80.21 บนแกนตั้งที่และระดับปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า yield บนแกนนอน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านล่างคืออุณหภูมิและเวลาซึ่งรูปแบบของกราฟพื้นผิวที่มีลักษณะเฉพาะแสดงในรูปที่ 2.17 คือ ค่าสูงสุด (maximum) ค่าต่ำสุด (minimum) แบบอานม้า (saddle point) และแบบระดับปัจจัยหนึ่งคงที่ (stationary ridge) (พิพัฒน์ ไทรทอง, 2548)



รูปที่ 2.18 กราฟพื้นผิวที่มีลักษณะเฉพาะ
ที่มา : Montgomery (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การวิจัย

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท PYREX

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX

กิวเวต (cuvette)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท SHIMADZU

รุ่น C-R7 Ae plus

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

เครื่องเขย่าของ บริษัท Gallenkamp

เครื่องอบร้อนของ บริษัท Binder

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -83 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO รุ่น MDF-U 4086S

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้ป้อนเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina

flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

โถดูดความชื้น

บีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท PYREX

ปิเปตต์ (pipette) ของบริษัท PYREX

ปั๊ม Peristaltic pump ของบริษัท Heidolph รุ่น PD 5201

สายยางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.89 เซนติเมตร ของบริษัท Cole-Parmer

Instrument Company รุ่น Tygon tubing 2-stop

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 สารเคมี

แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3)

แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

เปปโตน (peptone)

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

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

แลคโตส (lactose)

ยีสต์สกัด (yeast extract)

เอริทแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

โซเดียมแอลจีเนต (sodium alginate) ของบริษัท Carlo Erba

เพคตินจากส้ม (citrus pectin) ของบริษัท Sigma

เพคตินจากแอปเปิ้ล (apples pectin) ของบริษัท Fluka

เพคตินเกรดอุตสาหกรรมอาหาร (food grade pectin) ของบริษัท Himedia

3.2 วัตถุดิบ

เวย์ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Minor Cheese Limited 9/1 หมู่ 6 ซอยทรัพย์จำปา ถนนมิตรภาพ ตำบลกลางดง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา 30320

3.2.1 การเก็บวัตถุดิบ

เวย์ที่ใช้ในงานวิจัยจะเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส โดยนำมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งานต่อไป

3.2.2 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

นำเวย์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการแยกโปรตีนออกจากเวย์ ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสของน้ำเวย์ไปใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดแลคติก (ประยุกต์จาก Kassler, 1981 ; ศิริประภา มั่นตรง, 2550)

3.3 การสกัดเพคตินจากใบบรูกงเขมา (ประยุกต์จาก พิเศษฐ เทบ่ารุง, 2546)

ใบบรูกงเขมาใช้ในงานวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร 199 หมู่ 3 ถนนพังโคน-วาริชภูมิ อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร 47160

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างใบบรูกงเขมา

นำใบบรูกงเขมาล้างน้ำให้สะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (blender) แล้วชั่ง 10 กรัม นำมาเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองเอาสารละลายทิ้งไป นำใบบรูกงเขมาที่ได้จากการกรองมาเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาใบบรูกงเขมาแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสให้แห้งสนิท

3.3.2 ขั้นตอนการสกัดเพคตินจากใบบรูกงเขมา

นำใบบรูกงเขมาที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้ว ชั่ง 5 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร นำไปสกัดเพคตินแบบร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นกรองแยกเอากากของใบบรูกงเขมาออกขณะร้อน (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการกรองแยกกากและสารละลายส่วนใสออกจากกันด้วยปั๊มสุญญากาศ

นำสารละลายที่ได้จากการกรอง มาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum evaporator) ให้เหลือ 1 ใน 3 ส่วนของสารละลาย (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการนำสารละลายที่ได้จากการกรอง มาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือสงวนในโอกาสใดก็ตาม ผู้ใดที่นำเอกสารนี้ไปเผยแพร่โดยไม่แจ้งชื่อผู้แต่ง
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำมาตกตะกอนเพคติน โดยเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนของสารละลายเพคตินต่อสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 1 : 2 โดยปริมาตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการตกตะกอนเพคตินด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

ทำการกรองแยกเอาตะกอนเพคติน แล้วล้างตะกอนเพคตินด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 4-5 ครั้ง (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.4 ตะกอนเพคตินที่ได้หลังจากตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

จากนั้นอบตะกอนเพคตินให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดให้ละเอียด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh (รูปที่ 3.5)



รูปที่ 3.5 สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมาบดละเอียดขนาด 100 mesh

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อประโยชน์ส่วนหนึ่ง เหมือนเช่นที่เห็นในข้อนี้ ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 ใช้ลวดเย็บเชื้อแล้วตาก (streak) ลงบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Youssef และคณะ, 2000) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.4.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง

เชื้อแบคทีเรีย *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูกลงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ที่อยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Yoo และคณะ, 1996 ;Senthuran และคณะ, 1997) (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ร้อยละ ปริมาตรแปรผันตามการทดลอง (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีตะกอนเซลล์ เขย่าให้เข้ากันจนเกิดสารแขวนลอยเซลล์ จะได้เชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์อิสระหรือสำหรับเซลล์ตรึง (ประยุกต์จากศิริประภา มั่นตรง, 2550)

3.5 อาหารสำหรับการผลิตกรดแลคติก

น้ำเวย์ที่เป็นของเหลวที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาเติมด้วยสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร ไคโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.10 กรัมต่อลิตร และ แคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 (ศิริประภา มั่นตรง, 2550)

อาหารที่ใช้ในอาหารหมักในระดับพลาสติก ปริมาตร 175 มิลลิลิตร (ร้อยละ 70) ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และอาหารที่ใช้ในอาหารหมักในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตร 1400

มิลลิลิตร (Nancib และคณะ, 2001) จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.6 การตรึงเซลล์

3.6.1 การตรึงเซลล์ด้วยเพคติน

การตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา เพคตินจากส้ม เพคตินจากแอปเปิล และเพคตินเกรดอุตสาหกรรมอาหาร (ซึ่งเป็นเพคตินชนิดเมทิลเฮสเทอร์ต่ำ) ความเข้มข้นแปรผันตามการทดลอง จากนั้นเตรียมเพคตินให้อยู่ในรูปโพแทสเซียมเพคเตตโดยทำปฏิกิริยา de-esterification ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับหัวเชื้อเริ่มต้น จากนั้นหยดสารผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร (ประยุกต์จาก Smogrovicova และ Domeny, 1999; Navratil และคณะ, 2001) ผ่านปั๊ม (peristaltic pump) โดยใช้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของสายยางซิลิโคนแปรผันตามการทดลอง นำเม็ดเจลบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างแคลเซียมไอออนที่มากเกินไปและตัวเซลล์ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้ม จะได้เม็ดเจลเซลล์ตรึงที่ได้ไปใช้ในการผลิตกรดแลคติก

3.6.2 การตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมแอลจิเนต

นำโซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 (Idris และ Suzana, 2006; ศิริประภา มั่นตรง, 2550) ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วผสมกับหัวเชื้อเริ่มต้น จากนั้นหยดสารผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ผ่านปั๊ม (peristaltic pump) โดยใช้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของสายยางซิลิโคนแปรผันตามการทดลอง ทำการตรึงเซลล์ตามวิธีข้างต้น

3.7 การศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ในระดับฟลาस्क

การศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกด้วย เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ความเข้มข้นร้อยละ 5 น้ำหนักต่อปริมาตร (Smogrovicova และ Domeny, 1999; Navratil และคณะ, 2001) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของสายยาง 0.89 มิลลิเมตร (ศิริประภา มั่นตรง, 2550) โดยใช้เชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 ปริมาตรต่อปริมาตร (ศิริประภา มั่นตรง, 2550) หมักในอาหารเวย์ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Dembczynski และ

Jankowski, 2002) ที่สภาวะนี้เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างตาม ข้อ 3.12

3.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาस्क

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 โดยการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล ซึ่งตัวแปรที่เลือกศึกษามีจำนวน 3 ตัวแปร ได้แก่ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา (ร้อยละ 3, 4 และ 5 น้ำหนักต่อปริมาตร) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของสายยาง (0.89, 1.52 และ 2.02 มิลลิเมตร) และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ 3, 5 และ 7 ปริมาตรต่อปริมาตร) ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาหมักในอาหารเวย์ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างตามข้อ 3.12

ตารางที่ 3.1 แสดงการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์โดยการวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3

ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคติน จากใบกรูงเขมา (ร้อยละ) (A)	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ) (B)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของสายยาง (มิลลิเมตร) (C)		
		0.89 (c ₁)	1.52 (c ₂)	2.02 (c ₃)
3 (a ₁)	3 (b ₁)	a ₁ b ₁ c ₁	a ₁ b ₁ c ₂	a ₁ b ₁ c ₃
	5 (b ₂)	a ₁ b ₂ c ₁	a ₁ b ₂ c ₂	a ₁ b ₂ c ₃
	7 (b ₃)	a ₁ b ₃ c ₁	a ₁ b ₃ c ₂	a ₁ b ₃ c ₃
4 (a ₂)	3 (b ₁)	a ₂ b ₁ c ₁	a ₂ b ₁ c ₂	a ₂ b ₁ c ₃
	5 (b ₂)	a ₂ b ₂ c ₁	a ₂ b ₂ c ₂	a ₂ b ₂ c ₃
	7 (b ₃)	a ₂ b ₃ c ₁	a ₂ b ₃ c ₂	a ₂ b ₃ c ₃
5 (a ₃)	3 (b ₁)	a ₃ b ₁ c ₁	a ₃ b ₁ c ₂	a ₃ b ₁ c ₃
	5 (b ₂)	a ₃ b ₂ c ₁	a ₃ b ₂ c ₂	a ₃ b ₂ c ₃
	7 (b ₃)	a ₃ b ₃ c ₁	a ₃ b ₃ c ₂	a ₃ b ₃ c ₃

3.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกในการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาในระดับฟลาस्क

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ

L. delbrueckii TISTR 1339 โดยการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ใดเห็นาเบ้ใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) โดยมีค่าตอบสนอง (Response ; Y) คือปริมาณกรดแลกติก ซึ่งตัวแปรที่เลือกศึกษามีจำนวน 3 ตัวแปร ได้แก่ ค่าพีเอช เริ่มต้น อุณหภูมิ และอัตราการเขย่า โดยศึกษาปัจจัยตัวแปรอิสระ 5 ระดับ ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 20 การทดลอง ประกอบด้วย จุดกึ่งกลาง(center point) จำนวน 6 จุด จุดขอบ (axial point) 6 จุด และจุดมุม (factorial point) 8 จุด ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และการออกแบบการทดลองแสดงในตารางที่ 3.3

จากการออกแบบแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (dependent variable) คือ ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ และอัตราการเขย่า ความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (dependent variable) ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ดังสมการ (3.1)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_1 x_2 + \beta_5 x_1 x_3 + \beta_6 x_2 x_3 + \beta_7 x_1^2 + \beta_8 x_2^2 + \beta_9 x_3^2 \dots \dots \dots (3.1)$$

โดยที่

Y = ปริมาณกรดแลกติก

X_1 = ค่าพีเอชเริ่มต้น

X_2 = อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)

X_3 = อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)

β = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficients)

ตารางที่ 3.2 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรอิสระทั้ง 5 ระดับตามแผนการทดลองแบบ CCD

ตัวแปรอิสระ	สัญลักษณ์	รหัส (code factor)				
		-1.682	-1	0	+1	+1.682
ค่าพีเอชเริ่มต้น	X_1	4.82	5.5	6.5	7.5	8.18
อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	X_2	31.96	34	37	40	42.04
อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)	X_3	16	50	100	150	184

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์จากแผนการทดลองแบบ CCD

สภาวะ (treatment)	ค่าของรหัส (Coded value)			ค่าตามความเป็นจริง (Actual value)		
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1	5.5	34	50
2	-1	-1	+1	5.5	34	150
3	-1	+1	-1	5.5	40	50
4	-1	+1	+1	5.5	40	150
5	+1	-1	-1	7.5	34	50
6	+1	-1	+1	7.5	34	150
7	+1	+1	-1	7.5	40	50
8	+1	+1	+1	7.5	40	150
9	-1.682	0	0	4.82	37	100
10	+1.682	0	0	8.18	37	100
11	0	-1.682	0	6.5	31.96	100
12	0	+1.682	0	6.5	42.04	100
13	0	0	-1.682	6.5	37	16
14	0	0	+1.682	6.5	37	184
15	0	0	0	6.5	37	100
16	0	0	0	6.5	37	100
17	0	0	0	6.5	37	100
18	0	0	0	6.5	37	100
19	0	0	0	6.5	37	100
20	0	0	0	6.5	37	100

3.10 การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา โดยเปรียบเทียบกับเพคตินทางการค้าและโซเดียมแอลจีเนตในระดับฟลาสก์

ศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา โดยเปรียบเทียบกับ เพคตินทางการค้าจากส้ม เพคตินจากแอปเปิล เพคตินเกรคูดสาหร่ายธรรมชาติ ความเข้มข้น ร้อยละ 5 น้ำหนักต่อปริมาตร (Smogrovicova และ Domeny, 1999 ; Rosenberg และคณะ, 1999 ;

Navratil และคณะ, 2001) และโซเดียมแอลจีเนตความเข้มข้น ร้อยละ 2 น้ำหนักต่อปริมาตร (Idris เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ Suzana, 2006 ; ศิริประภา มั่นตรง, 2550) ทำการตรึง โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการตรึง เซลล์จากการทดลองข้อ 3.8 จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาหมักในอาหารเวทย์ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากการทดลองตามข้อ 3.9 เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างตามข้อ 3.12

3.11 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูเซมา ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.11.1 การศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูเซมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูเซมาในถังหมัก โดยแปรผันอัตราการกวน 50, 100, 120 และ 150 รอบต่อนาที นำเซลล์ตรึงมาหมักในอาหารเวทย์ปริมาตร 1400 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.9 เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างตามข้อ 3.12

3.11.2 การศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูเซมาโดยการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อผลิตกรดแลกติก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูเซมา โดยนำเซลล์ตรึงมาหมักในอาหารเวทย์ปริมาตร 1400 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.11.1 เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จนถึงระยะที่ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด วิเคราะห์ตัวอย่างตามข้อ 3.12 จากนั้นทำการถ่ายน้ำหมักออก และล้างเซลล์ตรึงด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำอาหารเวทย์ใหม่ปลอดเชื้อเดิมลงในถังหมักปริมาตร 1400 มิลลิลิตร ทำซ้ำจนกระทั่งปริมาณกรดแลกติกลดลง บันทึกจำนวนครั้งของการหมักแบบกะในรูปของปริมาณกรดแลกติกที่เซลล์ตรึงสามารถผลิตได้

3.12 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำน้ำหมักมาวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลแลคโตสที่เหลือ และวัดค่าพีเอช โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC (high-performance liquid chromatography) ใช้คอลัมน์ Inertsil C8-3 โดยมีกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (ประยุกต์จากญานี สีตะนันท์, 2541) และวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสที่เหลือด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก ตามวิธีของ Dobois, 1956 และวิเคราะห์ลักษณะทาง

ภาพของเม็ดเคลือบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(Scanning Electron Microscope; SEM)

3.13 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิจัยหัวข้อ 3.7, 3.10 และ 3.11.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17

การวิจัยหัวข้อ 3.8 วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17

การวิจัยหัวข้อ 3.9 วางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17 เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างตัวแปรที่ศึกษาโดยสร้างสมการถดถอย และสร้างกราฟ 3 มิติ โดยใช้โปรแกรม STATISTICA 7 เพื่อหาจุดสูงสุดของกราฟในการทำนายสถานะที่เหมาะสมต่อการทดลอง

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

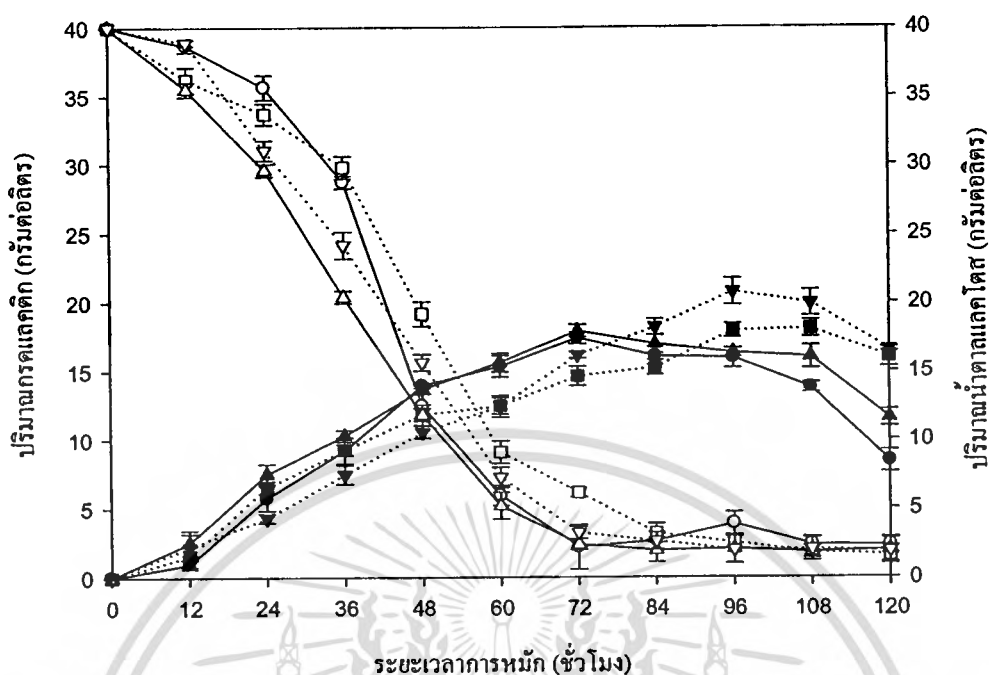
4.1 ผลการศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกระหว่างเชลล์อิสระและเชลล์ตรึงของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ในระดับฟลาสก์

จากการศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกด้วยเชลล์อิสระและเชลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมา (ร้อยละ 5 น้ำหนักต่อปริมาตร, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 0.89 มิลลิเมตร) โดยใช้เชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 (หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 ปริมาตรต่อปริมาตร) มาหมักในอาหารเวย์ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง (Dembczynski และ Jankowski, 2002) เก็บน้ำหนักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แสดงผลการทดลอง ดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้โดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ที่อยู่ในรูปเชลล์อิสระและเชลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

สภาวะ	ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ (ร้อยละ)
เชลล์อิสระเชื้อ <i>L. casei</i>	72	17.93±0.45 ^b	0.249±0.01 ^a	0.476±0.02 ^b	94.12±0.95 ^a
เชลล์อิสระเชื้อ <i>L. delbrueckii</i>	72	17.40±0.43 ^b	0.242±0.01 ^a	0.461±0.03 ^b	94.58±4.03 ^a
เชลล์ตรึงเชื้อ <i>L. casei</i>	96	20.76±0.97 ^a	0.216±0.01 ^b	0.547±0.04 ^a	95.10±2.48 ^a
เชลล์ตรึงเชื้อ <i>L. delbrueckii</i>	108	18.09±0.62 ^b	0.168±0.01 ^c	0.474±0.02 ^b	95.48±1.03 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบ เพคตินจากใบกรูงเขมา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

- (●) กรดแลคติก, (○) น้ำตาลแลคโตส ของเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระ
 (■) กรดแลคติก, (□) น้ำตาลแลคโตส ของเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึง
 (▲) กรดแลคติก, (△) น้ำตาลแลคโตส ของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระ
 (▼) กรดแลคติก, (▽) น้ำตาลแลคโตสของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึง

จากตารางที่ 4.1 พบว่าเซลล์ตรึงเชื้อ *L. casei* TISTR 108 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุด รองลงมาคือ เซลล์ตรึงเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 เซลล์อิสระเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ เซลล์อิสระเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ซึ่งได้กรดแลคติกเท่ากับ 20.76, 18.09, 17.93 และ 17.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าเซลล์ตรึงเชื้อ *L. casei* TISTR 108 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่เซลล์ตรึงเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 เซลล์อิสระเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และเซลล์อิสระเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 พบว่าเซลล์ตรึงสามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าเซลล์อิสระเท่ากับ 20.76, 17.93 กรัมต่อลิตร และมีผลได้มากกว่าเซลล์อิสระเท่ากับ 0.547, 0.476 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 72 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ดูแลเห็นใบเซอร์ประโยชน์ตนการค่า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตพบว่าเซลล์อิสระมีค่ากว่าเซลล์ตรึงเท่ากับ 0.249 และ 0.216 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 พบว่าเซลล์ตรึงสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากกว่าเซลล์อิสระมีค่าเท่ากับ 18.09, 17.40 กรัมต่อลิตร และมีผลได้มากกว่าเซลล์อิสระเท่ากับ 0.474, 0.461 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 72 และ 108 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตพบว่าเซลล์อิสระมีค่ากว่าเซลล์ตรึงเท่ากับ 0.242, 0.168 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาการผลิตกรดแลกติกระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า การใช้เซลล์ตรึงสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่าเซลล์อิสระ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rao และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยการตรึงเซลล์เชื้อ *L. delbrueckii* ด้วยแอลจินตและอนุพันธ์ของแอลจินต คือ succinylated alginate และ palmitoyl alginate พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 63.5, 76.2 และ 80.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระผลิตกรดแลกติกได้เพียง 51 กรัมต่อลิตร Bergmaier และคณะ (2003) เปรียบเทียบการใช้เซลล์ตรึงและเซลล์อิสระโดยเชื้อ *L. rhamnosus* RW-9595M เพื่อผลิต exopolysaccharide พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพ ดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ และสามารถผลิตได้ 1.7 กรัมต่อลิตร Boyaval และ Goulet (1988) ศึกษาสภาวะการผลิตกรดแลกติกจากหางนมที่ได้จากการผลิตเนยแข็งด้วยเซลล์ตรึง *L. helveticus* ในถังหมักแบบ packed bed เมื่อเปรียบเทียบกับระบบเซลล์อิสระ พบว่าระบบเซลล์ตรึงจะมีการผลิตกรดแลกติกดีกว่าระบบเซลล์อิสระ

การที่เซลล์อิสระสามารถผลิตกรดแลกติกได้น้อยกว่าเซลล์ตรึง เนื่องจากเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น การผลิตกรดแลกติกจะมีความเข้มข้นมากขึ้นด้วย ส่งผลให้กรดแลกติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (product inhibition) ทำให้ความสามารถของเชื้อในรูปเซลล์อิสระสามารถผลิตกรดแลกติกได้น้อยลง แต่ในขณะที่เซลล์ตรึงมีสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาเป็นวัสดุตรึงที่ช่วยปกป้องตัวเซลล์จากน้ำหมัก อีกทั้งสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมายังมีคุณสมบัติทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้ดี จึงส่งผลให้สามารถผลิตกรดแลกติกได้เพิ่มขึ้น

การที่เซลล์อิสระมีอัตราการผลิตมากกว่าเซลล์ตรึง เนื่องจากอาหารสามารถส่งผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่าเซลล์ตรึง จึงส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้เร็วและใช้เวลาในการหมักสั้นกว่าเซลล์ตรึง

ดังนั้นการทดลองในขั้นต่อไปจึงเลือกใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ในการผลิตกรดแลกติก

โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ใดเห็นประโยชน์ประการใด
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาเพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาของ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 เพื่อผลิตกรดแลคติก โดยออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3 โดยปัจจัยที่ศึกษาคือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา (ร้อยละ 3, 4 และ 5 น้ำหนักต่อปริมาตร) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง (0.89, 1.52 และ 2.02 มิลลิเมตร) และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ 3, 5 และ 7 ปริมาตรต่อปริมาตร) แสดงผลดังตารางที่ 4.2 และ 4.3 จากนั้นนำข้อมูลของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้สูงสุดของ *L. casei* TISTR (ณ ชั่วโมงที่ 96) และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 (ณ ชั่วโมงที่ 108) มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 17 เพื่อศึกษาว่าแต่ละปัจจัยมีอิทธิพลหรือมีความสัมพันธ์ร่วมกันหรือไม่ ต่อการผลิตกรดแลคติก โดยดูได้จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน แสดงผลดังตารางที่ 4.4 และ 4.6

ตารางที่ 4.2 แสดงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการตรึงเซลล์ในผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 โดยออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3 ณ ชั่วโมงที่ 96

ความเข้มข้นสารสกัด หยาบเพคตินจากใบ กรูงเขมา (ร้อยละ) (A)	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ) (B)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง (มิลลิเมตร) (C)		
		ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)		
		0.89 (c ₁)	1.52 (c ₂)	2.02 (c ₃)
3 (a ₁)	3 (b ₁)	16.28±0.54	15.97±0.65	14.36±0.68
	5 (b ₂)	21.18±0.81	20.03±0.74	18.24±0.4
	7 (b ₃)	23.38±0.69	22.82±0.89	20.07±0.92
4 (a ₂)	3 (b ₁)	19.56±0.56	18.71±0.78	16.95±0.65
	5 (b ₂)	24.96±0.84	25.03±0.36	21.25±0.69
	7 (b ₃)	24.66±0.96	23.29±0.56	22.15±0.79
5 (a ₃)	3 (b ₁)	17.81±0.57	16.62±0.71	15.15±0.68
	5 (b ₂)	22.78±0.35	22.57±0.96	19.96±0.83
	7 (b ₃)	21.31±0.56	21.20±0.44	20.48±0.21

ตารางที่ 4.3 แสดงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการตรึงเซลล์ในผลิตภัณฑ์แลคติกโดยเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 โดยออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3 ณ ชั่วโมงที่ 108

ความเข้มข้นสารสกัด หยาบเพคตินจากใบ กรูงเขมา (ร้อยละ) (A)	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ) (B)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง (มิลลิเมตร) (C)		
		ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)		
		0.89 (c ₁)	1.52 (c ₂)	2.02 (c ₃)
3 (a ₁)	3 (b ₁)	15.41±0.67	14.40±0.59	13.61±0.74
	5 (b ₂)	20.45±0.62	19.27±0.45	17.45±0.74
	7 (b ₃)	20.25±0.69	20.06±0.57	19.05±0.65
4 (a ₂)	3 (b ₁)	18.99±0.47	17.91±0.89	15.98±0.96
	5 (b ₂)	21.35±0.87	21.88±0.75	19.16±0.79
	7 (b ₃)	21.50±0.86	19.42±0.84	18.66±0.47
5 (a ₃)	3 (b ₁)	17.76±0.93	16.39±0.91	14.77±0.68
	5 (b ₂)	20.58±0.85	20.97±0.81	19.77±0.57
	7 (b ₃)	20.32±0.87	21.18±0.68	21.68±0.46

ตารางที่ 4.4 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวน ของการตรึงเซลล์ *L. casei* TISTR 108 เพื่อผลิต
กรดแลคติก โดยออกแบบแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	P value
pectin	107.426	2	53.713	113.563	0.000*
inoculum	477.640	2	238.820	504.925	0.000*
inner diameter	98.493	2	49.246	104.119	0.000*
pectin x inoculum	25.657	4	6.414	13.561	0.000*
pectin x inner diameter	1.841	4	0.460	0.973	0.430
inoculum x inner diameter	4.353	4	1.088	2.301	0.070
pectin x inoculum x inner diameter	8.537	8	1.067	2.256	0.037*

หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรึงเซลล์ *L. casei* TISTR 108 (ตารางที่ 4.4) เพื่อศึกษาอิทธิพลที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก เมื่อพิจารณาอิทธิพลหลักคือ ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วม 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา กับปริมาณเชื้อเริ่มต้น พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง และปริมาณเชื้อเริ่มต้น กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วม 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย มีอิทธิพลหรือมีความสัมพันธ์ร่วมกันต่อการตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดแลกติก ดังนั้นจึงต้องพิจารณาการทดลองทั้งหมดคิดเป็น 27 ทรีทเมนต์หรือ 27 ปัจจัย จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดมาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดแลกติก) แสดงผลดังตารางที่ 4.5 (ซึ่งมีตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับบอกความแตกต่างหรือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการตรึงเซลล์เชื้อ *L. casei* TISTR 108 คือ การตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 1.52 มิลลิเมตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 25.03 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.261 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีผลได้เท่ากับ 0.645 กรัมต่อกรัม และสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ร้อยละ 97.05

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

การทดลองที่	ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา (ร้อยละ)	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง (มิลลิเมตร)	ปริมาณกรดแลคติกของ <i>L. casei</i> (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดแลคติกของ <i>L. delbrueckii</i> (กรัมต่อลิตร)
1	3	3	0.89	16.28±0.54 ^{jk}	15.41±0.67 ^{nop}
2	3	3	1.52	15.97±0.65 ^{jk}	14.40±0.59 ^{pq}
3	3	3	2.02	14.36±0.68 ^l	13.61±0.74 ^q
4	3	5	0.89	21.18±0.81 ^{cde}	20.45±0.62 ^{bcdefg}
5	3	5	1.52	20.03±0.74 ^{def}	19.27±0.45 ^{fghi}
6	3	5	2.02	18.24±0.4 ^h	17.45±0.74 ^{lm}
7	3	7	0.89	23.38±0.69 ^b	20.25±0.69 ^{cdefgh}
8	3	7	1.52	22.82±0.89 ^b	20.06±0.57 ^{defgh}
9	3	7	2.02	20.07±0.92 ^{def}	19.05±0.65 ^{ghijk}
10	4	3	0.89	19.56±0.56 ^{fg}	18.99±0.47 ^{hijk}
11	4	3	1.52	18.71±0.78 ^{gh}	17.91±0.89 ^{ki}
12	4	3	2.02	16.95±0.65 ^{ij}	15.98±0.96 ^{no}
13	4	5	0.89	24.96±0.84 ^a	21.35±0.87 ^{abcd}
14	4	5	1.52	25.03±0.36 ^a	21.88±0.75 ^a
15	4	5	2.02	21.25±0.69 ^{cd}	19.16±0.79 ^{ghij}
16	4	7	0.89	24.66±0.96 ^a	21.50±0.86 ^{abc}
17	4	7	1.52	23.29±0.56 ^b	19.42±0.84 ^{fghi}
18	4	7	2.02	22.15±0.79 ^{bc}	18.66±0.47 ^{ijkl}
19	5	3	0.89	17.81±0.57 ^{hi}	17.76±0.93 ^{kl}
20	5	3	1.52	16.62±0.71 ^j	16.39±0.91 ^{mn}
21	5	3	2.02	15.15±0.68 ^{kl}	14.77±0.68 ^{opq}
22	5	5	0.89	22.78±0.35 ^b	20.58±0.85 ^{bcdef}
23	5	5	1.52	22.57±0.96 ^b	20.97±0.81 ^{abcdc}
24	5	5	2.02	19.96±0.83 ^{cf}	19.77±0.57 ^{cfghi}
25	5	7	0.89	21.31±0.56 ^{cd}	20.32±0.87 ^{bcdefgh}
26	5	7	1.52	21.20±0.44 ^{cde}	21.18±0.68 ^{abcd}
27	5	7	2.02	20.48±0.21 ^{def}	21.68±0.46 ^{ab}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานภายในของภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
 ห้ามเผยแพร่ ตัวย่อภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
 ไม่สามารถใส่เครื่องหมายอื่น ๆ อีกทั้งห้ามมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
 ทางสถิติ (p≤0.05)

ตารางที่ 4.6 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวน ของการตรึงเซลล์ *L. delbrueckii* TISTR 1339 เพื่อผลิตกรดแลคติกโดยออกแบบแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	P value
pectin	45.055	2	22.528	41.842	0.000*
inoculum	292.754	2	146.377	271.878	0.000*
inner diameter	47.414	2	23.707	44.033	0.000*
pectin x inoculum	24.492	4	6.123	11.373	0.000*
pectin x inner diameter	8.234	4	2.059	3.824	0.008*
inoculum x inner diameter	9.734	4	2.434	4.520	0.003*
pectin x inoculum x inner diameter	13.628	8	1.703	3.164	0.005*

หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ของการตรึงเซลล์ *L. delbrueckii* TISTR 1339 (ตารางที่ 4.6) เพื่อศึกษาอิทธิพลที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก เมื่อพิจารณาอิทธิพลหลักคือ ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วม 2 ปัจจัย คือความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา กับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง และปริมาณเชื้อเริ่มต้น กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วม 3 ปัจจัย คือความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย มีอิทธิพลหรือมีความสัมพันธ์ร่วมกันต่อการตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดแลคติก ดังนั้นจึงต้องพิจารณาการทดลองทั้งหมดคิดเป็น 27 ทริทเมนต์หรือ 27 ปัจจัย จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดมาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงผลดังตารางที่ 4.5 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการตรึงเซลล์เชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 คือ การตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 และ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 1.52 มิลลิเมตร สามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 21.88 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.203 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีผลได้เท่ากับ 0.576 กรัมต่อกรัม และสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์เหมือนกัน คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 1.52 มิลลิเมตร

สำหรับผลการศึกษาความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 3, 4 และ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าเมื่อใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาความเข้มข้นร้อยละ 3 เม็ดเจลมีลักษณะเป็นรูปหยดน้ำ (รูปที่ 4.2) และเกิดการแตกได้ง่าย เนื่องจากมีการฟอर्मเจลของแคลเซียมเพคเตตเจลที่ไม่สมบูรณ์ มีผลทำให้เซลล์สามารถรั่วไหลออกจากเม็ดเจลได้ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาสูงกว่าร้อยละ 4 พบว่าเม็ดเจลมีลักษณะเป็นทรงกลม (รูปที่ 4.2) และมีความแข็งแรงขึ้น แต่พบปัญหาเรื่องความสามารถในการแพร่และการกระจายตัวของเซลล์เกิดขึ้น ทำให้เซลล์ภายในเม็ดเจลได้รับอาหารไม่เพียงพอ เนื่องจากการแพร่ผ่านของอาหารเป็นไปได้ยากจึงทำให้ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกลดลง และพบว่าการใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาความเข้มข้นร้อยละ 4 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ และเม็ดเจลมีความคงตัวไม่เปลี่ยนรูปในระหว่างการทดลอง ดังนั้นจึงเหมาะสมต่อการนำมาตรึงเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง Panesar และคณะ (2007) พบว่าการผลิตกรดแลคติกโดยใช้เพคเตตในการตรึงเซลล์ *L. casei* ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2-6 พบว่าการใช้ความเข้มข้นของเพคตินต่ำทำให้เม็ดเจลมีความอ่อนนุ่มเปลี่ยนรูปร่างระหว่างการทดลอง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพคตินสูงขึ้นมีผลทำให้ความสามารถในการใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกได้น้อยลงเนื่องจากถูกขัดขวางด้วยความเข้มข้นของเพคเตตเจลที่เพิ่มขึ้น

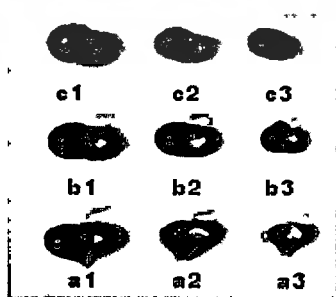
Idris และ Suzuna (2006) ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแอลจินเนตที่ใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแอลจินเนตที่ต่ำกว่าร้อยละ 2 เม็ดเจลมีความอ่อนนุ่มเกิดการแตกได้ง่ายส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียหลุดร่วออกจากเม็ดเจล ขณะที่ใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่าร้อยละ 2 เม็ดเจลมีความแข็งแรงแต่มีผลให้แบคทีเรียได้รับอาหารไม่เพียงพอเนื่องจากการแพร่ของอาหารเข้าสู่เม็ดเจลทำได้ยาก ส่งผลให้สามารถผลิตกรดแลคติกได้ต่ำ

Givry และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเฮมิเซลลูโลสโดยการตรึงเซลล์ *L. bif fermentans* ในแคลเซียมแอลจินเนต พบว่าความเข้มข้นของแอลจินเนตมีผลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยความเข้มข้นของแอลจินเนตที่ต่ำกว่าร้อยละ 1 เม็ดเจลมีความอ่อนนุ่มและเกิดการแตกได้ง่าย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 2 มีปัญหาเกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถได้รับอาหารอย่างเพียงพอ ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตต่ำ

สำหรับผลการศึกษาปริมาณของเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3, 5 และ 7 (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อการเพิ่มการผลิตและ เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นจนถึง

ร้อยละ 5 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด อย่างไรก็ตามพบว่า การเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากกว่า ร้อยละ 5 ไม่ส่งผลให้การผลิตกรดแลคติกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากข้อจำกัด (substrate limitation) เนื่องจากเซลล์ภายในเม็ดยกเกิดการแย่งอาหารเพื่อนำไปใช้สำหรับการเจริญ และการผลิตกรดแลคติก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Panesar และคณะ (2007) ในการศึกษา การผลิตกรดแลคติกโดยใช้แพคเตตในการตรึงเซลล์ *L. casei* โดยศึกษาความเข้มข้นของเซลล์ที่ นำมาตรึงโดยบรรจุชีวมวล 50-125 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) ในสารละลายเพคติน 10 มิลลิลิตร พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตกรดแลคติกได้ด้วยการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของชีวมวล โดยพบว่าที่ ความเข้มข้นของชีวมวล 75 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) สามารถผลิตกรดแลคติกได้ 32.91 กรัมต่อลิตร และพบว่าความเข้มข้นชีวมวลที่สูงขึ้นไม่สามารถการผลิตกรดแลคติกเพิ่มมากขึ้น

สำหรับผลการศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 0.89, 1.52 และ 2.02 มิลลิเมตร ซึ่งขนาดของสายยางมีผลต่อขนาดของเม็ดยก พบว่าการใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายในของสายยาง 2.02 มิลลิเมตร ทำให้เกิดเม็ดยกขนาดใหญ่ (รูปที่ 4.2) ไม่ส่งผลให้การผลิตกรด แลคติกเพิ่มมากขึ้น แต่ในขณะที่การใช้ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยางที่มีขนาดเล็กทำ ให้เกิดเม็ดยกขนาดเล็ก (รูปที่ 4.2) ทำให้เม็ดยกมีพื้นที่ผิวมากขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลของสารอาหาร สามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในเม็ดยกได้เร็วกว่าเม็ดยกที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัย ของ Carrara และ Rubiolo (1994) พบว่าเม็ดยกขนาดเล็กมีพื้นที่ผิวมากมีการยอมให้โมเลกุลของ สารผ่านได้ดี และมีประสิทธิภาพมากกว่าเม็ดยกขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามพบว่า การใช้สายยาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการตรึงเซลล์นานกว่าสายยางขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิลิตร และทำให้เพคตินที่มีความหนืดสูงเกิดการแข็งตัวอุดตันสาย ยางซึ่งเป็นอุปสรรคในการตรึงเซลล์ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (จาก ตารางที่ 4.5 การทดลองที่ 13 และ 14) พบว่าการตรึงเซลล์โดยใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 0.89 และ 1.52 มิลลิลิตร ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร จึงเหมาะสมต่อการตรึงเซลล์เพื่อผลิต กรดแลคติก



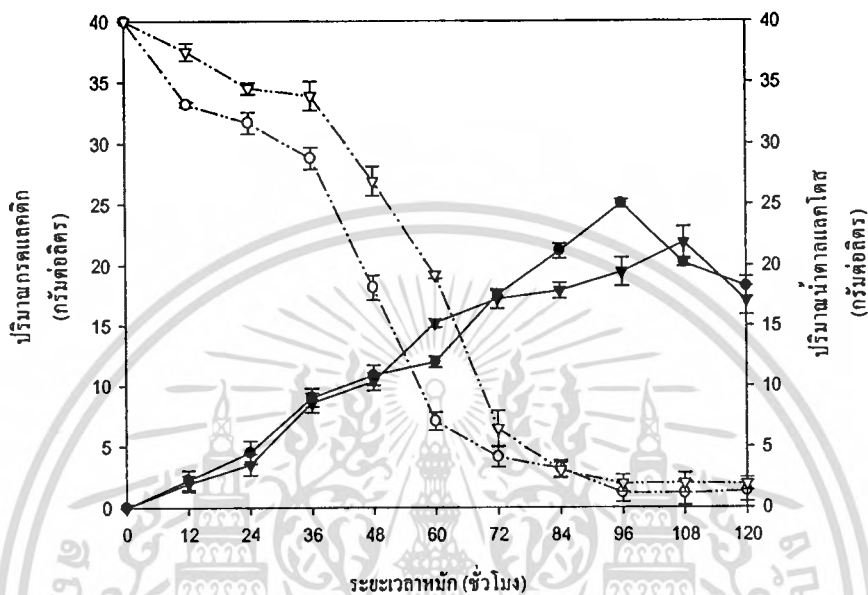
รูปที่ 4.2 แสดงผลการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาที่ความเข้มข้นต่างๆ

(a1-a3 = 3%, b1-b3 = 4% และ c1-c3 = 5%) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง

ที่แตกต่างกัน (a1, b1, c1 = 2.02 มม., a2, b2, c2 = 1.52 มม. และ a3, b3, c3 = 0.89 มม.) การค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาการผลิตกรดแลคติกของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่า เซลล์ตรึง *L. casei* TISTR 108 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่าเซลล์ตรึง *L. delbrueckii* TISTR 1339 เท่ากับ 25.03 และ 21.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.3 ดังนั้นจึงเลือกเซลล์ตรึงของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกต่อไป



รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา (ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 4, ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 และสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.52 มิลลิเมตร)
 (●) กรดแลคติก, (○) น้ำตาลแลคโตส ของเชื้อ *L. casei* TISTR 108
 (▼) กรดแลคติก, (▽) น้ำตาลแลคโตสของเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกในการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในระดับฟลาสก์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 โดยทำการหมักในอาหารเหลวในระดับฟลาสก์ ออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) โดยมีตัวแปรต้นที่เลือกศึกษาจำนวน 3 ตัวแปร คือ ค่าพีเอชเริ่มต้น (X_1), อุณหภูมิ (X_2), อัตราการเขย่า (X_3) และตัวแปรตามหรือค่าตอบสนอง (Response; Y) คือปริมาณกรดแลคติก แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดแลคติกเมื่อหมักในอาหารเวย์ของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 โดยใช้สภาวะที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD (ณ ชั่วโมงที่ 84)

การทดลองที่	ระดับของปัจจัย			รหัสของปัจจัย			ค่าตอบสนองปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)
	พีเอชเริ่มต้น (X_1)	อุณหภูมิ (X_2)	อัตราการเขย่า (X_3)	พีเอชเริ่มต้น (X_1)	อุณหภูมิ (X_2)	อัตราการเขย่า (X_3)	
1	5.5	34	50	-1	-1	-1	14.16±0.74
2	5.5	34	150	-1	-1	+1	26.69±0.65
3	5.5	40	50	-1	+1	-1	16.69±0.55
4	5.5	40	150	-1	+1	+1	27.48±0.81
5	7.5	34	50	+1	-1	-1	11.44±0.89
6	7.5	34	150	+1	-1	+1	22.76±0.56
7	7.5	40	50	+1	+1	-1	12.73±0.56
8	7.5	40	150	+1	+1	+1	19.99±0.70
9	4.82	37	100	-1.682	0	0	11.04±0.99
10	8.18	37	100	+1.682	0	0	4.88±0.58
11	6.5	31.96	100	0	-1.682	0	16.98±0.45
12	6.5	42.04	100	0	+1.682	0	23.26±0.42
13	6.5	37	16	0	0	-1.682	27.03±0.87
14	6.5	37	184	0	0	+1.682	25.21±0.85
15	6.5	37	100	0	0	0	32.76±0.71
16	6.5	37	100	0	0	0	33.01±0.22
17	6.5	37	100	0	0	0	32.49±0.90
18	6.5	37	100	0	0	0	31.82±0.93
19	6.5	37	100	0	0	0	31.91±0.81
20	6.5	37	100	0	0	0	31.31±0.76

หมายเหตุ การทดลองที่ 9 ใช้พีเอชเริ่มต้นจริงเท่ากับ 4.8

การทดลองที่ 10 ใช้พีเอชเริ่มต้นจริงเท่ากับ 8.2

การทดลองที่ 11 ใช้อุณหภูมิจริงเท่ากับ 32

การทดลองที่ 12 ใช้อุณหภูมิจริงเท่ากับ 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองและรหัสของปัจจัยที่ศึกษามาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 17 เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ และอัตราการเข่า โดยสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (regression linear) เพื่อทำนายค่าตอบสนองที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 และทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยพิจารณาค่าความน่าจะเป็น หรือ p-value ของสัมประสิทธิ์แต่ละตัวแปร แสดงในตารางที่ 4.8 ซึ่งพจน์ที่มีความสำคัญต่อค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 นั้น ต้องมีค่า $p \leq 0.05$ ตัวแปรนั้นจึงจะปรากฏในสมการ และตัดตัวแปรที่ไม่มีความสำคัญออก (พิรุฬห์พร ศรีมงคล, 2552)

การสร้างสมการถดถอยและการวิเคราะห์หัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย

การสร้างสมการถดถอยเพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นของปัจจัย สามารถทำได้โดยนำค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (β) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS ไปแทนค่าในสมการที่ 4.1 จะได้สมการถดถอยจากการทดลอง ตามสมการที่ 4.2

จากนั้นพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าความน่าจะเป็น (p-value) ของแต่ละตัวแปร เพื่อหาปัจจัยที่มีอิทธิพลหรือความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษา (ค่าพีเอช, อุณหภูมิ และอัตราการเข่า) กับค่าตอบสนอง (ปริมาณกรดแลคติก) และตัดปัจจัยหรือตัวแปรที่ไม่มีความสัมพันธ์ ซึ่งไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

พิจารณาในส่วนของ Linear Terms พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ผลเชิงเส้นตรงของค่าพีเอช, อุณหภูมิ, และอัตราการเข่า เท่ากับ -2.085, .910 และ 2.843 ตามลำดับ และมีค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.000, 0.050 และ 0.000 ตามลำดับ ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สามารถนำไปใช้ทำนายในสมการถดถอยได้

พิจารณาในส่วนของ Interaction Terms พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ผลเชิงปฏิริยาสัมพันธ์ระหว่าง ค่าพีเอชกับอุณหภูมิ ค่าพีเอชกับอัตราการเข่า และอุณหภูมิกับอัตราการเข่า เท่ากับ 0.600, -0.592 และ -0.724 ตามลำดับ และมีค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.315, 0.322 และ 0.227 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จึงไม่สามารถนำไปใช้ทำนายในสมการถดถอยได้

พิจารณาในส่วนของ Square Terms พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ผลเชิงเส้นโค้งของ ค่าพีเอช, อุณหภูมิ และอัตราการเข่า เท่ากับ -8.199, -3.900 และ -1.779 ตามลำดับ และมีค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.000, 0.000 และ 0.000 ตามลำดับ ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จึงสามารถนำไปใช้ทำนายในสมการถดถอยได้

เมื่อพิจารณาครบทุกส่วนแล้วสามารถเขียนสมการถดถอยได้ใหม่ดังสมการ 4.3 (ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95) ซึ่งเป็นสมการที่ใช้ในการทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ ต่อการผลิตกรดแลคติก

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \dots (4.1)$$

$$Y = 32.159 - 2.085X_1 + 0.910X_2 + 2.843X_3 - 0.600X_1X_2 - 0.592X_1X_3 - 0.724X_2X_3 - 8.199X_1^2 - 3.900X_2^2 - 1.779X_3^2 \dots (4.2)$$

$$Y = 32.159 - 2.085X_1 + 0.910X_2 + 2.843X_3 - 8.199X_1^2 - 3.900X_2^2 - 1.779X_3^2 \dots (4.3)$$

กำหนดให้ Y = ปริมาณกรดแลคติก

X_1 = ค่าพีเอชเริ่มต้น

X_2 = อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

X_3 = อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)

β = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficients)

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยแต่ละตัวแปร จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108

Factors	Code	Coefficients	Unstandardized coefficients		T value	P value
			β	Standard error		
Constant	Constant	β_0	32.159	0.683	47.112	0.000*
pH	X_1	β_1	-2.085	0.453	-4.603	0.000*
Temp	X_2	β_2	0.910	0.453	2.009	0.050*
Shake	X_3	β_3	2.843	0.453	6.277	0.000*
pHx Temp	X_1X_2	β_{12}	-0.600	0.592	-1.014	0.315
pHx Shake	X_1X_3	β_{13}	-0.592	0.592	-1.000	0.322
TempxShake	X_2X_3	β_{23}	-0.724	0.592	-1.224	0.227
pH ²	X_1^2	β_{11}	-8.199	0.441	-18.600	0.000*
Temp ²	X_2^2	β_{22}	-3.900	0.441	-8.847	0.000*
Shake ²	X_3^2	β_{33}	-1.779	0.441	-4.037	0.000*

หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การวิเคราะห์การถดถอยของปัจจัยต่างๆ และการวิเคราะห์นัยสำคัญของแบบจำลอง

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์การถดถอยของปัจจัย พีเอช อุณหภูมิ และอัตราการเขย่า ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย ที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก พบว่าทุกปัจจัยมีค่าความน่าจะเป็นที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.9 ดังนั้นทุกปัจจัยจึงมีผลต่อการผลิตกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ หากมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ โทร. 0-2644-0000 หรือ 0-2644-0001

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการวิเคราะห์การถดถอยของปัจจัยฟิโอส อุณหภูมิ และอัตราการเข้ขาดลดจนความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย ที่มีต่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	P value
Model	4307.473 ^a		331.344	523.061	0.000*
X ₁	179.924	2	89.962	142.015	0.000*
X ₂	60.518	2	30.259	47.767	0.000*
X ₃	663.359	2	331.679	523.591	0.000*
X ₁ X ₂	8.640	1	8.640	13.639	0.001*
X ₁ X ₃	8.402	1	8.402	13.263	0.001*
X ₂ X ₃	12.586	1	12.586	19.868	0.000*
X ₁ ²	0.000	0	-	-	-
X ₂ ²	0.000	0	-	-	-
X ₃ ²	0.000	0	-	-	-

หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

นอกจากนั้นเมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยที่ได้ ดังแสดงตามตารางที่ 4.10 พบว่ามีค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.000 ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นสมการถดถอยที่สร้างขึ้นจึงมีความเหมาะสมสำหรับการทำนายหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดขยาบเพดดินจากใบกรุงเขมาได้ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.903 หรือร้อยละ 90.30 และค่าปรับปรุงสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจหรือสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของแบบจำลอง (adjust R^2) เท่ากับ 0.886 หรือร้อยละ 88.60 ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตาม เมื่อได้รับอิทธิพลจากตัวแปรต้นร้อยละ 88.60 (หากมีค่าใกล้เคียงร้อยละ 100 จะทำให้สมการถดถอยมีความเหมาะสมมากยิ่งขึ้นและควรมีค่ามากกว่าร้อยละ 75.00) แต่นิยมใช้ค่าปรับปรุงสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจมากกว่าค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจเป็นการประมาณที่เกินความเป็นจริง (goodness of fit) และเมื่อทำการทดสอบความเหมาะสมของแบบจำลอง (Lack of fit test) พบว่าแบบจำลองนี้มีความเหมาะสมและสามารถใช้เป็นตัวแทนของชุดข้อมูลได้ ($p > 0.05$) (มาริษา ไชยโอสถ, 2549)

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการวิเคราะห์สมการถดถอยที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

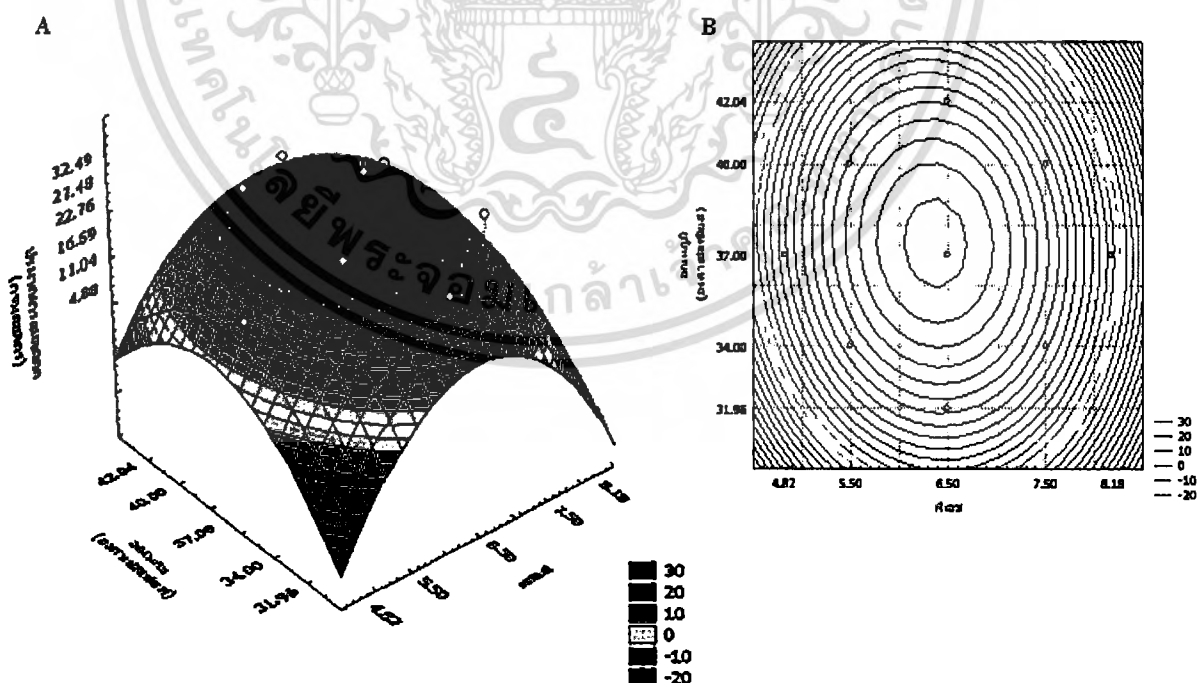
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F	Significant
Regression	3916.430	9	435.159	51.782	0.000 ^a
Residual	420.183	50	8.404		
Lack of fit	2.018	1	2.018	3.349	0.074

หมายเหตุ $R^2=0.903$ และ $\text{Adjusted } R^2 = 0.886$

การสร้างกราฟ 3 มิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองและระดับของปัจจัยที่ศึกษา สามารถสร้างกราฟ 3 มิติของพื้นที่ตอบสนองทั้งหมดจำนวน 3 กราฟ ดังนี้ กราฟที่ 1 (รูปที่ 4.4) เป็นกราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างปัจจัย ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ และปริมาณกรดแลคติก ซึ่งจุดสูงสุดของกราฟมีค่าเท่ากับ 6.39, 37.4 (องศาเซลเซียส) และ 30.90 (กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ และได้สมการดังสมการ 4.4

$$Y = -921.4125 + 109.7723 X_1 + 32.2452 X_2 - 8.0352 X_1^2 - 0.2 X_1 X_2 - 0.4141 X_2^2 \quad \dots(4.4)$$



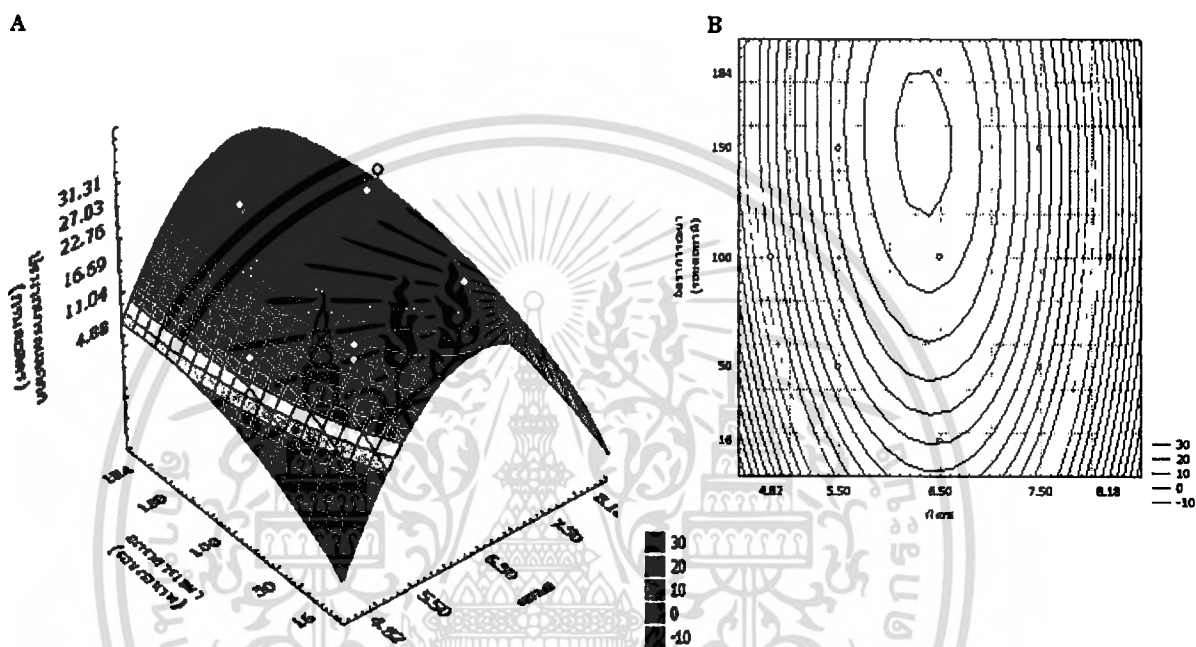
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก

(A) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) (B) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่หรือใช้ซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟที่ 2 (รูปที่ 4.5) เป็นกราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างปัจจัย ค่าพีเอชเริ่มต้น อัตราการเขย่า และปริมาณกรดแลคติก ซึ่งจุดสูงสุดของกราฟมีค่าเท่ากับ 6.39, 147 (รอบต่อนาที) และ 30.61 (กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ และได้สมการดังสมการ 4.5

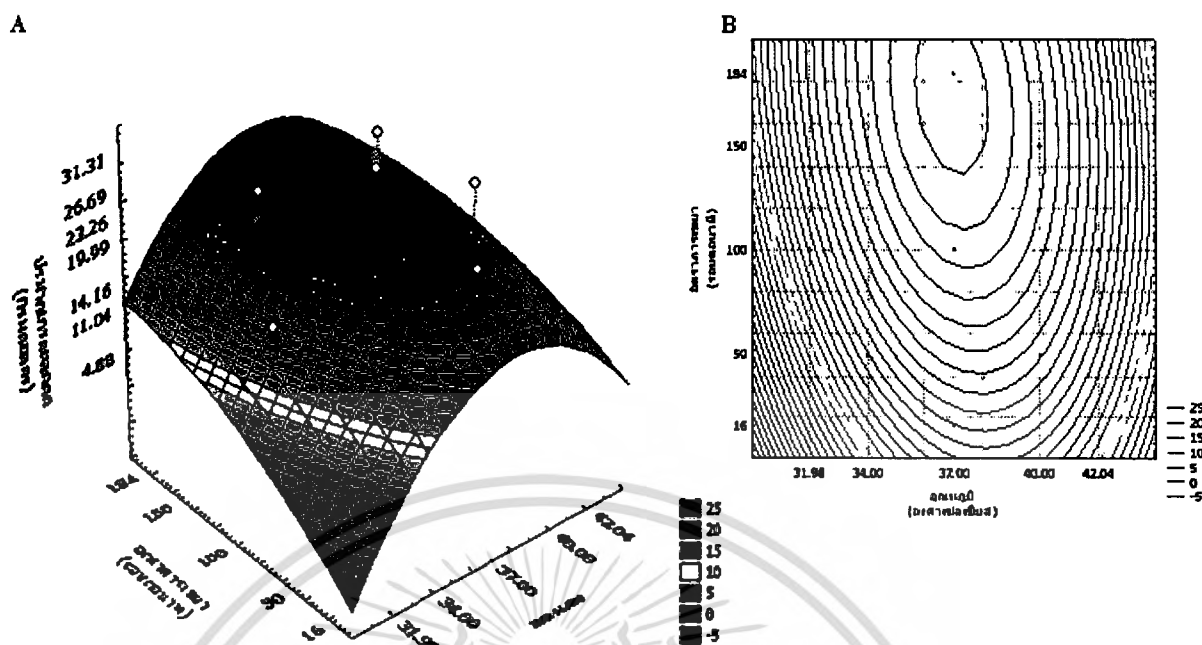
$$Y = -307.0957 + 100.8401 X_1 + 0.2453 X_3 - 7.8262 X_1^2 - 0.0118 X_1 X_3 - 0.0006 X_3^2 \quad \dots(4.5)$$



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราการเขย่าและพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก (A) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) (B) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)

กราฟที่ 3 (รูปที่ 4.6) เป็นกราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างปัจจัย อุณหภูมิ อัตราการเขย่า และปริมาณกรดแลคติก ซึ่งจุดสูงสุดของกราฟมีค่าเท่ากับ 36.63 (องศาเซลเซียส), 179 (รอบต่อนาที) และ 27.51 (กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.6 และสมการที่ 4.6

$$Y = -483.8528 + 26.2269 X_2 + 0.3132 X_3 - 0.3438 X_2^2 - 0.0048 X_2 X_3 - 0.0004 X_3^2 \quad \dots(4.6)$$



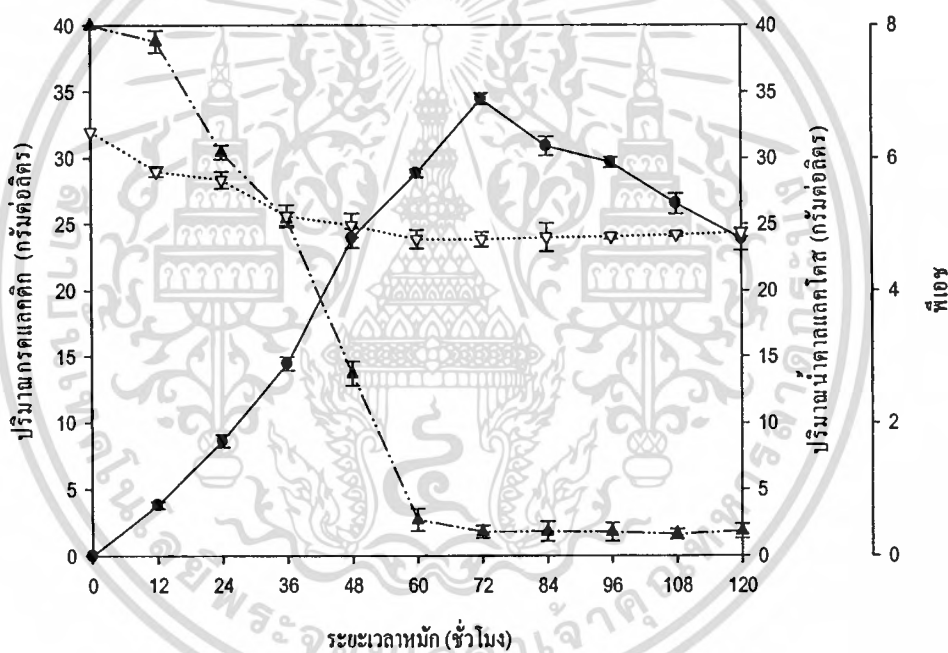
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราการเขย่าและอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก
(A) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) (B) กราฟเส้น โครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)

การทำนายค่าสภาวะที่เหมาะสมและปริมาณกรดแลคติกที่สูงที่สุด ได้จากสมการถดถอยสมการที่ 4.3 โดยแทนค่าปัจจัยต่างๆ ที่ได้จากจุดสูงสุดของกราฟตามรูปที่ 4.3-4.5 จะสามารถทำนายได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา คือ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.39 อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 147 รอบต่อนาที ตามลำดับ จะสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 33.44 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูปที่ 4.7 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงตามสภาวะดังกล่าวเพื่อพิสูจน์ผลของการทำนายโดยแบบจำลองที่สร้างขึ้น พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 34.47 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองมีความใกล้เคียงกับแบบจำลอง โดยคิดเป็นร้อยละความแตกต่าง เท่ากับร้อยละ 3.08

ดังนั้นสรุปได้ว่าจำลองนี้มีความสามารถในการทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงนำสภาวะนี้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.11 แสดงการคาดคะเนปริมาณกรดแลคติกสูงสุดเมื่อหมักในอาหารเวย์โดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ด้วยปัจจัยจำเพาะต่างๆ ซึ่งได้จากพื้นที่ตอบสนอง

การทดลอง ที่	ระดับของปัจจัย			รหัสของปัจจัย			ปริมาณ กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)
	พีเอช เริ่มต้น	อุณหภูมิ	อัตรา การเขย่า	พีเอช เริ่มต้น	อุณหภูมิ	อัตรา การเขย่า	
1	6.39	37.4	147	-0.105	0.123	0.947	33.44
2	6.39	37.4	178	-0.105	0.123	1.579	32.39
3	6.39	36.6	147	-0.105	-0.123	0.947	33.21
4	6.39	36.6	178	-0.105	-0.123	1.579	32.17



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ และค่าพีเอช ของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดขยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา โดยเลี้ยงในสภาวะที่ได้จากการคาดคะเนของการทดลองแบบ CCD (ทำการทดลองจริงที่พีเอชเริ่มต้น 6.4, อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส และการเขย่า 147 รอบต่อนาที)
(●) กรดแลคติก, (▲) น้ำตาลแลคโตส และ (▽) พีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาปัจจัยจากการทดลอง พบว่าค่าพีเอชมีผลต่อการผลิตกรดแลคติก เนื่องจากพีเอชของอาหารมีผลต่อหน้าที่ต่างๆของเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม และการขนส่งอาหารเข้าสู่เซลล์ (Klovrychev และคณะ, 1979) จากการทดลองพบว่า ค่าพีเอช 6.39 เหมาะสมต่อผลิตกรดแลคติกที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยการตรึงเซลล์ *L. casei* ด้วยเพคเตดในอาหารที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.5-7.0 พบว่าที่พีเอช 6.5 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุด Idris และ Suzuna (2006) ศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับประรดโดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด

เมื่อพิจารณาปัจจัยจากการทดลอง พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตกรดแลคติก เนื่องจากอุณหภูมิมิผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมและกระบวนการผลิต จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อผลิตกรดแลคติกที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ John และคณะ (2006) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. delbrueckii* NCIM 2025 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากที่สุด Idris และ Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับประรด โดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด

เมื่อพิจารณาปัจจัยจากการทดลอง พบว่าอัตราการเขย่ามีผลต่อการผลิตกรดแลคติก เนื่องการเขย่าทำให้เกิดการผสมกันได้อย่างทั่วถึง ทำให้เซลล์สัมผัสกับสารอาหารและสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกได้ดี จากการทดลองพบว่าอัตราการเขย่า 147 รอบต่อนาที เหมาะสมต่อผลิตกรดแลคติกที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kotzamanidis และคณะ (2002) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาลของเชื้อ *L. delbrueckii* NCIMB 8130 โดยทำการเปรียบเทียบสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อระหว่างสภาวะนิ่งและการเขย่าพลาสติกที่ 150 รอบต่อนาที พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่าสภาวะนิ่ง และใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นลง เนื่องจากอาหารสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ดี ส่งผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมและกระบวนการผลิต ทำให้ผลิตกรดแลคติกได้สูงในระยะเวลาที่สั้น Kwon (2000) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. rhamnosus* โดยใช้ถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยและเสริมวิตามินเป็นซับสเตรด โดยใช้สภาวะการหมักคือ การกวน 150 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส สามารถกรดแลคติกได้ 125 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร

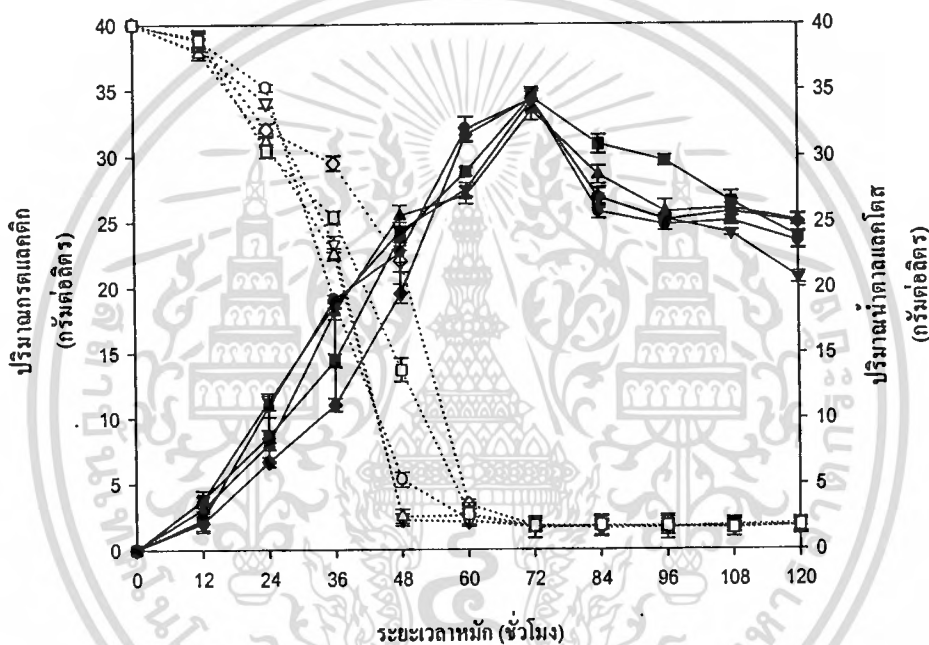
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาโดยเปรียบเทียบกับเพคตินทางการค้าและโซเดียมแอลจิเนตในระดับฟลาสก์

จากการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ *L. casei* TISTR 108 ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา (ร้อยละ 4 น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเปรียบเทียบกับเพคตินการค้า คือ เพคตินจากส้ม เพคตินจากแอปเปิล เพคตินเกรดอุตสาหกรรมอาหาร ความเข้มข้นร้อยละ 5 น้ำหนักต่อปริมาตร (Smogrovicova และ Domeny, 1999; Rosenberg และคณะ, 1999; Navratil และคณะ, 2001) และโซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 น้ำหนักต่อปริมาตร (Idris และ Suzana, 2006; ศิริประภา มั่นตรง, 2550) ทำการหมักโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองแบบ CCD (ทำการทดลองจริงค่าพีเอชเริ่มต้น 6.4 อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 147 รอบต่อนาที) พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 34.47, 34.30, 34.32, 34.24 และ 33.49 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังรูปที่ 4.8 และ ตารางที่ 4.12

จากการทดลองพบว่าการเม็ดเจลแคลเซียมเพคเตตไม่มีการเปลี่ยนรูปร่างและความคงตัวในระหว่างการทดลอง ขณะที่เม็ดเจลของแคลเซียมแอลจิเนตมีปัญหาเรื่องความคงตัวของเม็ดเจลในการหมัก เนื่องจากเกิดการหดตัวของเม็ดเจลทำให้เม็ดเจลมีขนาดเล็กลงจากเดิม (รูปที่ 4.9) ทำให้เซลล์ที่ตรึงหลุดลอยออกมาได้ อาจเป็นปัญหาในการศึกษาการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำ ซึ่งสอดคล้องกับ Yoo และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยใช้แอลจิเนตเป็นวัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้มเชื้อ *L. casei* พบว่ามีข้อเสีย คือมีช่องว่างที่เชื้อสามารถเจริญได้น้อยและโครงสร้างของแอลจิเนตไม่เสถียรเนื่องจากสูญเสียแคลเซียมในเม็ดเจลเนื่องจากกรดแลคติกในระหว่างการหมักแบบกะ ซึ่งความแตกต่างของความคงตัวของเม็ดเจล เนื่องมาจากชนิดและโครงสร้างของเม็ดเจลจากเพคตินและแอลจิเนตที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถศึกษาลักษณะทางกายภาพของโครงสร้างเม็ดเจลได้โดยการศึกษาโครงสร้างพื้นผิวและ โครงสร้างภายในเม็ดเจลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ดังรูปที่ 4.10 พบว่าลักษณะพื้นผิวของเม็ดเจลจากแอลจิเนตมีลักษณะที่เต็มไปด้วยรูพรุน จึงน่าจะเป็นสาเหตุของความคงตัวที่ไม่ดี ขณะที่สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาและเพคตินการค้าจากส้มมีพื้นผิวเรียบและละเอียด ดังนั้นเม็ดเจลจากเพคตินจึงน่าจะมี ความคงตัวและมีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้มากกว่าเม็ดเจลจากแอลจิเนต ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Navratil และคณะ (2001) ในการผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำผึ้ง ด้วยการตรึงเซลล์ด้วยเพคเตตพบว่าเม็ดเจลมีความคงตัวที่ดี Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยการตรึงเซลล์ *L. casei* ด้วยเพคเตตพบว่าเม็ดเจลมีความคงตัวที่ดีเช่นกัน Rosenberg (1999) ศึกษาการผลิตกรดทาร์ทาริกจากเชื้อ *Nocardia tartaricans* โดยการเปรียบเทียบวัสดุตรึงเซลล์ ดังนี้ การจี้แนมร้อยละ 4 แคลเซียม

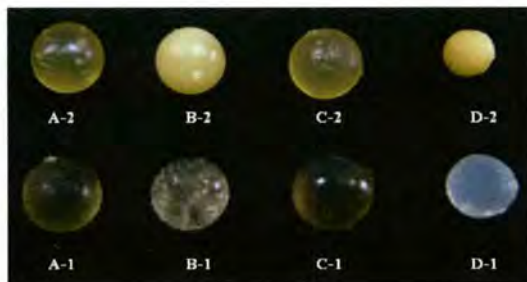
แอลจินต์ร้อยละ 3 และแคลเซียมเพคเตตร้อยละ 5 พบว่าการใช้แคลเซียมเพคเตตเม็ดเจลมีความคงตัวมากที่สุดและสามารถผลิตกรดได้มากที่สุด

ดังนั้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาจึงมีศักยภาพในการนำมาใช้ตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดแลกติกได้ และมีประสิทธิภาพสูงเทียบเท่าเพคตินทางการค้าและแอลจินต์ นอกจากนี้ยังใช้ปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในการตรึงเซลล์ต่ำกว่าเพคตินทางการค้า ซึ่งเป็นการได้เปรียบในแง่ทางด้านเศรษฐศาสตร์ ช่วยลดต้นทุนการผลิตกรดแลกติก และช่วยลดการนำเข้าเพคตินจากต่างประเทศ เนื่องจากสามารถใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาทดแทนได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับใบกรุงเขมาอีกด้วย

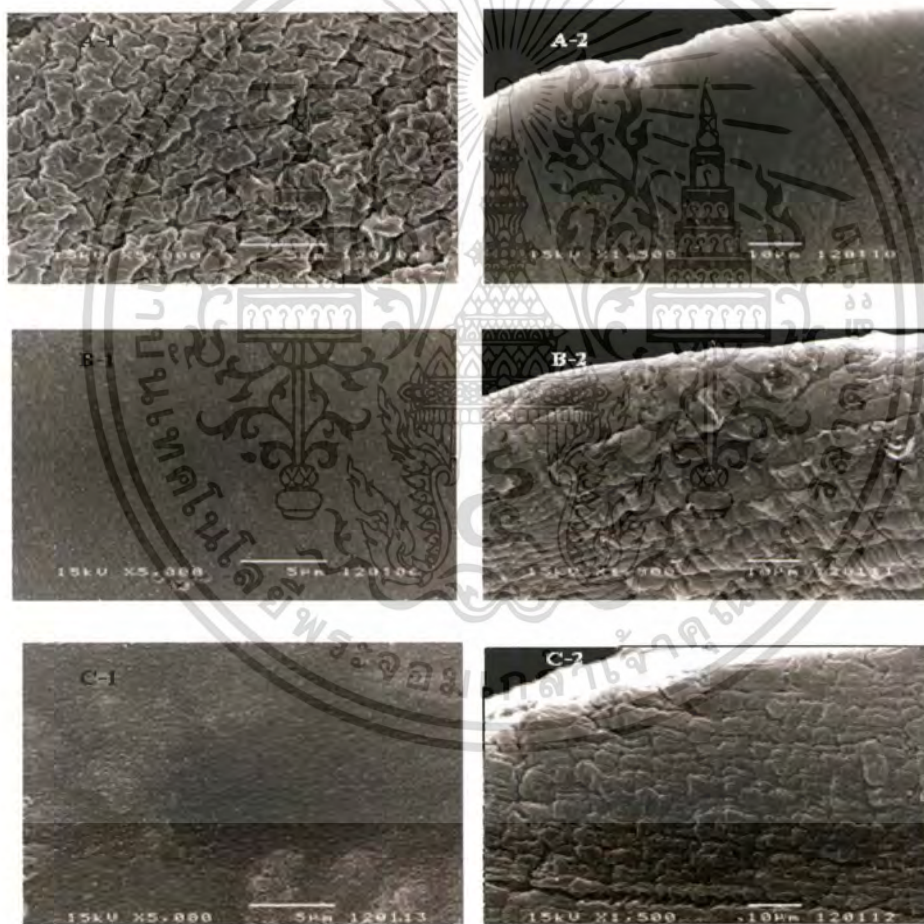


รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดแลกติก และปริมาณน้ำตาลแลกโตสที่ใช้ โดยเปรียบเทียบวัสดุตรึงเซลล์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการตรึงเซลล์เชื้อ *L. casei* TISTR 108 ณ ชั่วโมงที่ 72

- (●) กรดแลกติก, (○) น้ำตาลแลกโตสของเพคตินจากสั้ม
- (◆) กรดแลกติก, (◇) น้ำตาลแลกโตสของเพคตินจากแอปเปิ้ล
- (▼) กรดแลกติก, (▽) น้ำตาลแลกโตสของเพคตินเกรดอุตสาหกรรมอาหาร
- (▲) กรดแลกติก, (△) น้ำตาลแลกโตสของแอลจินต์
- (■) กรดแลกติก, (□) น้ำตาลแลกโตสของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา



รูปที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบวัสดุตั้งเซลล์ชนิดต่างๆสำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ก่อนการหมัก (หมายเลข 1) และหลังการหมัก (หมายเลข 2) กรดแลคติก เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (A=สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา, B= เพคตินจากส้ม, C=เพคตินจากแอปเปิล และ D=โซเดียมแอลจินेट)



รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของเม้ดเจดด้วยกล้อง SEM

(A-1) คือ โครงสร้างพื้นผิว (A-2) คือ โครงสร้างภายในเม้ดเจดของแอลจินेट
 (B-1) คือ โครงสร้างพื้นผิว (B-2) คือ โครงสร้างภายในเม้ดเจดของเพคตินทางการค้าจากส้ม
 (C-1) คือ โครงสร้างพื้นผิว (C-2) คือ โครงสร้างภายในเม้ดเจดของสารสกัดหยาบเพคติน
 ทางจากใบกรุงเขมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ อัตราการผลิต ผลได้ และค่าพีเอช โดยใช้วัสดุครึ่งเซลล์ชนิดต่างๆในการครึ่งเซลล์เชื้อ *L. casei* TISTR 108 ณ ชั่วโมงที่ 72

ชนิดของ วัสดุครึ่งเซลล์	ปริมาณกรด แลคติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาล แลคโตสที่ถูกใช้ (ร้อยละ)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	ค่าพีเอช
เพคตินจากส้ม	34.30± 0.89 ^a	95.90±2.05 ^a	0.476±0.01 ^a	0.895±0.04 ^a	4.76±0.08 ^a
เพคตินจากแอปเปิล	34.32± 0.76 ^a	95.45±0.73 ^a	0.475±0.01 ^a	0.899±0.03 ^a	4.83±0.11 ^a
เพคตินเกรด อุตสาหกรรมอาหาร	34.24± 0.79 ^a	95.41±1.38 ^a	0.476±0.01 ^a	0.898±0.03 ^a	4.72±0.03 ^a
โซเดียมแอลจีเนต	33.49± 0.79 ^a	95.80±2.03 ^a	0.465±0.01 ^a	0.874±0.03 ^a	4.80±0.08 ^a
สารสกัดหยาบ เพคติน	34.47± 0.41 ^a	95.50±1.18 ^a	0.479±0.01 ^a	0.903±0.02 ^a	4.77±0.11 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.5 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกครึ่งด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรูงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร

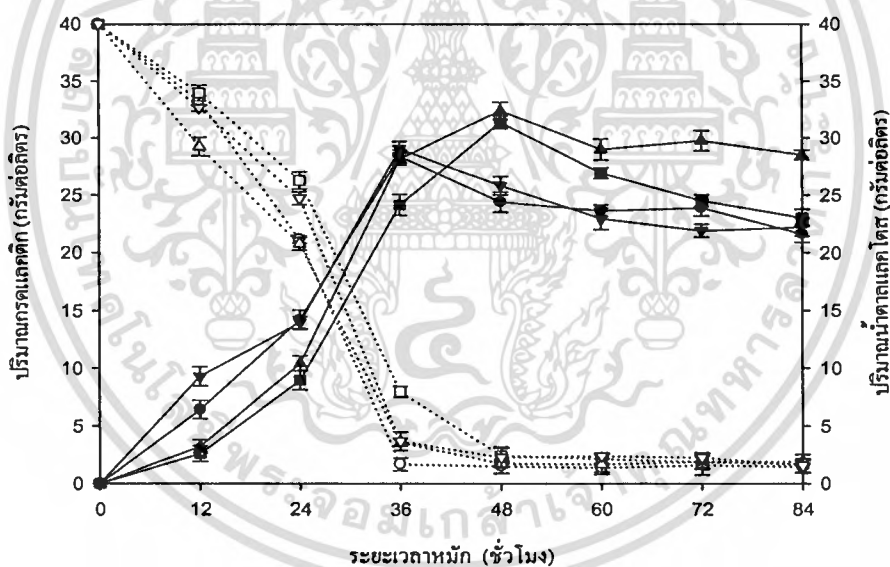
4.5.1 ผลการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเซลล์ครึ่งด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เมื่อทำการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกครึ่งด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรูงเขมาในถังหมัก โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองแบบ CCD ดังนี้ ค่าพีเอช 6.39 อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 (ค่าที่ได้จากการทดลอง CCD คือ 147 รอบต่อนาที ปัดให้เป็นเลขจำนวนเต็มมีค่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาที) เมื่อใช้สภาวะดังกล่าวในการผลิตกรดแลคติกในถังหมักพบว่าเมื่อดูผลเนื่องจากเกิดแรงเฉือน (shear rate) จากใบพัดแรงที่มีอัตราการกวนที่สูง ซึ่งมีผลต่อการศึกษานำเมื่อดูผลกลับมาใช้ซ้ำ ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยใช้อัตราการกวน 50, 100, 120 และ 150 รอบต่อนาที พบว่าผลิตกรดแลคติกได้ 28.40, 31.36, 32.39 และ 29.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.11

ตารางที่ 4.13 แสดงอัตราการกวนที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก อัตราการผลิต ผลได้ และปริมาณน้ำตาลแลคโตสทั้งหมดที่ถูกใช้ ของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

อัตรา การกวน (รอบต่อนาที)	ระยะเวลา หมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรด แลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	ปริมาณน้ำตาล แลคโตสที่ถูกใช้ (ร้อยละ)
50	36	28.40±0.58 ^b	0.789±0.02 ^a	0.741±0.03 ^b	95.90±1.35 ^a
100	48	31.36±0.57 ^a	0.653±0.01 ^b	0.835±0.03 ^a	93.95±1.55 ^a
120	48	32.39±0.76 ^a	0.675±0.02 ^b	0.846±0.03 ^a	95.70±0.60 ^a
150	36	29.05±0.62 ^b	0.807±0.02 ^a	0.800±0.04 ^a	90.85±1.98 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.11 แสดงอัตราการกวนที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก และปริมาณน้ำตาลแลคโตสทั้งหมดที่ถูกใช้ของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (ทำการทดลองจริง ทีเอช 6.4 และอุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส)

- (●) กรดแลคติก, (○) น้ำตาลแลคโตส ของการกวน 50 รอบต่อนาที
- (■) กรดแลคติก, (□) น้ำตาลแลคโตส ของการกวน 100 รอบต่อนาที
- (▲) กรดแลคติก, (△) น้ำตาลแลคโตส ของการกวน 120 รอบต่อนาที
- (▼) กรดแลคติก, (▽) น้ำตาลแลคโตสของการกวน 150 รอบต่อนาที

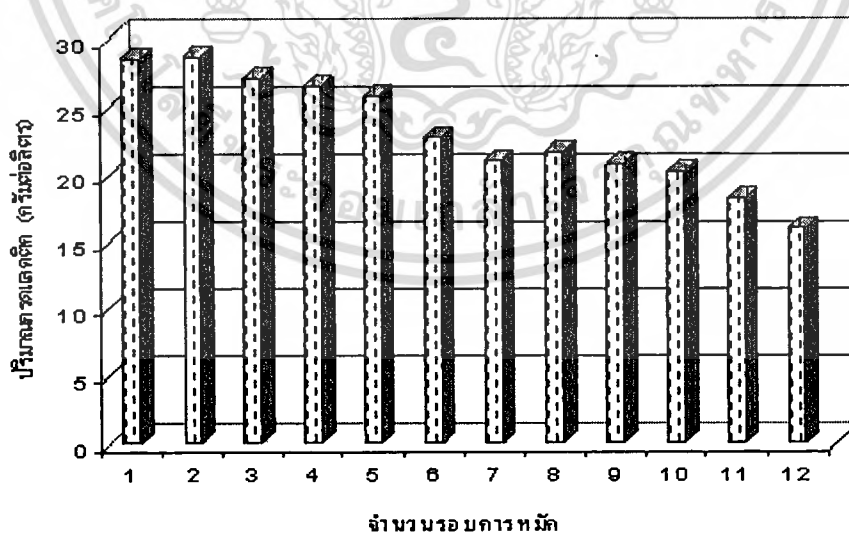
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่าอัตราการกวนมีผลต่อการผลิตกรดแลคติก เมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการกวนมากขึ้น สามารถผลิตกรดแลคติกได้เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มอัตราเร็วจนถึง 150 รอบต่อนาที ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกลดลง เนื่องจากเซลล์ตรึงด้วยได้รับผลกระทบจากจากแรงเฉือน ส่งผลให้เซลล์ตรึงได้รับความเสียหาย เม็ดเจลเกิดการแตกทำให้เซลล์ภายในเม็ดเจลหลุดลอดออกมา (Stanbury และ Whitaker, 1984) อย่างไรก็ตามการกวนด้วยอัตราเร็ว 120 และ 100 รอบต่อนาที สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูง เนื่องจากมีการผสมกันของสารอาหาร สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ควบคุมพีเอช และเซลล์ตรึงได้อย่างทั่วถึง แต่พบว่าเม็ดเจลเกิดการแตกเช่นกัน เชื้อสามารถหลุดลอดออกมาจากเม็ดเจล โดยสังเกตได้จากอาหารมีความขุ่นมากขึ้น สำหรับการกวนด้วยอัตราเร็ว 50 รอบต่อนาที สามารถผลิตกรดแลคติกได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการกวนอื่นๆ เนื่องมาจากสารอาหารและ สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ควบคุมพีเอชมีการผสมกันอย่างไม่ทั่วถึง และเซลล์ตรึงสัมผัสกับสารอาหารได้น้อยจึงได้ผลผลิตต่ำกว่าอัตราการกวนอื่นๆ แต่การใช้อัตราการกวนที่ 50 รอบต่อนาที เซลล์ตรึงได้รับผลกระทบจากแรงเฉือนน้อยมาก ทำให้เซลล์ตรึงไม่ได้รับความเสียหาย เม็ดเจลไม่เกิดการแตก สามารถที่จะนำไปใช้ศึกษาการนำเม็ดเจล กลับมาใช้ซ้ำใหม่ได้ดี และถ้าพิจารณาอัตราการผลิตพบว่าอัตราการผลิตที่สูงรองจากการกวนที่ใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และการใช้อัตราการกวนที่ต่ำ จะใช้พลังงานลดลง ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบในแง่ทางด้านเศรษฐศาสตร์ ดังนั้นจึงเลือกอัตราการกวน 50 รอบต่อนาที นำไปใช้ในการศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาโดยนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำ

4.5.2 การศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาโดยการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อผลิตกรดแลคติก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ผลการศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมา โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าพีเอช 6.39 อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 50 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จนถึงเวลา 36 ชั่วโมงของการหมัก (เนื่องจากที่เวลา 36 ชั่วโมงของการหมักน้ำตาลแลคโตสมีการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดแลคติกเพิ่มขึ้นสูงสุด หลังจากนั้นการผลิตกรดแลคติกจะค่อยๆลดลง และปริมาณน้ำตาลแลคโตสเหลือน้อยมากจนเกือบหมด) หลังจากทุกๆรอบการหมักที่ 36 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเวทย์ที่ใช้ในการหมักและทำซ้ำโดยใช้อาหารเวทย์ใหม่ หลังจากล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 28.64 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.795 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ 0.752 กรัมต่อกรัม แสดงดังรูปที่ 4.12 และตารางที่ 4.14

จากผลการทดลองพบว่าสามารถนำเม็ดยาลกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 12 รอบการหมัก แต่เมื่อสิ้นสุดการหมักรอบที่ 12 เม็ดยาลมีการแตกและละลายตัวเกือบทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถหมักรอบต่อไปได้อีก และเมื่อพิจารณาการผลิตกรดแลคติกพบว่าอัตราการผลิตกรดแลคติกลดลงเรื่อยๆเมื่อจำนวนรอบในการนำเม็ดยาลกลับมาใช้ซ้ำเพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์อาจเกิดการเสื่อมสภาพ (cell degeneration) เซลล์อ่อนแอ (inactivated cells) และความเสื่อมสภาพของเม็ดยาล ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกลดลง สอดคล้องกับการทดลองของ Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการประยุกต์ใช้เพคเตดในการตรึงเซลล์ *L. casei* สำหรับการผลิตกรดแลคติกจากเวย์ พบว่าสามารถนำเม็ดยาลเพคเตดกลับมาใช้ซ้ำได้จนถึง 16 รอบการหมัก โดยความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตสในอาหารจากเวย์ไม่เปลี่ยนแปลง แต่หลังจากผ่านรอบการหมักที่ 16 ความสามารถในการหมักการลดลง เกิดการยับยั้งการหมักน้ำตาลแลคโตสในเวย์หลังจากรอบการหมักที่ 16 อาจเป็นเพราะว่าเกิดความเสื่อมสภาพของชีวมวลที่ห่อหุ้มเซลล์เป็นผลทำให้ความสามารถในการหมักลดลง Kourkoutas และคณะ (2005) ศึกษาการตรึงเซลล์ *L. casei* บนชิ้นแอปเปิลและควินซ์ ในการผลิตกรดแลคติก โดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต พบว่าสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการหมักแบบกะได้ทั้งหมด 15 รอบ Mirdamadi และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยการตรึงเซลล์เชื้อ *L. casei* subsp. *casei* ATCC 39392 ด้วยวัสดุตรึงเซลล์ชนิดต่างๆ คือ แบเรียมแอลจิเนต ฟู้น และพอลิยูรีเทน โฟม (polyurethane foam cubes) พบว่าการใช้แบเรียมแอลจิเนตสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุด (60.13 กรัมต่อลิตร) และเม็ดยาลมีความแข็งแรงสามารถนำมาใช้ซ้ำในการหมักได้มากกว่า 40 วัน



รูปที่ 4.12 แสดงจำนวนรอบของการหมักกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ

ตารางที่ 4.14 แสดงจำนวนรอบของการหมักกรดแลคติก อัตราการผลิต และผลได้ ของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเมมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ

จำนวนรอบ การหมัก	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)
1	28.55±0.74 ^a	0.793±0.02 ^a	0.743±0.03 ^a
2	28.64±0.38 ^a	0.795±0.01 ^a	0.752±0.02 ^a
3	27.05±0.61 ^b	0.751±0.02 ^b	0.709±0.03 ^{ab}
4	26.43±0.86 ^b	0.734±0.02 ^b	0.689±0.03 ^b
5	25.87±0.94 ^b	0.719±0.03 ^b	0.673±0.04 ^b
6	22.72±0.72 ^c	0.631±0.02 ^c	0.592±0.03 ^c
7	20.99±0.92 ^{dc}	0.583±0.03 ^{dc}	0.545±0.03 ^{cdc}
8	21.64±0.48 ^{cd}	0.601±0.02 ^{cd}	0.570±0.02 ^{cd}
9	20.72±0.77 ^c	0.576±0.022 ^c	0.542±0.03 ^{dc}
10	20.23±0.28 ^c	0.562±0.01 ^c	0.526±0.02 ^c
11	18.13±0.54 ^f	0.504±0.02 ^f	0.472±0.02 ^f
12	15.97±0.84 ^e	0.444±0.02 ^e	0.414±0.03 ^e

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกด้วย เชลล์อิสระและเชลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมา โดยใช้เชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1399 พบว่าการใช้เชลล์ตรึงสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่าเชลล์อิสระ

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเชลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมาของ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 เพื่อผลิตกรดแลคติก โดยออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3x3 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเชลล์ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ การตรึงเชลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมาความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 1.52 มิลลิเมตร และพบว่าเชื้อ *L. casei* TISTR 108 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่า *L. delbrueckii* TISTR 1339 มีค่าเท่ากับ 25.03 และ 21.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมา โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีพื้นที่ผิวการตอบสนอง (RSM) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก คือ พีเอชเริ่มต้น 6.39 (ทำการทดลองจริงใช้พีเอชเริ่มต้น 6.4) อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 147 รอบต่อนาที ตามลำดับ สามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 34.47 กรัมต่อลิตร

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเชลล์ *L. casei* TISTR 108 ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมา (ความเข้มข้นร้อยละ 4 น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเปรียบเทียบกับเพคตินการค้า (เพคตินจากส้ม เพคตินจากแอปเปิล และเพคตินเกรดอุตสาหกรรมอาหาร ความเข้มข้นร้อยละ 5 น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมแอลจีเนต (ความเข้มข้นร้อยละ 2 น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตที่ได้จากการทดลองแบบ CCD พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 34.47, 34.30, 34.32, 34.24 และ 33.49 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

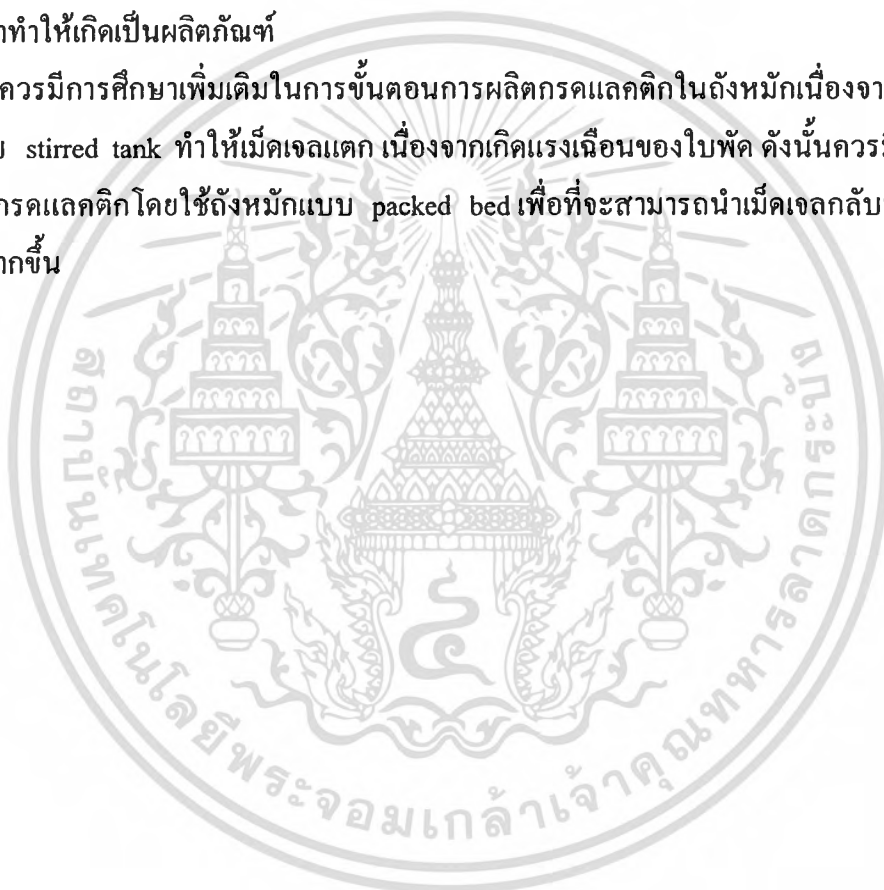
เมื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร คือ ค่าพีเอช 6.39 (ทำการทดลองจริงใช้พีเอชเริ่มต้น 6.4) อุณหภูมิ 37.4 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 50 รอบต่อนาที เมื่อศึกษาสัณฐานภาพของเชลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมาโดยการนำเม็ดยาล้อมกลับมาใช้ซ้ำ

พบว่าสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้ 12 รอบการหมัก โดยผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 28.64 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.795 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ 0.752 กรัมต่อกรัม ณ ชั่วโมงที่ 36

ดังนั้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาจึงมีศักยภาพในการนำมาใช้รีไซเคิลเพื่อผลิตกรดแลกติกได้ และมีประสิทธิภาพสูงเทียบเท่าเพคตินทางการค้าซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของใบกรุงเขมา ช่วยลดต้นทุนการผลิตกรดแลกติก และช่วยลดการนำเข้าเพคตินจากต่างประเทศ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มในการขั้นตอนการทำกรดแลกติกให้บริสุทธิ์ และควรนำกรดแลกติกที่ผลิตได้มาทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์
2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการขั้นตอนการผลิตกรดแลกติกในถังหมักเนื่องจากการใช้ถังหมักแบบ stirred tank ทำให้เม็ดเจลแตก เนื่องจากเกิดแรงเฉือนของใบพัด ดังนั้นควรมีการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักแบบ packed bed เพื่อที่จะสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้จำนวนมากขึ้น



บรรณานุกรม

กษพรธณ วงศ์เจริญ. 2548. “การศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณสารเพคติน และสารอัลคาลอยด์ใน
กรูงเขมา (*Cissampelos pareira* L.)” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
พืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

กรมศุลกากร. 2550. “พิกัดอัตราอากรขาเข้า สารจำพวกเพคติน.” ออนไลน์เข้าถึงได้จาก
www.customsclinic.org. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 เมษายน 2552.

จิรศักดิ์ ศรีสมศักดิ์ และธนากร อัมมะเท. 2543. “การหาปริมาณเพคตินจากใบหมาน้อย.” ปัญหา
พิเศษ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

จิราภรณ์ สังข์ผุด. 2549. “การผลิตและคุณสมบัติของเพคตินผงที่สกัดจากกรูงเขมา.” วิทยานิพนธ์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร (วิทยาศาสตร์การอาหาร) มหาวิทยาลัย
วลัยลักษณ์.

ชยันต์ พิเชียรสุนทร, แม้นมาส ชวลิต และวิเชียร จีรวงส์. 2542. คำอธิบายตำราพระโอสถพระ
นารายณ์. กรุงเทพฯ: อมรินทร์.

ญานี ลีตะนันท์. 2541. “การสกัดและการทำกรดแลคติกให้บริสุทธิ์จากน้ำหมัก.” วิทยานิพนธ์วิชา
ศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระ
จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณรงค์ ศิจิรัมย์. 2546. “การสกัดและการหาลักษณะเฉพาะของเพคตินที่ได้จากกากฝรั่ง.”
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ติยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์. 2549. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกด้วยเซลล์ครึ่งของ
Lactococcus lactis IO-1 โดยวิธี Taguchi.” ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

เทียนศักดิ์ เมฆพรรณ โอภาส, วรรณภา กาญจนมขุร และปิ่นะเนตร ศรีธราธิคุณ. 2545. การวิเคราะห์
ปริมาณเพคตินในใบหมาน้อยด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี. ภาควิชาเคมี คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

น้ำทิพย์ นาเชียงใต้ และชฎภา ทศบุต. 2550. “ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อคุณภาพของเพคตินที่
สกัดได้จากใบหมาน้อย.” ปริญญาวิทยาศาสตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะ
ทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ

จังหวัดสกลนคร.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งในวันไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฝ่ายตรวจและบังคับการ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2552. พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติพ.ศ.2535 กฎประกาศ และระเบียบที่เกี่ยวข้องด้านการควบคุมมลพิษ . พิมพ์ครั้งที่4 . กรุงเทพฯ : องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

พยอม ตันติวัฒน์. 2521. สมุนไพร. กรุงเทพฯ: สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย.

พิเชษฐ เทปารุง. 2546. “การหาปริมาณเพคตินและคุณภาพของเพคตินจากใบหมาน้อย.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

พิพัฒน์ ไทรทอง. 2548. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอสตาแซนทิน.” ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

พิรุฬห์พร ศรีมงคล. 2552. “การคัดเลือกจุลินทรีย์ในการผลิตเซลลูเลสและไซลานเนส.” วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มัทนียา จงนิตยกาล. 2545. “การบำบัดน้ำทิ้งขั้นต้นของโรงงานนมด้วยแบคทีเรียแลคติก.” วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

มาริษา ไชยโอสถ. 2549. “การสกัดเพคตินจากของเหลือทิ้งของขนุน.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2538. อนุกรมวิธานพืช อักษร ก. กรุงเทพฯ: เพื่อนพิมพ์.

วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2532. เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการนมและผลิตภัณฑ์นม. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

วารภรณ์ ชัยโสภาส. 2538. การสกัดเพคตินในผลไม้ที่เป็นอาหาร. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 10(2) : 43-48.

วุฒิ ธรรมเวช. 2540. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ: รวมสาส์น (1977) จำกัด.

ศิริประภา มั่นตรง. 2550. “การเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนต.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ศิริวรรณ ศรีสรพัตร์, สมใจ ศรีโภค และเทียนศักดิ์ เมฆพรรณ โอภาส. 2533. รายงานการวิจัย การศึกษาแนวทางการสกัดเพคตินจากใบหมาน้อยและใบบัวโคก. มหาสารคาม: มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม.
- สมใจ ศรีโภค. 2544. จุลชีวอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.
- สัมภาษณ์ คำผุย. 2533. “การสกัดเพคตินจากใบหมาน้อย” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล. 2544. เทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตร- ศาสตร์.
- อาทิตย์ ธานี. 2548. “การผลิตกรดแลคติกจากกลูโคส ไซโลส และสารสกัดจากชานอ้อยโดย *Lactococcus lactis* IO-1.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Adinarayana, K., Jyothi, B. and Ellaiah, P. 2005. “Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique.” **Pharmaceutical Biotechnology**. 6: 391-397.
- Akerberg, C. and Zacchi, G. 2000. “An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour.” **Bioresouce Tecnology**. 75 : 119-126.
- Arasaratnam, V., 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.
- Axelsson, L.T. 1993. Lactic acid bacteria : Classification and physiology. In: Salminen, S. von Wright, A. editors. Lactic acid bacteria. New york : Marcelp.
- Bergmaier, D., Champagne, C.P. and Lacroix, C. 2003. “Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M.” **Applied Microbiology**. 95 : 1049-1057.
- Bogdanova, G.J. 1974. New whole products of improve quality (in Russian). Moscow : Pishceva Promishlenost.
- Boyaval, P. and Goulet, J. 1988. “Optimal conditions for production of lactic acid from cheese whey permeate by Ca-alginate-entrapped *Lactobacillus helveticus*.” **Enzyme Microbiology Technology**. 10 : 725-728.
- Brodelius, P. and Vandamme, E.J. 1987. “Immobilized Cell Systems.” **Biotechnology**. 7 : 405-464.

- Carrara, C.R. and Rubiolo, A.C. 1994. "Immobilization of β -galactosidase on chitosan." **Biotechnology Progress**. 10 : 220-224.
- Cheetham, P.S.J. 1980. "Developments in the immobilization of microbial cells and their application." **Journal of Biotechnology**. 4 : 189-242.
- Chibata, I. and Tosa, T. 1970. "Transformation of organic compounds by immobilized microbial cells." **Advances in Applied Microbiology**. 22 : 1-25.
- Christensen, S.H. 1986. "Pectins in Food hydrocolloids." Boca Raton, FL, Glicksman: CRC Press. 206-207.
- Ciesarova, Z., Domeny, Z., Smogrovicova, D., Patkova, J. and Sturdik, E. 1998. "Comparison of Ethanol Tolerance of Free and Immobilized *Saccharomyces uvarum* Yeasts." **Folia Microbiologica**. 43(1) : 55-58.
- Condon, S. 1987. "Responses of lactic acid bacteria to oxygen." **FEMS Microbiology Review**. 46 : 269-280.
- Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P. and Moon, S.H. 1995. "Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives." **FEMS Microbiology Reviews**. 16 : 221- 231.
- Dembczynski, R. and Jankowski, T. 2002. "Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules." **Enzyme Microbiology Technology**. 31 : 111-115.
- Draper, N.R., 1988. "Plackett Burman Designs." *Encyclopedia of Statistical Sciences*, 6th Ed., Wiley press, pp. 356-385.
- 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.
- Femmerma, O.R. 1996. *Food Science and Technology*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker.
- Fitzpatrick, J.J., Murphy, C., Mota, F.M. and Pauli, T. 2003. "Impurity and cost considerations for nutrient supplementation of whey permeate fermentations to produce lactic acid for biodegradable plastics." **International Dairy Journal**. 13 : 575-580.
- Francis, J.K. 2004. *Research Forester: Cissampelos pareira L.* International Institute of Tropical 1 : 225-270.
- Gardner, W.H. 1972. "Acidulants in food processing." **Hand book of food additives**. 2nd ed.

- Ge, X.Y., Qian, H. and Zhang, G.W. 2009. "Improvement of L-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Lactobacillus* sp." **Bioresource Technology**. 100 : 1872–1874.
- Gemeiner, P., Nahálka, J., Vikartovská, A., Nahálková, J., Tomáška, M., Sturdík, E., Markovic, O., Malovíková, A., Zatková, I. and Ilavský, M. 1996. In : *Immobilized Cells: Basics and Applications*, Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C. and Tramper, J. (eds.) Elsevier Science B.V., Amsterdam. 76–83.
- Giordano, L. C. R., Trovati, J., and Schmidell, W. 2008. "Continuous Production of Ethanol from Starch Using Glucoamylase and Yeast Co-Immobilized in Pectin Gel." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 147 : 47–61.
- Givry, S., Prevot, V. and Duchiron, F. 2008. "Lactic acid production from hemicellulosic hydrolyzate by cells of *Lactobacillus bifementans* immobilized in Ca-alginate using response surface methodology." **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 24 : 745–752.
- Goksungur, Y., Gunduz, M. and Harsa, S. 2005. "Optimization of lactic acid production from whey by *L. casei* NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads." **Journal Chemical Technology Biotechnology**. 80 : 1282–1290.
- Gonzalez-Siso, M.I. 1996. "The biotechnological utilization of cheese whey" a review. **Bioresour Technology**. 57 : 1–17.
- Hofvendahl, K. and Hagerdal, H. 1997. "L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*." **Enzyme and microbial technology**. 20 : 301-307.
- 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 *Lactobacillus 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.
- John, R.P., Sukumaran, R.K. Nampoothiri, K.M. 2007. "Statistical optimization of simultaneous saccharification and l(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture

- of Lactobacilli by response surface methodology.” **Biochemical Engineering Journal**. 36 : 262–267.
- Kadam, S.R., Patil, S.S., Bastawde, K.B., Khire, J. M. and Gokhale, D.V. 2006. “Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production.” **Process Biochemistry**. 41 : 120–126.
- Kertesz, Z.I. 1951. **The pectic substances**. New York : Interscience Publishers Inc.
- Kessler, H.G. 1981. **Food Engineering and Dairy Technology**. Verlag A. Kessien, Germany.
- Klovrychev, M.F., Korolev, P.N. and Bulgakova, V.G. 1979. “Effect of copper ions and unfavourable pH on protein and RNA synthesis of *Candida utilis*.” **Microbiology**. 47 : 357–361.
- Kosikowski, F.V. 1997. **Cheese and fermented milk foods**. Edwards Erothers, Ic. Ann Arbor. Michigan : pp.70.
- Kotzamanidis, Ch., Roukas, T. and Skaracis G. 2002. “Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130.” **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 18 : 441–448.
- 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.
- Kwon, S., Lee, C.P., Lee, G.E., Chang, K.Y. and Chang N., 2000. “Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate.” **Enzyme and Microbial Technology**. 26 : 209–215.
- Lawrence, RC. and Thomas, TD. The fermentation of milk by lactic acid bacteria. In : Bull AT, Ellwood DC, Ratledge C. editors. **Proceeding of the symposium 29 on Microbial Technology : Current state, Future Prospects**. Society for General Microbiology. P. 187-219. Chambridge UK. Cambridge University Press.
- Liouni, M., Drichoutis, P., and Nerantzis, T.E. 2008. “Studies of the mechanical properties and the fermentation behavior of double layer alginate–chitosan beads, using *Saccharomyces cerevisiae* entrapped cells.” **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 24 : 281–288.
- Marshall, K.R. 1982. Industrial isolation in developments in Dairy. **Chemistry**. New York : Applied Science Publish.

- Marwaha, S.S. and Kennedy, J.F. 1988. "Review : whey pollution problem and potential utilization." **International Journal Food Science Technology**. 23 : 323–336.
- May, C.D. 1997. Pectin In: Thickening and Gelling Agents for Food. New York : Ed. Imeson, A. Chapman and hall. 230-261.
- Meyer, B.S. and Anderson, D.S. 1952. Plant Physiology. 2nd ed. Tokyo: D. Van Nostrand.
- Mirdamadi, S., Atashgahi, S., Rajabi, A., Mohseni, F.A., Roayaei, M. and Hamed, J. 2008. "Cell entrapment of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 39392 for lactic acid production." **Iranian Journal of Biotechnology**. (6)1 : 6.
- Montgomery, D.C. 2001. "Experimental Design for Fitting Response Surfaces." **Design and Analysis of Experiments**, 5th ed., John Wiley and Son. 455-492.
- Mostafa, N.A. 1996. "Production of lactic acid from whey with agar immobilized cells in a continuous packed tubular reactor." **Energy Conversion and Management**. 37(3): 253–260.
- Muller, V. 2001.. "Bacterial Fermentation." **Encyclopedia of life Science**.
- Nakazawa, Y. and Hosono, A. 1992. **Functions of fermented milk**. Great Britain: University Press.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F. and Boudrant, J. 2001. "The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid a from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*." **Bioresource Technology**. 78 : 149 – 153.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A. 2004. "Lactic acid fermentation and its product polymerization." **Electronic Journal of Biotechnology**. 7 : 167 -179.
- Navratil, M., Sturdik, E. and Gemeiner, P. 2001. "Batch and continuous mead production with pectate immobilized, ethanol-tolerant yeast." **Biotechnology Letters**. 23 : 977-982.
- Nielsen, E.W. and Ullum, J.A. 1989. **Dairy Technology**. New York : Danish Turkey Dairies.
- Oakenfull, D.G. 1991. The Chemistry of High Methoxyl Pectin. In : **Chemistry and Technology of Pectin**. Ed. Walter, R.H., Cornell University Geneva , New York. 87-106.
- Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Knill, C.J. and Kosseva, M.R. 2007. "Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L(+) lactic acid production from whey." **Applied Microbiology Biotechnology**. 74 : 35–42.

- Pauli, T. and Fitzpatrick, J.J. 2002. "Malt combining nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*." **Process Biochemistry**. 38 : 1 – 6 .
- Petrov, K., Urshev, Z. and Petrova, P. 2008. "L(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84." **Food Microbiology**. 25 : 550–557.
- Premi, L., Sandine, W.E. and Elliker, P.R. 1972. "Lactose hydrolyzing enzyme of *Lactobacillus* species." **Applied Microbiology**. 24 : 51.
- Prescott, S.C. and Dunn, G.C. 1959. **Industry Microbiology**. 3rd ed. Tokyo : Kogakushi.
- Rao, C.S., Prakasham, R.S., Rao, A.D. and Yadav, J.S. 2008. "Production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* immobilized in functionalized alginate matrices." **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 24 : 1411–1415.
- Rosenberg, M., Mikova, H. and Kristofikova, L. 1999. "Production of L-tartaric acid by immobilized bacterial cells *Nocardia tartaricans*." **Biotechnology Letters**. 21 : 491–495.
- Roukas, T. and Kotzekidou, P. 1998. "Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fed batch culture." **Enzyme and Microbial Technology**. 22 : 199–204.
- Roy, D., Goulet, J. and Le Duy, A. 1987. "Continuous production of lactic acid from whey permeate by free and calcium alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*." **Journal Dairy Science**. 70 : 506–513.
- Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A. 2004 . **Lactic acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects**. 2nd ed. New York : Marcel Dekker.
- Scott, R. 1986. **Cheesemaking Practise**. Science Publishers, London. P.529.
- Senthuran, A., Senthuran, V., Kaul, R. and Mattiasson, B. 1997. "Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor : a step towards optimization." **Journal Biotechnology**. 73 : 61-70.
- Singthonga, J., Ningsanonda, S., Steve, W., Cuib, H. and Goffc, D. 2005. "Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin." **Food Hydrocolloids**. 19 : 793–801.
- Smogrovicova, D. and Domeny, Z. 1999. "Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts." **Process Biochemistry**. 34 : 785–794.

- Stanbury, F.P., Whitaker, A. and Hall, J.S. 1984. "Principles of Fermentation Technology." 2nd Edn, Pergamon Press, Oxford, p. 387.
- Stiles, M.E. and Holzapel, W.H. 1997. "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." **Food Microbiology**. 36 : 1-29.
- Tango, M.S.A. and Ghaly, A.E. 2002. "A continuous lactic acid production system using an immobilized packed bed of *Lactobacillus helveticus*." **Applied Microbiology Biotechnology**. 58 :712-720.
- Thompson, J., Chassey, BM, Egan W. 1985. "Lactose metabolism in *Streptococcus lactis* studies with a mutant lacking glucokinase and manosephosphotransferase activities." **Journal of Bacteriology**. 162 : 217-223.
- Thakur, B.R., Rakesh, K.S. and Avtar, K.H. 1997. "Chemistry and uses of pectina review." **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 37(1) : 47-73.
- Tseng,C.P. and Montville,T.J. 1993. "Metabolic regulation of end product distribution in *Lactobacilli* : causes and consequences." **Biotechnology Progress**. 9 : 113-121.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S. and Higton, G. 2001. **Industrial Microbiology**. London : Alackwell Science Ltd.
- Whistler, R.L. and Bemiller, J.N. 1997. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. . Minesota : Eagan Press.
- Wong, W.S. Food. 1995. **Enzymes : Struture and Mechanism**. New York : Chapman and Hall.
- Yoo, I.K., Seong, G.H., Chang, H.N. and Park, J.K. 1996. "Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production." **Enzyme and Microbial Technology**. 19 : 428-433.
- 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.
- Yu, L., Lei, T., Rena, X., Pei, X. and Feng, Y. 2008. "Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466." **Biochemical Engineering Journal**. 39:496-502.
- [Online]. Availavble : http://www.eu.lib.kmutt.ac.th/elearning/Courseware/BCT611/Chap4/chapter4_3.html
- [Online]. Availavble : <http://www.oley.org/images/Lactobacillus.jpg>

[Online]. Availavble : <http://filing.fda.moph.go.th/library/e-learning>

[Online]. Availavble : <http://www.indiana.edu/~ensiweb/lessons/tp.2.gif>

[Online]. Availavble : <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>

[Online]. Availavble : <http://thrai.sci.ku.ac.th/node/879>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว MRS ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (meat extract)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (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

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 (± 1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารแข็ง MRS ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (meat extract)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไตรแอมโมเนียมซัลเฟต ($\text{CH}_3\text{COONH}_3$)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 (± 1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหารเวทย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 (ศิริประภา มั่นตรง, 2550)

ยีสต์สกัด	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.10	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัมต่อลิตร

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในเวย์ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 (± 1) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลแลคโตสวิธีฟินอล-ซัลไฟวริก (Dobois. 1956)

1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. คิวเวตแก้ว
3. ปิเปต

1.2 สารเคมี

1. กรดซัลไฟวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)
2. ฟินอล 5% โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟินอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายแลคโตสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งแลคโตสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแลคโตสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

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

วิธีการ

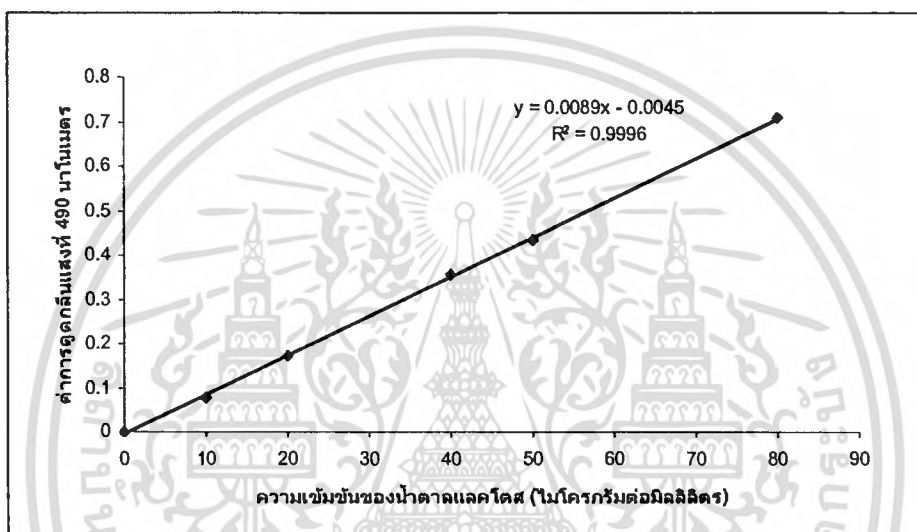
1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายแลคโตสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟินอลร้อยละ 5 ลงไป 1 มิลลิลิตร

2. เติมกรดซัลไฟวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็วโดยปล่อยกรดลงไปที่ยกหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆปล่อยลงที่ข้างหลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของแลคโตสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของแลคโตส(กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times (1,000)}$$



รูปที่ ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตส ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วย HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

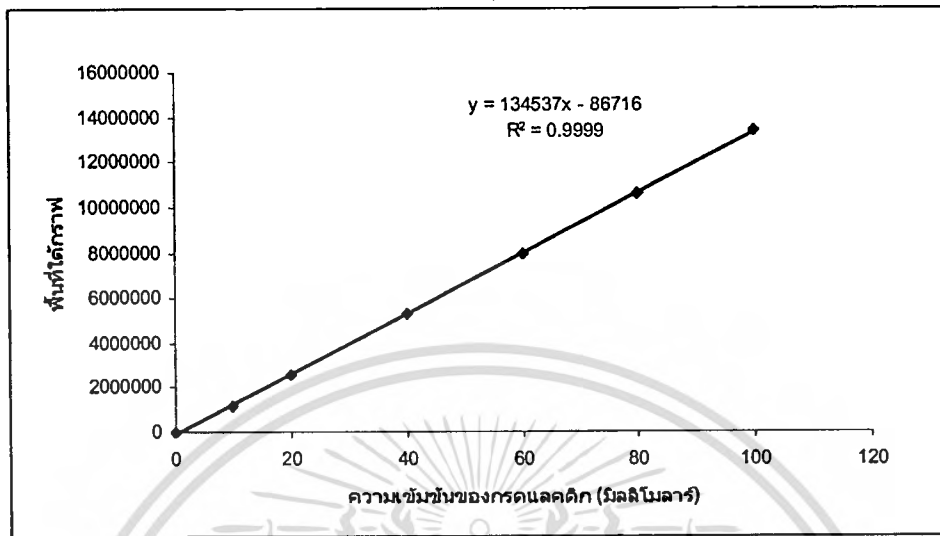
วิธีการ

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมภ์ Inertsil C8-3 โดยมีกรรชัลฟูริก ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (ประยุกต์จากญานี ลีตะนันท์, 2541) นำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแลคติก

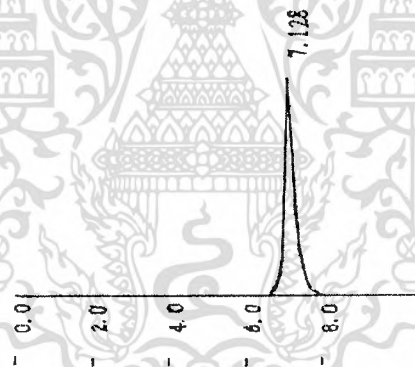
เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแลคติกความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วย HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์

ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดแลคติกโดยคำนวณความเข้มข้นของกรดแลคติกมาตรฐานที่มีหน่วยมิลลิโมลาร์เป็นหน่วยกรัมต่อลิตร



รูปที่ ข-2 แสดงกราฟมาตรฐานกรดแลคติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ตัวอย่างโครมาโตแกรมของกรดแลคติก



รูปที่ ข-3 แสดง โครมาโตแกรมของกรดแลคติกมาตรฐาน

3. วิธีคำนวณค่าจลนพลศาสตร์

3.1 ผลได้ (Yield; $Y_{x/s}$)

$$Y_{x/s} = \Delta x / \Delta s$$

Δx = ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้น

Δs = ปริมาณซับสเตรตที่ถูกใช้ไป

3.2 อัตราการผลิตของผลิตภัณฑ์ (Q_p)

$$Q_p = \Delta p / t$$

Δp = ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เผยแพร่เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการทดลอง

1. ผลการศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 และ *L. casei* TISTR 108 ในระดับฟลาस्क

ตารางที่ 1.1 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติกและน้ำตาลแลคโตสที่เหลือ จากการศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ในระดับฟลาस्क

ระยะเวลา หมัก (ชั่วโมง)	เซลล์อิสระเชื้อ <i>L. delbrueckii</i>		เซลล์ตรึงเชื้อ <i>L. delbrueckii</i>	
	ปริมาณกรด แลคติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาล แลคโตสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรด แลคติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาล แลคโตสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0	40	0	40
12	0.94	38.66	1.52	36.19
24	5.72	35.63	6.51	33.68
36	9.20	28.7	9.23	29.77
48	13.94	12.45	11.82	19.16
60	15.33	5.9	12.45	9.06
72	17.40	2.17	14.62	6.13
84	16.08	2.59	15.24	3.17
96	15.94	3.85	17.93	2.48
108	13.78	2.34	18.09	1.81
120	8.40	2.3	16.01	1.60

ตารางที่ 1.2 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติกและน้ำตาลแลคโตสที่เหลือ จากการศึกษการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ในระดับฟลาस्क

ระยะเวลา หมัก (ชั่วโมง)	เซลล์อิสระเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108		เซลล์ตรึงเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108	
	ปริมาณกรด แลคติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาล แลคโตสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรด แลคติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาล แลคโตสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0	40.00	0	40.00
12	2.49	35.48	2.17	38.92
24	7.47	29.57	4.29	31.03
36	10.26	20.39	7.43	24.16
48	13.66	11.80	10.54	15.62
60	15.61	5.17	12.41	7.23
72	17.93	2.35	16.15	3.20
84	16.94	1.93	18.19	2.59
96	16.32	2.02	20.76	1.96
108	16.02	1.81	19.95	2.03
120	11.55	1.95	16.57	1.90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพศดินจากใบกรูงเขมาเพื่อผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ในระดับฟลาสก์

ตารางที่ 2.1 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติก จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ โดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108

ความเข้มข้นเพศดิน (ร้อยละ)	หัวเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในสายยาง (ม.ม.)	ปริมาณกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 (กรัมต่อลิตร)											
			ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)											
			0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
3	3	0.89	0	1.31	2.14	4.20	6.72	9.95	11.71	13.55	16.28	15.33	10.99	
3	3	1.52	0	0.92	2.31	2.80	7.14	8.12	12.45	14.05	15.97	13.48	9.29	
3	3	2.02	0	1.38	2.39	3.67	6.41	7.46	10.15	11.88	14.36	11.75	10.21	
3	5	0.89	0	1.48	3.76	6.10	8.04	11.69	14.02	18.52	21.18	19.27	13.76	
3	5	1.52	0	1.34	4.50	5.45	8.22	9.73	13.82	18.91	20.03	16.21	13.19	
3	5	2.02	0	1.33	2.55	4.75	7.41	10.60	14.10	17.07	18.24	16.01	13.22	
3	7	0.89	0	2.59	4.11	8.30	10.66	16.61	19.05	20.09	23.38	21.07	17.35	
3	7	1.52	0	2.50	4.51	8.16	10.18	13.42	16.37	20.71	22.82	20.05	16.42	
3	7	2.02	0	1.31	2.29	4.40	7.54	8.63	12.70	18.38	20.07	19.45	17.81	
4	3	0.89	0	1.64	3.26	4.89	10.05	12.22	13.16	15.40	19.56	14.66	12.68	
4	3	1.52	0	1.61	3.46	7.74	10.01	11.42	12.60	17.92	18.71	14.16	11.53	
4	3	2.02	0	1.32	5.11	7.08	9.75	11.66	13.49	15.64	16.95	13.21	12.16	

ตารางที่ 2.1 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติก จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ โดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 (ต่อ)

ความเข้มข้น ขุ่นพดติน (ร้อยละ)	หัวเชื้อ เริ่มต้น (ร้อยละ)	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางภายใน สายยาง (ม.ม.)	ปริมาณกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 108 (กักริมต่อลิตร)											
			0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
4	5	0.89	0	1.35	3.42	4.23	9.20	15.15	17.91	20.27	24.96	19.56	19.12	
4	5	1.52	0	2.25	4.50	9.02	10.87	11.99	17.57	21.16	25.03	20.17	18.22	
4	5	2.02	0	2.30	6.19	8.78	11.66	12.48	15.42	18.35	21.25	17.32	13.40	
4	7	0.89	0	2.00	3.20	4.91	8.31	14.06	16.49	21.24	24.66	16.71	14.49	
4	7	1.52	0	2.58	4.61	7.58	10.11	13.16	16.98	19.24	23.29	20.66	18.74	
4	7	2.02	0	1.45	5.31	9.14	10.64	13.91	16.09	20.04	22.15	17.68	13.95	
5	3	0.89	0	1.29	2.38	3.29	7.10	9.15	13.42	15.22	17.81	13.01	10.58	
5	3	1.52	0	1.28	2.56	4.57	6.90	9.89	12.83	14.58	16.62	13.27	9.90	
5	3	2.02	0	1.42	4.15	6.32	8.85	12.74	15.73	17.42	15.15	13.55	11.17	
5	5	0.89	0	2.17	4.33	7.38	9.54	11.92	14.45	17.00	22.78	16.95	15.22	
5	5	1.52	0	1.64	2.86	5.14	8.25	11.67	14.07	18.19	22.57	20.46	14.67	
5	5	2.02	0	1.96	3.76	4.69	10.19	10.86	15.33	17.43	19.96	18.00	14.22	
5	7	0.89	0	1.23	4.02	7.92	7.80	11.92	13.51	16.00	21.31	16.43	15.05	
5	7	1.52	0	2.52	4.37	6.05	9.95	12.43	14.20	15.60	21.20	16.55	13.75	
5	7	2.02	0	1.93	5.19	7.60	9.40	13.95	16.06	18.84	20.48	18.34	15.44	

ตารางที่ 2.2 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาแลคโตสที่เหลือ จากการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ โดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108

ความเข้มข้น (ร้อยละ)	หัวเชื้อ เริ่มต้น (ร้อยละ)	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางภายใน สายยาง (ม.ม.)	ปริมาณน้ำตาแลคโตสที่เหลือของ <i>L. casei</i> TISTR 108 (กรัมต่อลิตร)											
			0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
3	3	0.89	40.00	38.67	32.93	23.64	14.73	7.23	4.28	3.09	2.23	2.00	1.69	
3	3	1.52	40.00	36.98	32.80	25.09	15.27	7.38	4.08	3.19	3.15	2.77	2.65	
3	3	2.02	40.00	38.56	34.02	28.70	18.68	10.28	8.00	2.31	2.00	1.84	1.78	
3	5	0.89	40.00	35.76	34.98	23.48	16.98	6.60	4.45	2.00	2.06	2.20	1.88	
3	5	1.52	40.00	36.87	34.02	25.66	18.73	9.73	5.06	2.17	2.02	1.88	1.86	
3	5	2.02	40.00	35.25	33.09	29.78	20.48	10.17	6.07	1.99	1.95	1.13	1.91	
3	7	0.89	40.00	37.97	29.45	23.98	13.09	4.51	5.57	2.17	1.82	2.28	1.94	
3	7	1.52	40.00	38.45	31.65	25.39	17.11	9.75	5.18	3.56	2.05	1.80	1.71	
3	7	2.02	40.00	35.23	29.18	25.16	19.91	7.77	4.34	2.95	2.26	1.94	2.12	
4	3	0.89	40.00	38.61	28.84	23.86	13.51	7.11	3.36	2.41	2.42	1.65	1.27	
4	3	1.52	40.00	34.84	31.63	29.18	14.70	6.37	3.98	2.27	2.07	1.78	1.98	
4	3	2.02	40.00	31.66	28.56	25.50	15.20	7.08	2.38	2.11	1.86	1.78	1.67	

ตารางที่ 2.2 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาแลคโตสที่เหลือ จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ โดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 (ต่อ)

ความเข้มข้นเพคติน (ร้อยละ)	หัวเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในสายยาง (ม.ม.)	ปริมาณน้ำตาแลคโตสที่เหลือของ <i>L. casei</i> TISTR 108 (กรัมต่อลิตร)											
			ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)											
			0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
4	5	0.89	40.00	38.15	36.95	30.95	17.93	3.42	5.33	2.15	1.64	1.85	1.83	
4	5	1.52	40.00	33.19	31.68	28.77	18.16	7.06	4.13	3.17	1.18	1.15	1.32	
4	5	2.02	40.00	34.76	30.65	23.80	19.02	12.73	5.20	1.99	1.75	1.75	1.93	
4	7	0.89	40.00	39.47	32.41	20.16	12.05	6.82	3.85	3.14	1.80	1.86	2.46	
4	7	1.52	40.00	38.95	31.52	22.50	16.16	3.00	3.67	2.08	1.65	1.82	2.00	
4	7	2.02	40.00	34.76	30.64	27.95	17.86	11.89	3.92	1.24	1.89	1.75	1.70	
5	3	0.89	40.00	39.28	37.98	25.70	17.93	3.07	3.59	2.13	1.94	1.82	1.80	
5	3	1.52	40.00	38.21	30.25	26.16	17.52	9.23	4.97	3.72	2.06	2.09	2.01	
5	3	2.02	40.00	34.30	26.11	17.80	14.52	9.45	2.67	2.06	1.78	1.89	2.23	
5	5	0.89	40.00	38.58	36.27	21.41	15.63	10.09	2.44	2.02	2.24	1.93	2.23	
5	5	1.52	40.00	39.74	33.28	24.93	17.75	7.78	2.94	1.78	1.78	1.74	1.97	
5	5	2.02	40.00	37.13	34.77	24.14	12.75	9.97	2.08	1.84	1.86	2.13	2.14	
5	7	0.89	40.00	36.56	34.36	22.84	15.53	8.11	3.00	1.80	1.81	1.84	1.72	
5	7	1.52	40.00	36.34	30.87	20.80	12.34	2.44	2.38	2.16	2.36	1.82	2.16	
5	7	2.02	40.00	37.46	32.45	22.93	17.80	4.10	4.72	2.07	1.79	1.88	2.14	

ตารางที่ 2.3 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติกจากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ โดยเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339

ความเข้มข้น สปอร์ (ร้อยละ)	หัวเชื้อ เริ่มต้น (ร้อยละ)	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางภายใน สายยาง (ม.ม.)	ปริมาณกรดแลคติกของ <i>L. delbrueckii</i> TISTR 1339 (กรัมต่อลิตร)											
			ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)											
			0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
3	3	0.89	0	0.53	1.65	5.06	6.06	7.66	10.71	13.66	15.41	15.41	13.09	
3	3	1.52	0	0.90	3.30	5.53	9.58	11.22	14.90	16.97	18.28	14.40	14.40	
3	3	2.02	0	0.66	1.83	2.56	4.46	10.56	12.18	13.74	15.04	13.61	15.83	
3	5	0.89	0	0.39	1.26	3.98	5.85	8.24	13.74	17.78	17.85	20.45	14.83	
3	5	1.52	0	0.69	1.72	5.79	9.00	11.99	11.77	18.45	19.92	19.27	16.91	
3	5	2.02	0	0.61	1.92	3.51	8.39	9.97	12.01	15.91	17.45	17.45	18.03	
3	7	0.89	0	0.91	1.57	5.76	10.61	13.85	14.82	17.15	18.30	20.25	13.29	
3	7	1.52	0	0.64	2.31	6.05	8.11	9.96	12.75	13.96	20.25	20.06	13.60	
3	7	2.02	0	0.83	2.64	4.93	6.98	8.29	9.95	15.74	16.91	19.05	15.21	
4	3	0.89	0	1.46	3.02	6.59	9.41	13.34	13.66	17.28	17.80	18.99	17.63	
4	3	1.52	0	1.87	2.00	7.71	9.02	9.91	13.04	15.96	16.91	17.91	13.13	
4	3	2.02	0	1.52	2.00	4.43	5.67	6.67	8.35	11.01	13.38	15.98	14.26	
4	5	0.89	0	2.03	3.72	9.63	10.57	13.35	14.26	16.28	20.06	21.35	17.30	
4	5	1.52	0	1.96	3.51	8.59	10.36	15.21	17.21	17.89	19.44	21.88	17.08	
4	5	2.02	0	1.48	2.81	4.77	7.25	13.39	14.85	16.76	17.63	19.16	18.36	

ตารางที่ 2.3 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลกติกจากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ โดยเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 (ต่อ)

ความเข้มข้นเพคติน (ร้อยละ)	หัวเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน (ม.ม.)	ปริมาณกรดแลกติกของ <i>L. delbrueckii</i> TISTR 1339 (กัมมัตถิตริ)											
			ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)											
			0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
4	7	0.89	0	3.22	3.98	9.69	12.30	15.08	16.91	18.54	20.14	21.50	18.54	
4	7	1.52	0	2.51	4.42	10.05	11.41	13.75	13.52	14.90	16.86	19.42	14.16	
4	7	2.02	0	1.42	3.56	6.92	8.88	11.13	13.42	14.76	16.33	18.66	14.68	
5	3	0.89	0	0.49	1.87	4.75	10.09	11.97	13.39	15.80	16.87	17.76	17.06	
5	3	1.52	0	1.30	5.55	8.20	8.82	12.04	13.62	16.24	17.42	16.39	16.60	
5	3	2.02	0	1.43	4.73	6.73	8.22	11.07	10.82	11.95	13.34	14.77	17.94	
5	5	0.89	0	0.56	3.54	5.73	10.08	12.38	13.22	17.10	17.75	20.58	17.34	
5	5	1.52	0	0.94	4.54	8.94	10.95	15.11	16.85	18.45	19.18	20.97	17.77	
5	5	2.02	0	0.87	2.24	8.46	10.32	12.35	13.81	17.58	18.29	19.77	16.25	
5	7	0.89	0	0.73	1.77	9.37	12.19	12.87	17.41	17.23	19.02	20.32	17.72	
5	7	1.52	0	1.09	3.54	11.90	13.00	15.34	17.07	19.02	19.77	21.18	19.10	
5	7	2.02	0	1.05	2.96	9.09	10.50	12.53	14.07	17.75	19.73	21.68	18.07	

ตารางที่ 2.4 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือ จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ โดยเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339

ความเข้มข้นเพคติน (ร้อยละ)	หัวเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน สายยาง (ม.ม.)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือของ <i>L. delbrueckii</i> TISTR 1339 (กรัมต่อลิตร)											
			ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)											
			0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
3	3	0.89	40	38.52	36.82	30.37	28.38	22.48	14.11	8.57	6.58	2.32	2.09	
3	3	1.52	40	37.33	34.36	31.16	27.43	23.77	13.2	8.27	2.16	1.97	1.93	
3	3	2.02	40	39.58	38.28	38.11	31.5	26.09	14.75	6.4	2.45	1.97	1.76	
3	5	0.89	40	36.1	29.08	27.27	23.2	11.7	5.85	2.89	1.99	1.98	2.07	
3	5	1.52	40	37.76	34.67	32.68	30.75	25.32	10.33	5.63	2.31	2.23	2.14	
3	5	2.02	40	38.01	36.72	34.07	33.75	25.66	15.02	4.53	2.87	2.57	1.03	
3	7	0.89	40	36.68	30.58	22.57	12.84	3.72	2.35	2.43	2.26	1.94	1.99	
3	7	1.52	40	35.32	33.89	30.34	21.57	10.09	3.33	2.54	1.98	1.93	2.27	
3	7	2.02	40	37.52	35.61	34.54	32.43	25.63	21.77	16.17	9.66	3.06	2.37	
4	3	0.89	40	39.12	30.44	28.22	23.23	14.14	4.49	2.4	2.01	2.14	1.93	
4	3	1.52	40	34.5	30.61	32.32	28.73	23.75	9.59	2.97	1.93	2.03	1.94	
4	3	2.02	40	38.3	36.88	36.61	31.75	23.82	11.02	3.78	2.25	2.21	2.11	
4	5	0.89	40	37.81	35.37	28.25	25.84	23.16	13.43	5.97	1.94	2.12	2.3	
4	5	1.52	40	37.5	34.5	33.89	26.89	19.2	6.48	3.03	1.95	2	1.93	
4	5	2.02	40	34.74	32.96	30.17	29.11	28.61	17.18	7.64	6.87	1.99	1.9	

ตารางที่ 2.4 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือ จากการศึกษาระยะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ โดยเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 1339 (ต่อ)

ความเข้มข้น ชนิดดิน (ร้อยละ)	หัวเชื้อ เริ่มต้น (ร้อยละ)	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางภายใน สายยาง (ม.ม.)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือของ <i>L. delbrueckii</i> TISTR 1339 (กรัมต่อลิตร)											
			ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)											
			0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
4	7	0.89	40	38.72	35.9	35.49	31.43	28.82	14.5	7.86	1.8	2.12	1.94	
4	7	1.52	40	38.14	35.49	32.11	30.89	27.05	16.07	8.69	2.26	2.09	1.89	
4	7	2.02	40	38.68	27.78	25.16	17.23	9.07	2.45	2.4	2.14	2.08	2.03	
5	3	0.89	40	39.86	39.1	29.56	19.27	10.39	2.78	2.3	2.1	2.05	2.05	
5	3	1.52	40	38.85	33.92	23.59	19.73	9.84	2.88	2.36	2.06	2.14	1.97	
5	3	2.02	40	37.27	25.5	17.26	8.02	2.89	2.22	2.45	2.09	2.18	1.9	
5	5	0.89	40	35.86	35.18	12.85	6.39	2.32	2.67	2.26	2.14	2.08	2.01	
5	5	1.52	40	32.83	29.56	18.75	8.43	2.78	2.44	2.4	2.49	2.56	2.03	
5	5	2.02	40	39.2	26.32	21.17	9.75	3.55	2.37	2.24	2.23	2.57	2.03	
5	7	0.89	40	34.67	28.16	15.51	5.57	3.91	2.29	2.48	2.14	2.16	2	
5	7	1.52	40	39.9	35.05	30.27	26.82	16.39	5.49	3.99	2.43	2.63	1.97	
5	7	2.02	40	39.7	38.8	30.95	24.82	15.55	4.09	2.62	2.18	2.24	1.97	

3. ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกของ *L. casei* TISTR 108 โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติกจากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ของ *L. casei* TISTR 108

การทดลองที่	พีเอชเริ่มต้น (X_1)	อุณหภูมิ (X_2)	อัตราการเข้า (X_3)	ปริมาณกรดแลคติกของ <i>L. casei</i> TISTR 108 (กรัมต่อลิตร)													
				ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)													
				0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120			
1	5.5	34	50	0	1.94	3.64	4.58	6.98	11.34	13.33	14.16	15.54	13.78	12.02			
2	5.5	34	150	0	2.82	4.77	6.19	12.32	18.44	24.51	26.69	23.43	21.24	21.78			
3	5.5	40	50	0	1.34	2.57	5.67	7.23	9.88	14.51	16.69	15.49	13.09	11.74			
4	5.5	40	150	0	2.97	4.8	8.32	13.11	18.96	21.07	27.48	26.91	24.29	21.77			
5	7.5	34	50	0	1.12	2.74	3.11	4.05	10.45	11.61	11.44	11.03	9.29	9.82			
6	7.5	34	150	0	2.31	3.01	4.19	7.32	14.48	22.42	22.76	20.07	17.69	15.91			
7	7.5	40	50	0	1.07	1.58	2.76	3.28	6.06	8.53	12.73	10.6	8.39	7.67			
8	7.5	40	150	0	1.96	3.09	4.96	7.54	10.85	18.06	19.99	20.12	18.56	15.64			
9	4.82	37	100	0	1.79	3.27	5.36	7.26	9.05	12.42	11.04	10.45	9.73	8.11			
10	8.18	37	100	0	0.78	0.94	1.23	1.51	1.46	2.55	4.88	5.36	6.63	5.88			
11	6.5	31.96	100	0	1.63	2.47	3.72	6.66	9.02	10.54	16.98	16.68	15.87	14.23			
12	6.5	42.04	100	0	1.95	4.53	6.92	9.06	15.32	20.43	23.26	21.67	19.78	17.21			
13	6.5	37	16	0	2.25	4.50	9.02	10.87	11.99	17.57	27.03	25.03	20.17	18.22			
14	6.5	37	184	0	2.94	6.38	15.94	17.21	20.85	27.82	25.21	24.03	21.87	18.65			

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติกจากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของ *L. casei* TISTR 108 (ต่อ)

การทดลองที่	พีเอชเริ่มต้น (X_1)	อุณหภูมิ (X_2)	อัตราการเข้า (X_3)	ปริมาณกรดแลคติกของ <i>L. casei</i> TISTR 108 (กรัมต่อลิตร)											
				ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)											
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120				
15	0	3.01	7.87	10.95	18.68	23.39	29.21	32.76	31.82	29.65	26.54				
16	0	2.95	6.94	11.36	16.34	21.87	27.96	33.01	30.65	27.94	25.76				
17	0	3.11	8.21	12.94	17.26	20.98	29.96	32.49	29.53	25.86	23.84				
18	0	2.61	7.32	10.71	17.87	26.86	28.43	31.82	30.75	26.92	22.96				
19	0	2.98	6.73	9.8	13.95	23.75	26.32	31.91	28.54	28.94	26.85				
20	0	2.75	7.11	10.99	16.31	23.29	27.55	31.31	29.46	27.27	25.93				

4. การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรงเขมา โดยเปรียบเทียบกับเพคตินทางการค้าและโซเดียมแอลจีเนตในระดับฟลาสก์

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลกติกของการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรงเขมา โดยเปรียบเทียบกับเพคตินทางการค้าและโซเดียมแอลจีเนต

ระยะเวลา หมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)				
	ชนิดของวัสดุตรึงเซลล์				
	เพคตินจาก ส้ม	เพคตินจาก แอปเปิล	เพคตินเกรด อุตสาหกรรม อาหาร	โซเดียม แอลจีเนต	สารสกัดหยาบ เพคตินจากใบ กรงเขมา
0	0	0	0	0	0
12	2.28	2.03	3.73	3.09	3.79
24	10.91	6.66	11.29	8.03	8.62
36	19.16	11.04	18.69	18.20	14.43
48	22.72	19.55	24.32	25.50	23.93
60	32.05	31.60	27.48	27.04	28.84
72	34.30	34.32	34.24	33.49	34.47
84	25.80	26.86	26.84	28.58	30.91
96	24.77	25.14	25.23	25.76	29.66
108	25.08	25.78	24.15	26.04	26.53
120	23.52	24.98	20.75	25.12	23.87

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือของการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์
ด้วยสารสกัดเพดตินหยาบจากใบกรุงเขมาโดยเปรียบเทียบกับเพดตินทางการค้าและ
โซเดียมแอลจิเนต

ระยะเวลา หมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)				
	ชนิดของวัสดุตรึงเซลล์				
	เพดตินจาก ส้ม	เพดตินจาก แอปเปิล	เพดตินเกรด อุตสาหกรรม อาหาร	โซเดียม แอลจิเนต	สารสกัดหยาบ เพดตินจากใบ กรุงเขมา
0	40	40	40	40	40
12	38.78	38.93	37.97	37.85	38.79
24	35.20	32.06	34.06	31.11	30.44
36	18.99	29.49	23.36	22.57	25.40
48	5.30	22.06	2.25	2.51	13.70
60	2.27	3.41	2.10	2.58	2.70
72	1.64	1.82	1.83	1.68	1.80
84	1.77	1.61	1.80	1.75	1.83
96	1.68	1.68	1.79	1.69	1.78
108	1.82	1.87	1.67	1.67	1.62
120	1.83	1.96	1.83	1.78	1.85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยแสดงค่าพีเอชของการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดเพคติน
หยาบจากใบกรูเมมา โดยเปรียบเทียบกับเพคตินทางการค้าและ โซเดียมแอลจีเนต

ระยะเวลา หมัก (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช				
	ชนิดของวัสดุตรึงเซลล์				
	เพคตินจาก ส้ม	เพคตินจาก แอปเปิล	เพคตินรวม	โซเดียม แอลจีเนต	สารสกัดหยาบ เพคติน
0	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
12	5.67	5.93	5.54	5.47	5.8
24	5.43	5.54	5.33	5.36	5.67
36	5.10	5.18	5.07	5.05	5.12
48	4.90	5.08	4.76	4.82	4.98
60	4.77	4.81	4.73	4.84	4.77
72	4.76	4.83	4.72	4.80	4.77
84	4.81	4.90	4.76	4.83	4.80
96	4.80	4.85	4.76	4.84	4.81
108	4.82	4.87	4.79	4.87	4.84
120	4.88	4.93	4.79	4.89	4.87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ผลการศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดเพคติน
หยาบจากใบกรูงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร

5.1 ผลการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสาร
สกัดเพคตินหยาบจากใบกรูงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ตารางที่ 5.1 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติกและปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือของการศึกษา
อัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัด
เพคตินหยาบจากใบกรูงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ระยะเวลา หมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)				ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือ(กรัมต่อลิตร)			
	อัตราการกวน (รอบต่อนาที)				อัตราการกวน (รอบต่อนาที)			
	50	100	120	150	50	100	120	150
0	0	0	0	0	40	40	40	40
12	6.41	2.58	3.22	9.28	33.27	33.95	29.24	32.64
24	14.20	8.94	10.40	13.96	21.14	26.29	20.77	24.72
36	28.40	24.14	28.16	29.05	1.64	7.94	3.56	3.66
48	24.40	31.36	32.39	25.83	1.48	2.42	1.72	2.28
60	23.63	26.94	28.99	22.94	1.35	2.12	1.64	2.39
72	23.89	24.52	29.76	21.92	1.56	1.83	1.89	2.24
84	21.62	23.02	28.51	22.21	1.44	1.68	1.90	1.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ผลการศึกษาศักยภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมาโดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อผลิตกรดแลคติก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ตารางที่ 5.2 แสดงจำนวนรอบของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมา กลับมาใช้ซ้ำ ปริมาณกรดแลคติกและปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือในถังหมักขนาด 2 ลิตร

จำนวน รอบ ที่หมัก	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)				ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือ(กรัมต่อลิตร)			
	ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)				ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)			
	0	12	24	36	0	12	24	36
1	0	10.01	18.22	28.55	40	30.12	18.31	1.57
2	0	20.32	28.92	28.64	40	24.82	3.40	1.94
3	0	19.81	25.05	27.05	40	20.23	2.55	1.82
4	0	17.10	22.10	26.43	40	14.32	2.05	1.64
5	0	16.31	18.73	25.87	40	11.36	1.73	1.58
6	0	13.35	23.75	22.72	40	19.64	1.73	1.61
7	0	19.68	21.92	20.99	40	10.50	1.55	1.49
8	0	10.96	19.50	21.64	40	19.94	1.65	2.01
9	0	14.80	19.68	20.72	40	13.61	1.91	1.75
10	0	12.55	20.96	20.23	40	17.65	1.96	1.52
11	0	14.20	19.82	18.13	40	14.24	1.82	1.61
12	0	9.95	16.10	15.97	40	13.87	2.01	1.43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ผลการศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของเชื้อ *L. casei* TISTR 108 และ *L. delbrueckii* TISTR 1339 ในระดับฟลาस्क

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lactic acid	Between Groups	20.398	3	6.799	15.938	0.001
	Within Groups	3.413	8	0.427		
	Total	23.811	11			
productivity	Between Groups	0.014	3	0.005	5.512	0.024
	Within Groups	0.007	8	0.001		
	Total	0.020	11			
yield	Between Groups	0.012	3	0.004	80.514	0.000
	Within Groups	0.000	8	0.000		
	Total	0.013	11			
lactose	Between Groups	3.171	3	1.057	0.174	0.911
	Within Groups	48.559	8	6.070		
	Total	51.730	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lactic acid

Duncan^a

factor	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
free cells of <i>L. delbrueckii</i>	3	17.400000	
free cells of <i>L. casei</i>	3	17.930000	
immobilized cells of <i>L. delbrueckii</i>	3	18.093333	
immobilized cells of <i>L. casei</i>	3		20.760000
Sig.		0.248	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

productivity

Duncan^a

factor	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
free cells of <i>L. delbrueckii</i>	3	0.460667	
immobilized cells of <i>L. delbrueckii</i>	3	0.474000	
free cells of <i>L. casei</i>	3	0.476333	
Immobilized cells of <i>L. casei</i>	3		0.546667
Sig.		0.538	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

yield

Duncan^a

factor	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
immobilized cells of <i>L. delbrueckii</i>	3	0.1677		
immobilized cells of <i>L. casei</i>	3		0.2160	
free cells of <i>L. delbrueckii</i>	3			0.2420
free cells <i>L. casei</i>	3			0.2490
Sig.		1.000	1.000	0.262

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Duncan^a

factor	N	Subset for alpha = 0.05
		1
free cells of <i>L. casei</i>	3	94.1200
free cells of <i>L. delbrueckii</i>	3	94.5767
immobilized cells of <i>L. casei</i>	3	95.0967
immobilized cells of <i>L. delbrueckii</i>	3	95.4767
Sig.		0.542

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมาเพื่อผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์

Tests of Between-Subjects Effects

Variable: lactic acid of *L. casei*

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	723.947 ^a	26	27.844	58.869	0.000
Intercept	33217.493	1	33217.493	70230.007	0.000
pectin	107.426	2	53.713	113.563	0.000
innoculum	477.640	2	238.820	504.925	0.000
innerdiameter	98.493	2	49.246	104.119	0.000
pectin * inoculum	25.657	4	6.414	13.561	0.000
pectin * innerdiameter	1.841	4	.460	.973	0.430
innoculum * innerdiameter	4.353	4	1.088	2.301	0.070
pectin * inoculum * innerdiameter	8.537	8	1.067	2.256	0.037
Error	25.541	54	0.473		
Total	33966.981	81			
Corrected Total	749.488	80			

a. R Squared = .966 (Adjusted R Squared = .950)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:lactic acid of *L. delbrueckii*

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	441.311 ^a	26	16.973	31.526	0.000
Intercept	28698.619	1	28698.619	53304.260	0.000
pectin	45.055	2	22.528	41.842	0.000
innoculum	47.414	2	23.707	44.033	0.000
innerdimeter	292.754	2	146.377	271.878	0.000
pectin * innoculum	8.234	4	2.059	3.824	0.008
pectin * innerdimeter	24.492	4	6.123	11.373	0.000
innoculum * innerdimeter	9.734	4	2.434	4.520	0.003
pectin * innoculum * innerdimeter	13.628	8	1.703	3.164	0.005
Error	29.073	54	0.538		
Total	29169.003	81			
Corrected Total	470.384	80			

a. R Squared = .938 (Adjusted R Squared = .908)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบ เพศตินจากใบกรูงเขมาเพื่อผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Change Statistics				
					R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	.950 ^a	0.903	0.886	2.898907	0.903	51.782	9	50	0.000

a. Predictors: (Constant), tempshak, phshake, phtemp, shakshak, shaking, temp, ph, temptemp, phph

b. Dependent Variable: response

ANOVA^b

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	3916.430	9	435.159	51.782	0.000 ^a
1 Residual	420.183	50	8.404		
Total	4336.613	59			

a. Predictors: (Constant), tempshak, phshake, phtemp, shakshak, shaking, temp, ph, temptemp, phph

b. Dependent Variable: response

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients		t	Sig.	95.0% Confidence Interval for B	
	B	Std. Error	Beta	Lower Bound			Upper Bound	
	(Constant)	32.159	0.683		47.112	0.000	30.788	33.530
	ph	-2.085	0.453	-0.203	-4.603	0.000	-2.994	-1.175
	temp	0.910	0.453	0.088	2.009	0.050	0.000	1.820
	shaking	2.843	0.453	0.276	6.277	0.000	1.933	3.752
	phph	-8.199	0.441	-0.826	-18.600	0.000	-9.084	-7.314
	temptemp	-3.900	0.441	-0.393	-8.847	0.000	-4.785	-3.014
	shakshak	-1.779	0.441	-0.179	-4.037	0.000	-2.665	-0.894
	phtemp	-0.600	0.592	-0.045	-1.014	0.315	-1.789	0.589
	phshake	-0.592	0.592	-0.044	-1.000	0.322	-1.780	0.597
	tempshak	-0.724	0.592	-0.054	-1.224	0.227	-1.913	0.464

a. Dependent Variable: response

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: response

Source	Type III Sum of				
	Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4307.473 ^a	13	331.344	523.061	0.000
Intercept	2879.206	1	2879.206	4545.126	0.000
ph	179.924	2	89.962	142.015	0.000
temp	60.518	2	30.259	47.767	0.000
shaking	663.359	2	331.679	523.591	0.000
phph	0.000	0	.	.	.
temptemp	0.000	0	.	.	.
shakshak	0.000	0	.	.	.
phtemp	8.640	1	8.640	13.639	0.001
phshake	8.402	1	8.402	13.263	0.001
tempshak	12.586	1	12.586	19.868	0.000
Error	29.140	46	0.633		
Total	35205.000	60			
Corrected Total	4336.613	59			

a. R Squared = 0.993 (Adjusted R Squared = 0.991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lack of Fit Tests

Dependent Variable:response

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lack of Fit	2.018	1	2.018	3.349	0.074
Pure Error	27.121	45	0.603		

4. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาโดยเปรียบเทียบกับ เพคตินทางการค้าและโซเดียมแอลจิเนตในระดับฟลาस्क

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
lactic acid	Between Groups	1.790	4	0.447	0.803	0.550
	Within Groups	5.572	10	0.557		
	Total	7.362	14			
productivity	Between Groups	0.000	4	0.000	0.805	0.549
	Within Groups	0.001	10	0.000		
	Total	0.001	14			
yield	Between Groups	0.001	4	0.000	0.326	0.854
	Within Groups	0.011	10	0.001		
	Total	0.013	14			
lactose	Between Groups	0.591	4	0.148	0.061	0.992
	Within Groups	24.200	10	2.420		
	Total	24.791	14			
pH	Between Groups	0.021	4	0.005	0.685	0.619
	Within Groups	0.076	10	0.008		
	Total	0.097	14			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lactic acid

Duncan^a

materials	N	Subset for alpha = 0.05
		1
sodium alginate	3	33.4900
pectin (food grade)	3	34.2400
citrus pectin	3	34.3000
apple pectin	3	34.3200
crude pectin extracts	3	34.4700
Sig.		0.170

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

productivity

Duncan^a

materials	N	Subset for alpha = 0.05
		1
sodium alginate	3	0.465100
pectin (food grade)	3	0.475600
citrus pectin	3	0.476433
apple pectin	3	0.476633
crude pectin extracts	3	0.478700
Sig.		0.170

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

yield

Duncan^a

materials	N	Subset for alpha = 0.05
		1
sodium alginate	3	0.874433
citrus pectin	3	0.894833
pectin (food grade)	3	0.897500
apple pectin	3	0.898967
crude pectin extracts	3	0.902467
Sig.		0.368

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Duncan^a

materials	N	Subset for alpha = 0.05
		1
pectin (food grade)	3	95.4133
apple pectin	3	95.4467
crude pectin extracts	3	95.4967
sodium alginate	3	95.7967
citrus pectin	3	95.9000
Sig.		0.730

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH

Duncan^a

materials	N	Subset for alpha = 0.05
		1
pectin (food grade)	3	4.7200
apple pectin	3	4.7600
crude pectin extracts	3	4.7700
sodium alginate	3	4.8000
citrus pectin	3	4.8300
Sig.		0.185

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ผลการศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบ
 เพศดินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร

5.1 ผลการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสาร
 สกัดหยาบเพศดินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
lactic acid	Between Groups	31.993	3	10.664	26.278	0.000
	Within Groups	3.247	8	0.406		
	Total	35.239	11			
productivity	Between Groups	0.055	3	0.018	77.412	0.000
	Within Groups	0.002	8	0.000		
	Total	0.057	11			
yied	Between Groups	0.020	3	0.007	8.160	0.008
	Within Groups	0.007	8	0.001		
	Total	0.027	11			
lactose	Between Groups	49.090	3	16.363	7.713	0.010
	Within Groups	16.971	8	2.121		
	Total	66.061	11			

yied

Duncan^a

rpm	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50.00	3	0.7405	
150.00	3		0.7999
100.00	3		0.8347
120.00	3		0.8462
Sig.		1.000	0.096

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

lactic acid

rpm	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50.00	3	28.4000	
150.00	3	29.0500	
100.00	3		31.3600
120.00	3		32.3900
Sig.		0.247	0.083

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

productivity

Duncan^a

rpm	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
100.00	3	0.6533	
120.00	3	0.6748	
50.00	3		0.7888
150.00	3		0.8070
Sig.		0.125	0.185

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Duncan^a

rpm	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
150.00	3	90.8533	
100.00	3		93.9500
120.00	3		95.7000
50.00	3		95.9000
Sig.		1.000	0.154

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ผลการศึกษาศักยภาพของเซลล์รีดิวซ์สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาโดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อผลิตกรดแลกติก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
lactic acid	Between Groups	570.189	11	51.835	107.165	0.000
	Within Groups	11.609	24	0.484		
	Total	581.797	35			
productivity	Between Groups	0.440	11	0.040	106.999	0.000
	Within Groups	0.009	24	0.000		
	Total	0.449	35			
yield	Between Groups	0.396	11	0.036	49.352	0.000
	Within Groups	0.017	24	0.001		
	Total	0.413	35			
lactose	Between Groups	6.654	11	0.605	0.274	0.985
	Within Groups	52.910	24	2.205		
	Total	59.564	35			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lactic acid

Duncan^a

cycle	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
cycle12	3	15.9700						
cycle11	3		18.1300					
cycle10	3			20.2300				
cycle9	3			20.7200				
cycle7	3			20.9900	20.9900			
cycle8	3				21.9733	21.9733		
cycle6	3					22.7200		
cycle5	3						25.8700	
cycle4	3						26.4300	
cycle3	3						27.0500	
cycle1	3							28.5500
cycle2	3							28.6400
Sig.		1.000	1.000	0.218	0.096	0.201	0.060	0.875

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

productivity

Duncan^a

cycle	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
cycle12	3	0.443667						
cycle11	3		0.503700					
cycle10	3			0.562067				
cycle9	3			0.575700				
cycle7	3			0.583167	0.583167			
cycle8	3				0.610500	0.610500		
cycle6	3					0.631000		
cycle5	3						0.718667	
cycle4	3						0.734200	
cycle3	3						0.751433	
cycle1	3							0.793033
cycle2	3							0.795467
Sig.		1.000	1.000	0.218	0.096	0.206	0.060	0.879

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

yield

Duncan^a

cycle	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
cycle12	3	0.414400						
cycle11	3		0.472500					
cycle10	3			0.526033				
cycle9	3			0.542167	0.542167			
cycle7	3			0.545533	0.545533	0.545533		
cycle8	3				0.578500	0.578500		
cycle6	3					0.592100		
cycle5	3						0.673967	
cycle4	3						0.689300	
cycle3	3						0.708767	0.708767
cycle1	3							0.743233
cycle2	3							0.752533
Sig.		1.000	1.000	0.413	0.131	0.056	0.148	0.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lactose

Duncan^a

cycle	N	Subset for alpha = 0.05
		1
cycle8	3	94.9767
cycle2	3	95.1533
cycle3	3	95.4533
cycle9	3	95.6267
cycle4	3	95.9000
cycle11	3	95.9767
cycle6	3	95.9800
cycle5	3	96.0533
cycle1	3	96.0667
cycle10	3	96.2000
cycle7	3	96.2800
cycle12	3	96.4267
Sig.		0.314

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวอรทัย วิไลวัลย์
 วัน/เดือน/ปีเกิด 13 ธันวาคม 2527
 ภูมิลำเนา จังหวัดฉะเชิงเทรา
 ที่อยู่ปัจจุบัน 368 หมู่ 7 ตำบลเกาะขนุน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา 24120
 ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ตะวันออก
 ปีการศึกษา 2549



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้