สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสท เพื่อผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

Utilization of sugarcane molasses and yeast autolysate for lactic acid production by *Lactobacillus casei* TISTR 1341

T117253

นายณัฐกานต์ วรกุล

นางสาวทิพย์นภา โดน้อย

นายทิวากร ศิริพงษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
เลขทะเบียน 117253
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ค. 2554

b 10338886
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

UTILIZATION OF SUGARCANE MOLASSES AND YEAST AUTOLYSATE FOR LACTIC ACID PRODUCTION BY *Lactobacillus casei* TISTR 1341

NUTTAKAN WARAKUL

THIPNAPA DOUGHNOI

THIWAKORN SIRIPHONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสท เพื่อผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

นักศึกษา	นายณัฐกานต์	วรกุล	รหัสนักศึกษา	50050707
	นางสาวทิพย์นภา	โดน้อย	รหัสนักศึกษา	50050718
	นายทิวากร	ศิริพงษ์	รหัสนักศึกษา	50050719

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.สุขใจ ชูจันทร์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการตรวจสอบ	**ลายมือชื่อ**
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล
ผศ.ลินจง สุขลำภู	ลินจง สุขลำภู
รศ.สุขใจ ชูจันทร์	สุขใจ ชูจันทร์

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

ประธานสาขาวิชาชีววิทยา

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสท เพื่อผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341			
นักศึกษา	นายณัฐกานต์	วรกุล	รหัสนักศึกษา	50050707
	นางสาวทิพย์นภา	โดน้อย	รหัสนักศึกษา	50050718
	นายทิวากร	ศิริพงษ์	รหัสนักศึกษา	50050719
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์			
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ			
ปีการศึกษา	2553			
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.สุขใจ ชูจันทร์			

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลเพื่อผลิตยีสต์ออโตไลเสท โดยใช้เชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์คือ *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046, *Saccharomyces cerevisae* (Baker's yeast), *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059 เพื่อหาสายพันธุ์และสูตรอาหารที่เหมาะสม พบว่าสายพันธุ์ที่เหมาะสมคือ *Candida utilis* TISTR 5001 ในอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 47.79 % และจากการศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสทเพื่อผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 โดยศึกษาแหล่งคาร์บอนในน้ำตาลกลูโคสและกากน้ำตาล และศึกษาแหล่งไนโตรเจนในยีสต์สกัดและยีสต์ออโตไลเสท พบว่ากากน้ำตาลที่มีปริมาณ 40 กรัมต่อลิตรน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 53.79 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิต 4.45 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น และอัตราการผลิต 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 96 ของระยะเวลาการหมัก จากนั้นศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในอาหารสังเคราะห์ระดับฟลาสก์ 2 ลิตร และถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร พบว่าในระดับถังหมักให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุด โดยผลิตกรดแลคติกได้ 74.12 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 9.62 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.70 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 84

คำสำคัญ : ยีสต์ออโตไลเสท, *Lactobacillus casei* TISTR 1341, *Candida utilis* TISTR 5001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Utilization of sugarcane molasses and yeast autolysate for lactic acid production by *Lactobacillus casei* TISTR 1341	
Name	Mr. Nuttakan	Warakul
	Miss Thipnapa	Doughnoi
	Mr. Thiwakorn	Siriphong
Department	Applied Biology	
Program	Biotechnology	
Academic Year	2010	
Special Project Advisor	Associate Professor Sukjai Choojun	

ABSTRACT

Utilization of sugarcane molasses for yeast autolysate production was studied. Four strains of yeast, *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046, *Saccharomyces cerevisae* (Baker's yeast) and *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059, were used to determine the suitable strain and medium. The result showed that the suitable strain was *Candida utilis* TISTR 5001 in Modiefied medium with 47.79 % of the protein content. Utilization of sugarcane molasses and yeast autolysate for lactic acid production by *Lactobacillus casei* TISTR 1341 was studied by focusing on a carbon source in glucose and molasses solution and nitrogen source in yeast extract and yeast autolysate. The result showed that molasses solution with 40 g/l sugar concentration is the most suitable carbon source and 10 g/l of yeast extract is the most suitable nitrogen source. The lactic acid concentration was 53.79 g/l at 96 hr of fermentation time. Yield and productivity were 4.45 g/g and 0.56 g/lhr respectively. The efficiency of lactic acid production in 2 liters flask and 2 liters fermentor were investigated subsequently. The result presented that the fermentation in 2 liters fermentor showed higher yield of lactic acid. The lactic acid concentration, yield and productivity rate were 74.12 g/l, 9.62 g/g substrate and 0.70 g/lhr respectively at 84 hr of fermentation time

Keywords : yeast autolysate, *Lactobacillus casei* TISTR 1341, *Candida utilis* TISTR 5001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษซึ่งโครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ การตอบข้อซักถามของผู้จัดทำ และช่วยปรับปรุงข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทำการทดลอง จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการ และ ผศ.ลินจง สุขลำภู กรรมการ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และช่วยปรับปรุงข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำสั่งสอนตลอดจนเป็นที่ปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดา มารดาของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนส่งเสริมการศึกษาของข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่มีความสนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ณัฐกานต์ วรกุล

ทิพย์นภา โดน้อย

ทิวากร ศิริพงษ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1ยีสต์ออโตไลเสท	3
2.1.1 ยีสต์ออโตไลเสท	3
2.1.2 การผลิตยีสต์ออโตไลเสท	3
2.1.3 กระบวนการผลิตยีสต์ออโตไลเสท	4
2.2 กรดแลคติก	5
2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก	10
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *Lactobacillus*	13
2.5 กากน้ำตาล	16
2.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	27
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	27
3.2 สารเคมี	28
3.3 วัตถุดิบ	28
3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย (ต่อ)

3.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน 29

3.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น 29

3.6 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมของยีสต์ 4 สายพันธุ์ 30

3.7 การศึกษาการผลิตโปรตีนสูงสุดของยีสต์ 4 สายพันธุ์ และการผลิตยีสต์สกัด (yeast autolysate) เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 30

3.8 การเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดโดยเทคนิคออโตไลเสท 31

3.9 การศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 31

3.10 การศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในระดับ ฟลาสก์ 2 ลิตรกับถังหมัก 2 ลิตร 34

3.11 การวิเคราะห์ผล 34

3.12 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ 35

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 36

4.1 ผลการศึกษาการผลิตโปรตีนสูงสุดของยีสต์ 4 สายพันธุ์ และการผลิตยีสต์สกัด (yeast autolysate) เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 36

4.2 ผลศึกษาแหล่งคาร์บอนราคาถูกโดยใช้กากน้ำตาลเปรียบเทียบระหว่างอาหารสังเคราะห์เพื่อผลิตกรดแลคติก 37

4.3 ผลการศึกษา แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบระหว่างยีสต์สกัดกับยีสต์ออโตไลเสทในอาหารสังเคราะห์ 39

4.4 ผลการศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในระดับ ฟลาสก์ 2 ลิตรกับถังหมัก 2 ลิตร 45

บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ 47

เอกสารอ้างอิง 48

ภาคผนวก ก 54

ภาคผนวก ข 57

ภาคผนวก ค 68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก 6

3.1 อาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ 32

4.1 แสดงการเปรียบเทียบผลการศึกษาการผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 4 สายพันธุ์ 37
ในอาหาร MM และ YM เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนสูงสุดโดยเทคนิค Autolysis

4.2 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นกรดแลคติก 41
และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ(ร้อยละ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 3 ถึง สูตรที่ 8

4.3 แสดงการเปรียบเทียบผลได้ และอัตราการผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ถึงสูตรที่ 8 43

4.4 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นกรดแลคติก 43
และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร 1, 2 และ 4

4.5 แสดงการเปรียบเทียบผลได้ และอัตราการผลิต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร 1, 2 และ 4 44

4.6 แสดงค่า P- value การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ผลได้ 46
อัตราการผลิต และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ในระดับฟลาสก์และถังหมัก 2 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

ภาพที่ **หน้า**

2.1 กระบวนการผลิตยีสต์สกัดทางการค้า 4

2.2 โครงสร้างของกรดแลคติกชนิด L(-)lactic acid และชนิด D(-)lactic acid 6

2.3 โครงสร้างทางเคมีของกรดพอลิแลคติกแอซิด 7

2.4 แสดงรูปร่างของเชื้อ Lactobacillus casei 12

2.5 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวดันสูง (HPLC) 24

4.1 กราฟแสดงแนวโน้มของความเข้มข้นกรดแลคติก ความเข้มข้นน้ำตาล และพีเอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1 และ สูตร 2 เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง 39

4.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดแลคติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ถึงสูตรที่ 8 เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง 42

4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาล ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ถึงสูตรที่ 8 เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง 42

4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดแลคติก และความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร 1, 2 และ 4 เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง 44

4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดแลคติก และความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือในระดับฟลาสก์ และระดับถังหมัก ขนาด 2 ลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีการนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในด้านเภสัชกรรม อาหาร อุตสาหกรรมเคมี และเครื่องสำอาง โดยนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความเป็นกรด (acidulant) สารกันบูดในอาหาร (preservative) และเป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) เช่น Poly- (Lactic acid) หรือ PLA โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารนั้น กรดแลคติกถือได้ว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นตัวช่วยเพิ่มกลิ่นและรสของอาหาร ช่วยควบคุมความเป็นกรดด่าง ยืดอายุการเก็บอาหาร โดยช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการงอกของสปอร์ ใช้เพิ่มประสิทธิภาพของสารป้องกันการหืนและช่วยปรับปรุงลักษณะของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เป็นต้น (ศิวาพร, 2546)

กรดแลคติกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพโดยการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการผลิตทางเคมีนั้นจะให้กรดแลคติกที่อยู่ในรูปผสม (DL-lactic) ทำให้มีความยุ่งยากในการทำให้บริสุทธิ์และเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่การผลิตทางชีวภาพจะให้กรดแลคติกที่อยู่ในรูป D-lactic หรือ L-lactic โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิต (Altaf และคณะ, 2005) ซึ่งกระบวนการทางชีวภาพเป็นวิธีการผลิตที่นิยมกว่า เพราะจุลินทรีย์ชนิดโฮโมแลคติก (homolactic microorganisms) มีความสามารถผลิตกรดแลคติกได้อย่างรวดเร็วและได้กรดที่บริสุทธิ์อยู่ในรูปของน้ำเชื่อม (syrup liquid) (Mossel, 1989 ; Ahmad และ Marth, 1989 ; Prescott และคณะ, 2008) นอกจากนี้การผลิตทางชีวภาพยังสามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่น เวย์ กากน้ำตาล แป้ง น้ำตาลจากอ้อย หรือหัวบีท และวัตถุดิบอื่นๆที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อลดต้นทุนในการผลิตได้ (Khalaf, 2001; Martak และคณะ, 2003)

การนำวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรมาใช้ในการผลิตกรดแลคติกเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นการลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและลดต้นทุนในการผลิต เพราะมีราคาถูกหรือไม่มีมูลค่า (John และคณะ, 2006) ดังนั้นการทดลองนี้จึงนำวัสดุเหลือใช้ คือ กากน้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการนำกากน้ำตาลมาใช้เลี้ยงเซลล์ยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อนำเซลล์ยีสต์นั้นมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูก ในการผลิตกรดแลคติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 และศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์กับระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อผลิตกรดแลคติกโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากเซลล์ยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

1.2.2 ศึกษาหาสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนสูง เพื่อใช้ผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

1.2.3 ศึกษาปริมาณของสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสม เพื่อผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

1.2.4 ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์กับระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.3 ขอบเขตโครงงานพิเศษ

ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้สารสกัดจากเซลล์ยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ศึกษาชนิดของเซลล์ยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนสูง และศึกษาปริมาณของสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสมเพื่อใช้เสริมแหล่งไนโตรเจนจากสูตรอาหารดัดแปลง นำสูตรอาหารที่ดีที่สุดมาเปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์ เพื่อใช้ผลิตกรดแลคติก เปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์กับระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาลและสารสกัดจากเซลล์ยีสต์เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูก เป็นการลดต้นทุนในการผลิตกรดแลคติก

1.4.2 ทราบถึงศักยภาพของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 เพื่อผลิตกรดแลคติก

1.4.3 สามารถประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อผลิตในเชิงพาณิชย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ยีสต์ออโตไลเสท (yeast autolysate)

2.1.1 ยีสต์ออโตไลเสท

ยีสต์ออโตไลเสทเป็นยีสต์สกัดประเภทหนึ่ง ได้จากการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของยีสต์ (Hough และ Maddox, 1970) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ย่อยสลายโปรตีนที่ละลายได้ และผนังเซลล์ ส่วนของผนังเซลล์จะทำให้เวลาใช้งานจะได้สารละลายที่ขุ่น ในกระบวนการผลิตสามารถแยกเอาส่วนของผนังเซลล์ที่ไม่ละลายออกได้ด้วยการกรอง ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการแยกเอาผนังเซลล์ออกอาจเรียกว่า ออโตไลซ์ยีสต์ (autolyzed yeast) ซึ่งประกอบด้วยผนังเซลล์ 50% ของปริมาณของแข็งทั้งหมด ส่วนผลิตภัณฑ์ที่แยกเอาผนังเซลล์ออกแล้วเรียกว่า autolyzed yeast extract (Dziezak, 1987) กลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทจะอ่อนกว่ากลิ่นรสของยีสต์สกัดเมื่อเปรียบเทียบที่ปริมาณเท่ากัน เนื่องจากในยีสต์ออโตไลเสทจะมีผนังเซลล์อยู่ด้วย (Reed และ Nagodawitthana, 1991)

2.1.2 การผลิตยีสต์ออโตไลเสท

ยีสต์ที่สามารถผลิตเป็นยีสต์ออโตไลเสท ได้แก่ ยีสต์ในสกุล *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torula*, *Zymomonas* และ *Pichia* (Potman และ Wesdrop, 1994)

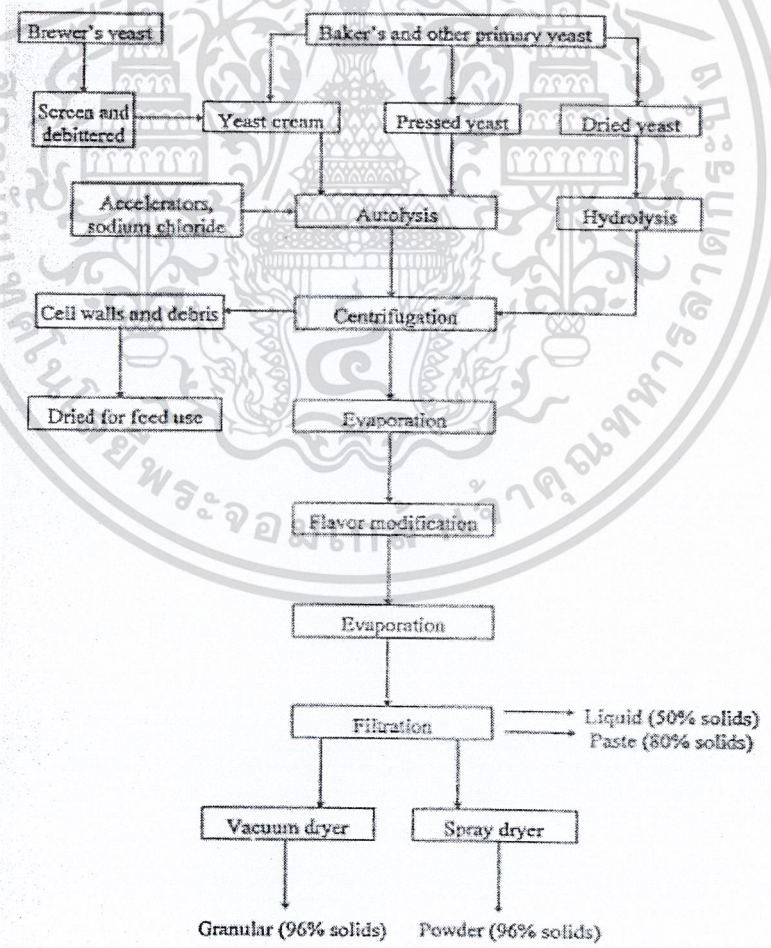
แหล่งที่มาของยีสต์มีความสำคัญต่อปริมาณผลได้ที่สกัดได้ ในการผลิตยีสต์ออโตไลเสท วัตถุดิบที่ใช้อาจเป็น primary grown yeast คือยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*) หรือเป็น secondary yeast คือ ยีสต์ *S. uvarum* ที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (spent brewer's yeast) ในยุโรปจะนิยมใช้ยีสต์ขนมปังมากกว่า เพราะจะให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่ายีสต์อื่นๆ และสามารถเลี้ยงได้ในกากน้ำตาล ส่วนยีสต์จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์จะนำมาผลิตเป็นยีสต์ออโตไลเสทในบางประเทศ เช่น อังกฤษและสหรัฐอเมริกา

ปัจจัยที่มีผลต่อการเลือกวัตถุดิบในกระบวนการผลิต ได้แก่ ราคา คุณค่าของยีสต์ คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ต้องการ เช่น ลักษณะกลิ่นรส และสี เป็นต้น โดยทั่วไปจะใช้ primary grown yeast มากกว่ายีสต์ที่ได้จากอุตสาหกรรมเบียร์ การทำยีสต์ออโตไลเสทเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับยีสต์วัตถุดิบ และยีสต์ที่นำมาใช้ผลิตยีสต์ออโตไลเสททั้ง 2 แหล่งได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (GRAS) (Nlumthanorm, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 กระบวนการผลิตยีสต์ออโตไลเสท

การผลิตยีสต์ออโตไลเสทเป็นวิธีการผลิตยีสต์สกัดที่ให้ปริมาณเกลือโซเดียมต่ำ เป็นที่ยอมรับกันในอุตสาหกรรมอาหาร (Reed และ Nagodawithana, 1991) กระบวนการผลิตยีสต์ออโตไลเสทเป็นดังรูปที่ 2.1 เริ่มจากเตรียมยีสต์ครีม (yeast cream) หรือ slurry ที่มียีสต์เซลล์ร้อยละ 15-20 พลาสโมไลซ์ด้วยเกลือร้อยละ 2-5 ปรับอุณหภูมิ 45-60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12-36 ชั่วโมง หรือจนกระทั่ง ค่าพีเอชสารละลายลดลงเป็น 5.0-5.5 นำยีสต์ออโตไลเสทที่ได้มาพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส ลดอุณหภูมิ แยกส่วนของเซลล์ที่ไม่ละลาย (cell debris) ออกโดยการเหวี่ยงแยกหรือการกรอง ของเหลวที่ได้จะทำให้เข้มข้นจนมีปริมาณของแข็งเป็นร้อยละ 70-80 หรือทำเป็นผงแห้งที่มีความชื้นร้อยละ 3-5 นอกจากนี้อาจทำยีสต์ออโตไลเสทผงโดยที่ไม่มีการแยกเซลล์ยีสต์ที่ไม่ละลายออกจากผลิตภัณฑ์ยีสต์ออโตไลเสทที่ได้จากวิธีการผลิตทั้งสองชนิดจะมีองค์ประกอบทางเคมี กลิ่นรส และการใช้ประโยชน์แตกต่างกัน (Nagodawithana, 1994 ; Albercht และ Delndoerfer, 1996 ; Chao, McCarthy และ McConaphy, 1980)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1 กระบวนการผลิตยีสต์สกัดทางการค้า (Peppler, 1982)

2.2 กรดแลคติก (Lactic acid)

2.2.1 ความสำคัญของกรดแลคติก

กรดแลคติกหรือกรดนมได้มีการค้นพบครั้งแรก โดย Scheele นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดนในปี ค.ศ.1780 ในนมเปรี้ยวและได้ตั้งชื่อว่า Mjolksyra เป็นกรดชนิดแรกที่มีการนำมาใช้ในอาหาร พบตามธรรมชาติในนมเปรี้ยว กะหล่ำปลี ผักดองชนิดต่างๆ เบียร์ และเนยแข็ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในเลือด และกล้ามเนื้อของสัตว์ด้วย (Gradner, 1972)

กรดแลคติกมีคุณสมบัติดูดความชื้นได้ง่ายอาจอยู่ในรูปเป็นผลึก หรือของเหลวข้น ไม่มีสี มีกลิ่นครีมอ่อนๆ ละลายน้ำได้ดี ให้รสเปรี้ยวปานกลาง ในระดับอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้กรดแลคติกเป็นสารช่วยให้ความเป็นกรด เป็นวัตถุกันเสียเป็นส่วนผสมของสารที่ใช้ในการหมักเชื้อ เป็นสารให้กลิ่นรส เป็นสารช่วยเน้นกลิ่นรส ช่วยควบคุมความเป็นกรด ความเป็นด่าง และเป็นตัวทำละลาย เป็นต้น (FDA, 1988) ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้กรดแลคติก ได้แก่ แยม เยลลี่ เชอร์เบต ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน และเครื่องดื่มชนิดต่างๆ ซอส และผักดอง เป็นต้น (ศิวาพร, 2546)

สำหรับแคลเซียมแลกเตต มีการใช้ในผลิตภัณฑ์ผักผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพ็กติน ทำให้ผักและผลไม้มีความคงตัวมากขึ้น ช่วยเปลี่ยนแปลงสี กลิ่น รส ของผักและผลไม้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป โดยการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะที่ปนเปื้อนมาช่วยทำให้เกิดเจลดีขึ้นในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ช่วยปรับปรุงคุณภาพนมผง นมข้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมสำหรับผู้ป่วยที่ขาดแคลเซียมด้วย โดยอาจจะเสริมในนม น้ำผลไม้ หรืออาหารอื่นๆ หรืออาจบริโภคในรูปแลกเตตได้เลย ส่วนผู้ขาดเหล็ก สังกะสี และแมกนีเซียมก็สามารถบริโภคอาหารที่มีการเสริมด้วยเฟอรัสแลกเตต (ferrous lactate) ซิงค์แลกเตต (zinc lactate) และแมกนีเซียมแลกเตต (magnesium lactate) สำหรับในผลิตภัณฑ์ปลา เนื้อ และสัตว์ปีก มีการใช้แลคติกหรือเกลือแลกเตตช่วยในการยืดอายุเก็บด้วย (Dailey และคณะ, 2000)

อนุพันธ์ของกรดแลคติก เช่น lactylated mono-and diglycerides of fatty acid นิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ ขนมอบ โดยเฉพาะในแป้งสำเร็จรูปและเนยขาว เป็นต้น ส่วน calciumstearyl-2-lactylate นิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมปัง (FDA, 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 คุณสมบัติของกรดแลคติก

2.2.2.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

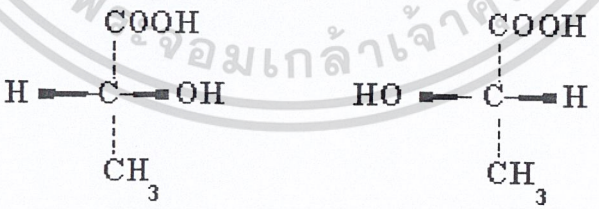
ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก

ลำดับ	คุณสมบัติทางกายภาพ	กรดแลคติก
1	น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)	90.08
2	จุดหลอมเหลว (Melting point)	16.8 องศาเซลเซียส
3	จุดเดือด (Boiling point)	82องศาเซลเซียส ที่ความดัน 0.5 มิลลิเมตรปรอท 122องศาเซลเซียส ที่ความดัน 14 มิลลิเมตรปรอท
4	ค่าคงที่ของการแตกตัว (K_a ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)	$1.37x10^{-4}$
5	ค่าความร้อนของการเผาไหม้ (ΔH_c)	1361 กิโลจูล/โมล
6	ค่าความร้อนจำเพาะ (C_p ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส)	190 จูล/โมล/องศาเซลเซียส

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

2.2.2.2 คุณสมบัติทางเคมี

กรดแลคติกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanic acid หรือ 2-hydropropionic acid สูตรโมเลกุล $C_3H_6O_3$ ซึ่งมี 2 ไอโซเมอร์ คือ ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของกรดแลคติกชนิด L(-)lactic acid และชนิด D(-)lactic acid

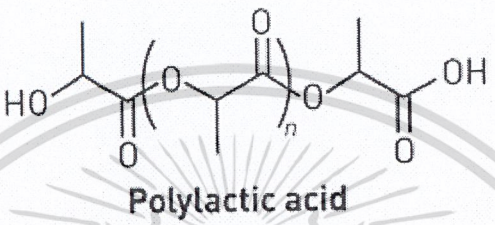
ที่มา : http://www.lactospore.com/back.htm

การเปลี่ยนรูปของ D(-)lactic acid และ L(-)lactic acid เกิดจากการหมุนของเอทิลีนออกไซด์บริดจ์ (ethylene oxide bridge) ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่หนึ่งและอะตอมที่สองโดยเกิด tuatomeric shift ของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) บนคาร์บอนอะตอมที่สองไปเป็นหมู่คาร์บอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิล (carbonyl group) ของคาร์บอกซิล (carboxyl) กรดแลคติกที่มีความบริสุทธิ์สูง จะไม่มีสารปนเปื้อน กรดแลคติกสามารถละลายน้ำ เอทานอล อะซีโตน อีเทอร์ และไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์ คาร์บอนซัลไฟด์ (Narayanan และคณะ, 2004)

พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid) เกิดจากกรดแลคติกรวมกันหลายๆ โมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของกรดพอลิแลคติกแอซิด

ที่มา : http://www.metaefficient.com/bioplastics/stronger-bioplastic-developed-kenaf-polylactic-acid-pla.html

กรดแลคติกที่สิ่งมีชีวิตผลิตได้จะมีปริมาณความเข้มข้นต่ำ โดยกรดแลคติกความเข้มข้นสูงเป็นอันตรายต่อร่างกายทั้งภายนอกและภายใน เมื่อสัมผัสกับผิวหนังจะมีลักษณะของแผลเหมือนถูกไฟลวก เมื่อกรดแลคติกถูกดวงตาสามารถทำให้ตาบอดได้ ในกรณีที่กรดถูกดวงตาหรือผิวหนัง ควรล้างออกด้วยน้ำหลายๆ ครั้ง การผลิตกรดแลคติกสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ วิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ

2.2.3 กระบวนการผลิตกรดแลคติก

2.2.3.1 กระบวนการผลิตกรดแลคติกทางเคมี ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> นำไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) ทำปฏิกิริยากับอะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ได้แลกโทรไนไตร (lactonitrile) ทำปฏิกิริยาที่ความดันบรรยากาศดังแสดงในสมการที่ 2.1

$$CH_3CHO \quad - \quad HCN \longrightarrow CH_3CHOHCN \qquad \text{.....(2.1)}$$

acetadehyde hydrogen cyanide lactonitrile

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> นำแลกโทรไนไตร มาย่อยด้วยไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟิวริก จะได้กรดแลคติก และเกลือแอมโมเนียม ซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง ดังแสดงในสมการที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$CH_3CHOHCN + H_2O + ½\ H_2SO_4 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + ½\ (NH_4)_2SO_4$ .....(2.2)

lactonitrile water sulphuric acid lactic acid ammonium salt

ขั้นตอนที่ 3 นำกรดแลคติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำอนุพันธ์เอสเทอร์ คือ เมทิลแลกเตต นำเมทิลแลกเตตมากลั่น แล้วนำมาย่อยจะได้กรดแลคติก ส่วนเมทานอล ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) และสารปนเปื้อนอื่นๆ จะถูกกำจัดออกโดยนำผ่านถ่านกัมมันต์และวิธีแลกเปลี่ยนไอออน (ionexchange) ดังแสดงในสมการที่ 2.3 และ 2.4

$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOHCOOH_3 + H_2O$ .....(2.3)

Lactic acid methanol methyl lactate water

ขั้นตอนที่ 4

$CH_3CHOHCOOH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$ .....(2.4)

Methyl lactate water lactic acid methanol

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

2.2.3.2 กระบวนการผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกมี 2 ชนิด คือ โฮโมแลคติกแบคทีเรีย (Homolactic bacteria) และเฮทเทอร์โรแลคติกแบคทีเรีย (Heterolactic bacteria) ซึ่งขั้นตอนในการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ แสดงในสมการที่ 2.5 และ 2.6 (Muller, 2001)

Homofermentative

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH$ .....(2.5)

Heterofermentative

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH + CH_2OH + CO_2$ .....(2.6)

ที่มา : Muller (2001)

นอกจากนี้ กรดแลคติกยังสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น ฟังไจ และยีสต์ ซึ่งสามารถหมักแบบกะ (batch fermentation) แบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation) และแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) ปัจจัยสำคัญในการผลิต คือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ พีเอช อุณหภูมิ อากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rukas และ Kotzckidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus lactis* พบว่าการหมักแบบกะโดยเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ *Lactobacillus casei* ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 30 กรัมต่อลิตร *Lactobacillus casei* ให้ปริมาณกรดแลคติก 25 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงแบบเซลล์ผสมกรดแลคติกจะสูงถึง 45 กรัมต่อลิตร

Pauli และ Fitzpatrick (2002) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และมีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งไนโตรเจนสังเคราะห์ที่มีราคาแพง โดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด และสารสกัดจากมอลต์ลงไป แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตมอลต์เปรียบเทียบกับยีสต์สกัด โดยเชื้ออิสระ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้ได้ผลผลิตเทียบเท่ากับยีสต์สกัด แต่มีข้อเสียคือ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิต ผลผลิตที่ได้จะไม่มีความบริสุทธิ์ และต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการทำให้ผลผลิตมีความบริสุทธิ์

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส แลคโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์ และแป้ง โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะสูงเมื่อใช้กลูโคส ฟรุกโตส และมอลโตส เป็นสารตั้งต้น

Bulut และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ได้แก่ ซูโครส กลูโคส โมลาส ฝักถั่วและรำข้าวสาลี โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงเมื่อใช้กลูโคส

Wee และคณะ (2004) ได้นำโมลาส ซึ่งมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาเป็นสารตั้งต้น นำมาผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงถึง 95.7 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 94.9

Huang (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูง ประมาณ 0.85 – 0.92 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wee และคณะ (2006) ทดลองศึกษาการผลิตกรดแลคติกระดับนำร่อง (Pilot-scale) โดยเชื้อ *Lactobacillus* sp. RKY2 ด้วยถังหมักขนาด 2.5, 30 และ 300 ลิตร พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้มีปริมาณสูงใกล้เคียงกัน

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก เรียกว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria; LAB) หมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติก และมีความสามารถในการหมักนมให้เกิดตะกอนได้ นอกจากนี้ยังรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย ต่อมาได้พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียมีเพียงแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้นจึงได้มีการแยกกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มออกจากนั้นได้ให้ความหมายของแลคติกแอซิดแบคทีเรียว่าต้องเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะสำคัญ คือ ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างสปอร์ มีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดแลคติก มีรูปร่างเป็นทรงกลมและแท่ง

2.3.1 ลักษณะโดยทั่วไป

เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม หรือเป็นรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (catalase) (Axelson,1993) สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในการหมักคาร์โบไฮเดรตได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาล โดยได้จากกระบวนการ substrate-level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน เช่น วิตามินต่างๆ กรดอะมิโน และไพริมิดีน สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน ไม่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนน้อย อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ส่วนพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่พีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (Salminen และ Wright, 1993)

2.3.2 แหล่งที่พบ

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

2.3.3 ชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมัก

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียรูปท่อนยาว ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวกและเปลี่ยนเป็นแกรมลบเมื่ออายุมากขึ้น ไม่สร้างเอนไซม์แลตาเลส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตจะอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5.5-5.8 พบได้ในธรรมชาติโดยเฉพาะในสัตว์และผลิตภัณฑ์ธัญพืช เป็นเชื้อก่อโรคในลำไส้นก และในช่องคลอดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ตัวอย่าง *Lactobacillus* ที่ทำให้เกิดความเสียหาย เช่น เชื้อ *L. brevis* ทำให้กะหล่ำปลีดองมีรสเปรี้ยวเกินไป เชื้อ *L. plantarum* ทำให้ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศเน่าเสีย *L. fructivorans* และ *L. brevis* ทำให้ไวน์ขุ่นมีรสเปรี้ยวที่เกิดจากการสร้างกรดแลคติกและกรดอะซิติก เป็นต้น สำหรับ *Lactobacillus* ที่มีประโยชน์ เช่น ก่อให้เกิดอาหารหมักที่มีรสเปรี้ยวหลายชนิด เช่น แหนม ผักกาดดอง นมเปรี้ยว เป็นต้น

Pediococcus เป็นแบคทีเรียแลคติกที่นิยมนำมาใช้หมักกรดแลคติกมากกว่าเช่น *P.pentosaceus* ส่วน *P.halophilus* ปัจจุบันถูกใช้ในสปีชีส์ใหม่ในชื่อว่า *Terragenococcus halophnus*

Leuconostoc เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมอันเป็นลักษณะสำคัญที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากพวก *Lactobacillus* ได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่นิยมนำมาใช้ในการผลิตกรดแลคติกเพราะเกิดเมือก

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

นักจุลชีววิทยาบางคนจัด *Bifidobacteriac* ไว้ในกลุ่มแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติก ด้วยแม้ว่าจะมีลักษณะทางพันธุกรรมและทางชีวเคมีแตกต่างจากแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังไม่ลึกซึ้งพอ และต้องการความกระจ่างมากกว่านี้

เมื่อพิจารณาถึงการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย สามารถจำแนกได้ 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.3.3.1 Obligative homofermenter หมายถึง แบคทีเรียพวกที่หมักแล้วได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *Pediococcus damnosus* และ *Lactobacillus ruminis* แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำตาลเฮกโซส (น้ำตาลที่มีคาร์บอนอยู่ 6 อะตอม หรือ C6 sugar) เช่น กลูโคสแต่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลเพนโทสได้ (น้ำตาลที่มีคาร์บอนอยู่ 5 อะตอม หรือ C5 sugar) เช่น น้ำตาลไซโลส

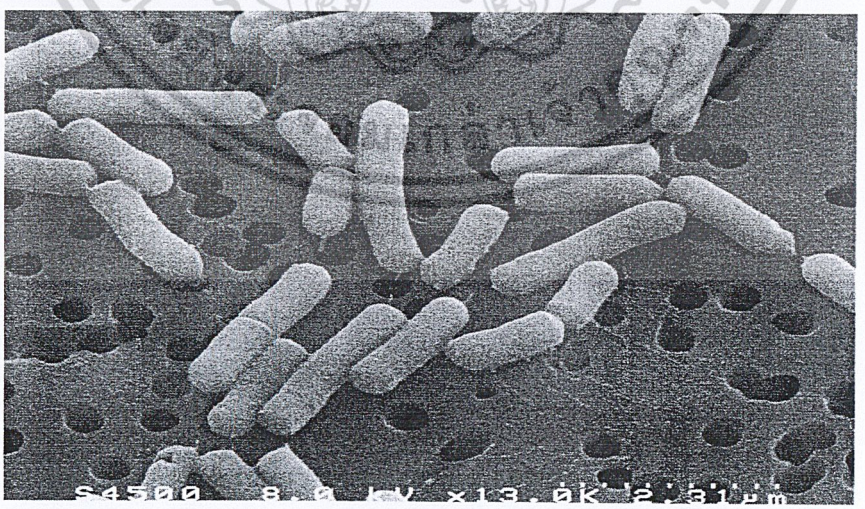
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.2 Facultative heterofermenter หมายถึงแบคทีเรียพวกที่หมักแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติกหรือเอทานอล ได้ทั้งสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *L. plautarum, L.pentosus, P.acidilactici, P.pentosaceus* และ *Enterococcus faecium* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลเฮกโซสได้ และสามารถใช้น้ำตาลเพนโทสได้เล็กน้อย

2.3.3.3 Obligative heterofenmenter หมายถึงแบคทีเรียพวกที่หมักแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติกหรือเอทานอล ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่แบคทีเรียในกลุ่มของ *Leuconostoc* และกลุ่มของ *Lactobacillus* บางชนิดเช่น *Lactobacillus brecis* และ *Lactobaeillus buchneri* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซสและน้ำตาลเพนโทสได้ดี

2.3.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ *Lactobacillus casei* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนกรดได้ (acid tolerant) มีรูปร่างเป็นแท่ง เซลล์มีขนาด 0.7-1.1 × 2.0-4.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีกระบวนการหมักแบบ เฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (heterofermentative) ได้ผลิตภัณฑ์หลักคือกรดแลคติก สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผักผลไม้ ลำไส้ของคนและสัตว์ ในอุตสาหกรรมมีการผลิตเพื่อเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก และเชื้อตั้งต้นในอุตสาหกรรมนมหมัก เป็นต้น (Salmi และคณะ, 2004)



รูปที่ 2.4 แสดงรูปร่างของเชื้อ *Lactobacillus casei*

ที่มา : http://www.probioticsnews.co.uk/library/scientific-visuals/high-resolution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *Lactobacillus*

2.4.1 ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่

2.4.1.1 พีเอช

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญที่สุดแตกต่างกัน โดยทั่วไปพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญนี้มักมีค่าเป็นกลาง หรือใกล้เคียง (พีเอช 7.0) และส่วนใหญ่จะสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชสูงและต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสมไม่เกิน 1 หน่วย *Lactobacillus* sp. จัดเป็นแบคทีเรียชนิดที่ชอบกรด (Acidophiles) ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ แต่สามารถทนอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรดไม่มากนัก (mild acidity) เท่านั้น

ผลกระทบของพีเอชที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และความสามารถในการป้องกันของผนังเซลล์ พบว่าใน *Lactobacillus* และจุลินทรีย์อื่นๆที่ผลิตกรดอินทรีย์ในระหว่างการหมัก จะทำให้เกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ขึ้นในอาหารซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเองด้วย

2.4.1.2 อุณหภูมิ

Lactobacillus sp. เป็นแบคทีเรียพวก mesophile แต่ในบางครั้งก็จัดอยู่ในพวก facultative thermophile ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ คือ 2 ถึง 53 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส

2.4.1.3 ออกซิเจน (Oxygen)

Lactobacillus sp. เป็นแบคทีเรียพวก aerotolerant anaerobe ซึ่งหมายถึง แบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ได้รับพลังงานจากการหมัก แต่ไม่ได้ใช้ออกซิเจนในการเมแทบอลิซึม แม้ว่าจะมีออกซิเจนอยู่ในสภาพแวดล้อมรอบๆ เซลล์ก็ตาม ซึ่งจะแตกต่างจากพวก microaerophile และ facultative anaerobe คือ พวก microaerophile นั้นจะสามารถเจริญได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อย โดยจะเจริญใต้ผิวหน้าของอาหารในบริเวณที่มีออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสม ส่วนพวก facultative anaerobe หมายถึง จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนโดยใช้วิถีการเมแทบอลิซึมแบบหนึ่ง แต่เมื่อเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะใช้วิถีการเมแทบอลิซึมอีกแบบหนึ่ง

2.4.1.4 ความชื้น

โดยปกติเซลล์ทุกเซลล์ที่มีเมแทบอลิซึมที่สมบูรณ์มีความต้องการสภาวะแวดล้อมที่มีน้ำเซลล์เดี่ยวๆมีการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง ซึ่งแตกต่างกับสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ที่มีผิวปกคลุมอยู่และมีของเหลวภายในอีกด้วย เซลล์เดี่ยวๆส่วนใหญ่จะมีชีวิตอยู่ได้เพียงไม่กี่ชั่วโมงเท่านั้น

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสภาวะที่ปราศจากความชื้น มีเพียงแต่จุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ และสปอร์ของมันเท่านั้นที่สามารถอยู่ได้ในสภาวะที่แห้งแล้ง ดังนั้น *Lactobacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์จึงไม่สามารถทนอยู่ได้สภาวะที่แห้งแล้ง

2.4.1.5 รังสี (Radiation)

พลังงานจากรังสี เช่น รังสีอัตราไวโอเวต สามารถทำให้เกิดการกลาย (การเปลี่ยนแปลงของ DNA) และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่อย่างไรก็ตามในจุลินทรีย์บางชนิด ก็มีรงควัตถุที่สามารถกรองรังสีและช่วยปกป้อง DNA จากการทำลายได้อีกด้วย และจุลินทรีย์บางชนิดก็มีระบบเอนไซม์ที่ใช้ซ่อมแซม DNA ที่ถูกทำลายได้อีกด้วย

2.4.2 ปัจจัยทางด้านอาหาร (Nutritional factors) ได้แก่

2.4.2.1 แหล่งคาร์บอน (Carbon Source)

แบคทีเรียจำนวนมากใช้สารประกอบคาร์บอนส่วนใหญ่ในการสังเคราะห์ส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ และบางส่วนเป็นแหล่งพลังงาน ส่วนจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงจะรีดิวส์คาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสังเคราะห์กลูโคส และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ จุลินทรีย์ทั้งชนิดออโตโทรป และเฮทเทอโรโทรปซึ่งรวมถึง *Lactobacillus* จะได้พลังงานจากการย่อยสลายกลูโคสโดยวิถีไกลโคไลซิส การหมัก และวัฏจักรเครบ และใช้สารตัวกลาง (Intermediates) ในวิถีเหล่านี้ในการสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ด้วย

2.4.2.2 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen Source)

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ต้องการไนโตรเจนเพื่อใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก และโปรตีนต่างๆ จุลินทรีย์บางชนิดใช้ไนโตรเจนจากแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ และมีจุลินทรีย์บางชนิดที่ได้รับพลังงานจากการเมแทบอไลต์สารประกอบไนโตรเจนอีกด้วย จุลินทรีย์จำนวนมากรีดิวส์ไนเตรตไอออน (NO_3^-) ไปเป็นกลุ่มอะมิโน ($-NH_2$) และใช้กลุ่มอะมิโนเพื่อสร้างกรดอะมิโน บางชนิดสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนได้ครบทั้ง 20 ชนิด ที่พบโปรตีน ในขณะที่จุลินทรีย์อื่นๆ ผลิตกรดอะมิโนบางชนิด หรือเพียงชนิดเดียวออกมาสู่อาหาร จุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะบางชนิดต้องการกรดอะมิโนทั้ง 20 ตัว และสารอื่นๆ ที่จำเป็นบางชนิดในอาหารส่วนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคจะได้กรดอะมิโนที่ใช้สังเคราะห์โปรตีนจากเซลล์ของมนุษย์หรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่มันอาศัยอยู่ กรดอะมิโนแต่ละตัวที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น หรือที่ได้จากอาหารจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน ในวิธีที่คล้ายคลึงกันนั้นไพรีน และไพริมิดีนก็จะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ DNA และ RNA กระบวนการที่โปรตีน และกรดนิวคลีอิกถูกสังเคราะห์ขึ้นนั้นเกี่ยวข้องขึ้นกับข้อมูลทางพันธุกรรมที่อยู่ในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.3 ซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส (Sulfur and Phosphorus)

นอกเหนือจากคาร์บอน และไนโตรเจนแล้วจุลินทรีย์ยังต้องการแร่ธาตุอื่นๆ อีก โดยเฉพาะซัลเฟอร์และฟอสฟอรัสซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ จุลินทรีย์ใช้ซัลเฟอร์ และกรดอะมิโนที่ประกอบด้วยซัลเฟอร์ในการสังเคราะห์โปรตีน โคเอนไซม์ และส่วนประกอบอื่นๆ ของเซลล์ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่ประกอบด้วยซัลเฟอร์จากสารประกอบซัลเฟอร์อนินทรีย์และกรดอะมิโนอื่นๆ จุลินทรีย์จะได้ฟอสฟอรัสส่วนมากจากไอออนฟอสเฟตอนินทรีย์ (PO^{3-}_4) และจะใช้ฟอสฟอรัส (ในรูปฟอสเฟต) ในการสังเคราะห์ ATP ฟอสโฟลิปิด และกรดนิวคลีอิก

2.4.2.4 แร่ธาตุ (Trace element)

แร่ธาตุจำเป็นที่ต้องการเพียงเล็กน้อยแต่ว่าขาดไม่ได้ จุลินทรีย์จำนวนมากต้องการแร่ธาตุที่แตกต่างกันออกไปรูปของไอออน สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการโซเดียม และคลอไรด์จำนวนเล็กน้อยแต่จุลินทรีย์ที่ชอบเกลือ (halophile) ต้องการไอออนของแร่ธาตุทั้ง 2 นี้ในปริมาณมาก โพแทสเซียม สังกะสี และแมงกานีส จะถูกใช้ในการกระตุ้นเอนไซม์บางชนิด โคบอลท์ถูกใช้ในการสังเคราะห์วิตามินบี 12 เหล็กถูกใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบที่มีฮีม และเอนไซม์บางชนิด (ไซโตโครมของระบบการถ่ายทอดอิเล็กตรอนประกอบด้วยฮีม) แม้ว่าความต้องการเหล็กจะมีเพียงเล็กน้อย แต่ถ้าหากขาดจะทำให้ไม่สามารถเจริญได้ แบคทีเรียแกรมบวกต้องการแคลเซียมในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ และในพวกที่สร้างสปอร์ใช้ในการสังเคราะห์ผนังของสปอร์

2.4.2.5 วิตามิน (Vitamin)

เป็นสารที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เองเท่านั้น จุลินทรีย์จำนวนมากไม่ต้องการวิตามิน เนื่องจากพวกมันสามารถสังเคราะห์สารต่างๆที่ต้องการจากสารประกอบพื้นฐาน จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ต้องการวิตามินในอาหารที่ใช้เลี้ยง เนื่องจากพวกมันขาดเอนไซม์ที่จะสังเคราะห์วิตามินขึ้นมาใช้เอง วิตามินที่จุลินทรีย์บางชนิดต้องการนั้น ได้แก่ อิโนซิทอล โคลีน กรดโฟลิก วิตามินบี 12 และวิตามินเค จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคแก่มนุษย์มักต้องการวิตามินชนิดต่างๆ และสามารถเจริญได้ก็ต่อเมื่อได้รับวิตามินที่ต้องการจากเซลล์เจ้าบ้าน (host) การที่เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เหล่านี้ในห้องทดลองได้จะต้องใช้อาหารที่ความซับซ้อน และประกอบด้วยสารต่างๆ ที่จำเป็นที่ตามปกติพวกมันจะได้รับจากเซลล์เจ้าบ้านครบถ้วนเท่านั้น เนื่องจาก *Lactobacillus* เป็นพวกที่ต้องการอาหารสมบูรณ์ (Complex nutritional requirement) ดังนั้นในบางกรณีจึงมีความต้องการวิตามินบางชนิดด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.6 แหล่งของเอนไซม์ (Enzyme)

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเคลื่อนย้ายสารต่างๆ ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แล้วจึงทำการเมแทบอไลต์ สารต่างๆ เหล่านี้ได้แก่ กลูโคส กรดอะมิโน เพปไทด์สั้นๆ นิวคลีโอไซด์ และฟอสเฟต รวมทั้งไอออนอนินทรีย์ แม้ว่าจุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนย้ายสารโมเลกุลใหญ่ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้ามาได้ก็ตาม แต่พวกจะใช้วิธีย่อยสลายสารเหล่านั้นเสียก่อน แล้วจึงทำการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ นอกเหนือจากเอนไซม์ที่ใช้ภายในเซลล์ (endoenzyme) แล้วแบคทีเรียและเชื้อราจำนวนมากผลิตเอนไซม์ที่ใช้ภายนอกเซลล์ (exoenzyme) แล้วปล่อยผ่านออกสู่ภายนอกเซลล์เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ “extracellular enzyme” ที่ถูกผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียแกรมบวกชนิดท่อน ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาในอาหารรอบๆจุลินทรีย์ และ “periplasmic enzyme” ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ เอนไซม์ที่ใช้ภายนอกเซลล์ส่วนใหญ่จะเป็นพวกไฮโดรเลส (hydrolase) ทำหน้าที่ เติมน้ำในขณะที่ทำการย่อยสลายสารพวกคาร์โบไฮเดรต ลิปิด หรือโปรตีน ใน *Lactobacillus* sp. ก็ใช้ exoenzyme เช่นกัน เช่นในการใช้น้ำตาลแล็กโทส เชื้อจะย่อยน้ำตาลแล็กโทสให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง โดยเปลี่ยนเป็นกลูโคสและกาแล็กโทสเสียก่อนแล้วจึงดูดซึมเข้ามาในเซลล์เพื่อทำการเมแทบอไลต์ต่อไป

2.4.2.7 การปรับตัวเมื่อมีสารอาหารจำกัด (Adaptation to Limited Nutrients)

จุลินทรีย์จะมีการปรับตัวเมื่อมีการจำกัดปัจจัยทางด้านสารอาหารได้หลายวิธี เช่น

1. ทำการสังเคราะห์เอนไซม์ให้มีปริมาณมากขึ้น เพื่อดูดซึมและนำสารอาหารที่มีอยู่จำกัดนั้นมาใช้ วิธีการนี้จะทำให้จุลินทรีย์ สามารถนำสารอาหารซึ่งมีอยู่ในจำนวนน้อยนั้น มาใช้ได้ในอัตราส่วนที่สูงขึ้น

2. สังเคราะห์เอนไซม์เพื่อใช้ในการเมแทบอไลต์สารอาหารอื่นๆ เช่น ในกรณีที่มีปริมาณกลูโคสอยู่จำกัด จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตเอนไซม์ขึ้นมาเพื่อใช้ในการย่อยสลายสารอาหารที่มีอยู่มากกว่า เช่น แล็กโทส เป็นต้น

3. การปรับอัตราการย่อยสลายสารอาหารและอัตราการสังเคราะห์สารต่างๆให้สัมพันธ์กับปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ให้ช้าลง และลดการสังเคราะห์สารที่ไม่จำเป็นต่อการเจริญเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการสูญเสียพลังงานโดยไม่จำเป็น

2.5 กากน้ำตาล (Molasses)

เป็นของเหลวสีดำที่เหนียวข้น ซึ่งไม่สามารถจะตกผลึกน้ำตาลได้อีกด้วยเครื่องจักรของโรงงานน้ำตาลธรรมดา กากน้ำตาลเป็นเนื้อของสิ่งที่ไม่ใช่น้ำตาลที่ละลายปนอยู่ในน้ำอ้อย ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ท (invert sugar) และสารเคมีเช่น ปูนขาว ซึ่งใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตกตะกอนให้น้ำอ้อยใสส่วนประกอบของกากน้ำตาลจะปรวนแปรไม่แน่นอน แล้วแต่ว่าได้มาจากอ้อยพันธุ์ไหนและผ่านกรรมวิธีอย่างไร แต่มักจะมีน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ทกับน้ำ

ปัจจุบันนี้โรงงานน้ำตาลที่ทันสมัยมีความสามารถในการสกัดแยกน้ำตาลออกจากกากน้ำตาลได้มากที่สุด แต่ก็ไม่ทั้งหมด เพราะการสกัดแยกออกให้หมดจะเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงมีน้ำตาลซูโครสบางส่วนที่ยังคงหลงเหลืออยู่ในกากน้ำตาล โดยทั่วไปจะมีซูโครสปนอยู่ในกากน้ำตาลเฉลี่ยร้อยละ 7.5

(ที่มา : http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK5/chapter3/t5-3-l4.htm)

2.5.1 ประเภทของกากน้ำตาล

กากน้ำตาลเป็นผลผลิตพลอยได้ที่มีคุณค่า เป็นส่วนของของเหลวที่เหลือหลังจากการแยกผลึกของน้ำตาลออกแล้วมีลักษณะเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้ม องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ตกผลึกในการผลิตน้ำตาลทรายนั้นจะมีกากน้ำตาลซึ่งเป็น ผลพลอยได้เกิดขึ้นประมาณร้อยละ 4 ถึง 6 ของปริมาณอ้อยที่ใช้ในการผลิต กากน้ำตาลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามกรรมวิธีใน การผลิตน้ำตาลทราย คือ

2.5.1.1 กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว (plantation white sugar) ซึ่งเรียกว่า black-strap molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 50-60

2.5.1.2 กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (refine sugar) ซึ่งเรียกว่า refinery molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 48

2.5.1.3 กากน้ำตาลที่ได้จากการทำบางส่วนของน้ำอ้อยแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหย (inverted canjuice) ซึ่งเรียกว่า invert molasses หรือ hightest molasses

(ที่มา : http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=83&i2=15)

2.5.2 องค์ประกอบหลักทางเคมีของกากน้ำตาล

ส่วนประกอบของกากน้ำตาล 32 ตัวอย่าง ที่ได้จากโรงงานน้ำตาลในแอฟริกาตอนใต้ ในปี 1957 จากโรงงาน 17 แห่ง

องค์ประกอบ	**(เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)**
น้ำ	20.65
ซูโครส	36.60
รีดิวซิงชูการ์	13.00
น้ำตาลที่ใช้หมักเชื้อได้ทั้งหมด	50.50
เถ้าของซัลเฟต	15.10
ยางและแป้ง (gum & starch)	3.43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งนี้ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

117253

ขี้ผึ้ง	0.38
ไนโตรเจนทั้งหมด	0.95
ซิลิกาในรูป SiO_2	0.46
ฟอสเฟตในในรูป P_2O_5	0.12
โพแทสเซียมในรูป K_2O	4.19
แคลเซียมในรูป CaO	1.35
แมกนีเซียมในรูป MgO	1.12

สิ่งสำคัญที่เป็นส่วนประกอบของกากน้ำตาล คือ น้ำตาลที่ใช้หมักเชื้อได้ทั้งหมด ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก กากน้ำตาลจากบางโรงงานมีส่วนประกอบนี้ถึงร้อยละ 75 ซึ่ง 2 ใน 3 เป็นน้ำตาลชนิดอินเวอร์ท

ที่มา : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (www.tistr.or.th)

2.5.3 สารปนเปื้อนในกากน้ำตาล

องค์ประกอบและสารปนเปื้อนที่มีในทั่วไปของกากน้ำตาล ได้แก่ น้ำ น้ำตาล ซูโครส น้ำตาลริดิวซิงชูการ์ เถ้าซัลเฟต ยางและแป้ง ขี้ผึ้งไนโตรเจน ซิลิกาในรูปซิลิกาออกไซด์ (SiO_2) ฟอสเฟตในรูปฟอสเฟตออกไซด์ (P_2O_5) โปแตสเซียมในรูปโพแทสเซียมออกไซด์ (K_2O) แคลเซียมในรูปแคลเซียมออกไซด์ (CaO) และแมกนีเซียมในรูปแมกนีเซียมออกไซด์ (MgO)

Roukas (1998) พบว่าในกากน้ำตาลมีสารปนเปื้อนพวกโลหะหนัก เช่น เหล็ก สังกะสี ทองแดง แมงกานีส แมกนีเซียม และแคลเซียม ซึ่งโลหะหนักที่ปนเปื้อนในความเข้มข้นสูงนั้น จะก่อให้เกิดปัญหาในระหว่างกระบวนการหมัก โดยจะมีผลไปยับยั้งการเจริญ เนื่องจากการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์

ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล (2542) มีปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในกากน้ำตาลในปริมาณค่อนข้างสูงโดยเฉพาะธาตุแมงกานีสและธาตุเหล็กที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว

Pailin (2005) กากน้ำตาลประกอบด้วยตัวยับยั้งและไม่เป็นประโยชน์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ไอออนของโลหะหนัก ปริมาณน้ำตาลที่สูงมากเกินไป และสารป้องกันการเกิดเชื้อรา เพื่อรักษาสภาพของกากน้ำตาลจึงต้องทำการปรับปรุงสภาพก่อนการนำมาใช้เป็นสับเสตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 วิธีการปรับปรุงคุณภาพกากน้ำตาล

2.5.4.1 วิธี Sulfuric acid

โดยการปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายกากน้ำตาลให้เท่ากับ 3.0 ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 นอร์มอล วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5000 g 15 นาที นำส่วนน้ำมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มอล นำสารละลายที่ได้ทำให้ปลอดเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2.5.4.2 วิธี Carbon activated

ใส่ถ่านกัมมันต์ 15 กรัม ลงในสารละลายกากน้ำตาล 200 มิลลิลิตรคนผสมที่ 50 องศาเซลเซียส 15 นาที ทำการแยกถ่านกัมมันต์ออกด้วยการกรอง ทำซ้ำ 4 ครั้งหรือจนกว่าจะได้สารละลายกากน้ำตาลที่ปราศจากสี ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล นำสารละลายที่ได้ทำให้ปลอดเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

Waenpetch Kulthida (2000) ทดลองกำจัดสีในกากน้ำตาลโดยใช้ sep pak extract-clean cyano และตัวชะคือสารละลายผสมของสารละลายอะซิโตไนโตร: สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับ pH เท่ากับ 5.00± 0.01 อัตราส่วน 70:30 ปริมาตรต่อปริมาตร พบว่าสามารถกำจัดสีในกากน้ำตาลได้

Pailin (2005) การปรับปรุงกากน้ำตาล เพื่อเป็นการกระตุ้นกากน้ำตาลให้เหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็นสับสเตรท เช่น การแลกเปลี่ยนไอออน ซึ่งเป็นการจับไอออนของโลหะหนักออก

การสลายสารพิษในกากน้ำตาลหรือโมลาส เป็นการสลายคุณสมบัติบางประการของส่วนประกอบบางตัวในกากน้ำตาล ดังเช่นการสลายสารพิษเพื่อใช้ในทางการเกษตร ซึ่งสารพิษในโมลาสจะทำให้ดินเกิดการจับตัวแข็ง จนน้ำไม่สามารถซึมผ่านลงดินได้ ทำให้พืชไม่สามารถดูดซึมน้ำ อาหารและดินไม่สามารถคายความชื้นได้ ทำให้พืชขาดน้ำหรือเป็นโรครากเน่า, โรคโคนเน่า โดยวิธีการสลายสารพิษนั้นจะนำกากน้ำตาลหรือโมลาส, เอนไซม์ (หรือ ถ้าหมักด้วยผลไม้รสเปรี้ยวจะดี เช่น มะนาว สัปปะรด ฯลฯ ที่มีอายุมากกว่า 6 เดือนขึ้นไป) และน้ำในอัตราส่วน 1:1:1 ผสมในภาชนะให้เข้ากัน แล้วนำส่วนผสมที่ได้ใส่ภาชนะปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ประมาณ 3 เดือนขึ้นไป ยิ่งอายุการหมักนานยิ่งดี จนน้ำที่ได้มีลักษณะใส ไม่ข้นเหมือนตอนแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5 การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาล

ประโยชน์ที่ได้จากกากน้ำตาลมีมากมาย เนื่องจากในกากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลประมาณร้อยละ 50-60 และแร่ธาตุต่างๆ ประโยชน์ที่เห็นได้โดยตรง เช่น ใช้เป็นอาหารสัตว์ เนื่องจากกากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ซึ่งเป็นแหล่งอาหาร พลังงานที่เหมาะสมและราคาไม่แพง จึงมีการใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์หลายชนิด (Ketan และ Callihan, 2007) ใช้เป็นปุ๋ย เพราะในกากน้ำตาลมีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับพืช นอกจากนี้กากน้ำตาลยังใช้เป็นวัตถุดิบใน อุตสาหกรรมการหมักหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และคณะ, 2530; ประดิษฐ์ ครุวัณณา และคณะ, 2530) กรดมะนาว กรดน้ำส้ม กรดแลคติก ผงชูรส ยีสต์ขนมปัง และยีสต์อาหารสัตว์เนื่องจากกากน้ำตาลมีราคาถูกและเหมาะสมกว่าเมื่อเทียบกับวัตถุดิบอื่นๆ และผสมกับชานอ้อยใช้ทำถ่านใช้ในครัวเรือน

(ที่มา : http://www.thaisugarmill.com/index.php?lang=th&ds=product_detail-view&id=2GEIwQ08LXmNYdyD)

2.5.5.1 อุตสาหกรรมการผลิตเหล้าและแอลกอฮอล์

อุตสาหกรรมการผลิตเหล้าและแอลกอฮอล์ เป็นแหล่งใหญ่ที่ต้องการกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบสำคัญในอุตสาหกรรม ผลิตน้ำตาลและแอลกอฮอล์ ผลผลิตที่ได้จากการหมักกากน้ำตาลได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ บิวธิลแอลกอฮอล์ อาซีโตน กรดซิตริก กลีเซอรอล (glycerol) และยีสต์ เอทิลแอลกอฮอล์ใช้ทำกรด อะซีติก เอธีลอีเธอร์ ฯลฯ สารประกอบอื่นที่ได้ ได้จากการหมักกากน้ำตาล ได้แก่ เอธิลอะซิเตท บิวธิลอะซิเตท อามีลอะซิเตท น้ำส้มสายชู และคาร์บอนไดออกไซด์แข็ง ในอดีตชาวเกาะเวสต์อินดีส ผลิตเหล้ารัมจากกากน้ำตาล นอกจากนั้นถ้านำกากน้ำตาลที่ทำให้บริสุทธิ์ไปหมักและกลั่นจะได้ เหล้ายิน (gin) ส่าเหล้าหรือยีสต์ที่ตายแล้ว เป็นผลพลอยได้ซึ่งนำไปทำอาหารสัตว์ นอกจากนี้กากน้ำตาลยังใช้ทำยีสต์สำหรับทำขนมปัง และเหล้าได้ด้วย ยีสต์บางชนิดที่ให้โปรตีนสูงคือ *Torulopsis utilis* ก็สามารถเลี้ยงขึ้นมาได้จากกากน้ำตาล กากน้ำตาลสามารถนำมาทำเป็นกรดแลคติกได้ แม้ว่าจะทำได้น้อยมาก

ขบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลที่ เรียกว่า azeotropic process เป็นการผลิตแอลกอฮอล์แอนไฮดรัส (anhydrous alcohol) ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินในท่อไอเสียรถยนต์หรือรถแทรกเตอร์ เนื่องจากแอลกอฮอล์แบบนี้ผสมกับเบนซินในอัตราส่วนร้อยละ 20-30 ได้ ผิดกับแอลกอฮอล์ชนิดที่ใช้ทำเหล้า (rectified spirit) พบว่า แอลกอฮอล์ผสม กับเบนซินอัตราร้อยละ 14-25 ทำให้เครื่องยนต์ของรถยนต์เดินได้ดี การผลิตแอลกอฮอล์ จากกากน้ำตาลมาเป็นเวลานาน กากน้ำตาล invert sugar ประมาณร้อยละ 50 จะผลิตแอลกอฮอล์ได้ 4:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5.2 การผลิตอาซีโตนและบิวทานอล (acetone and butanol)

กากน้ำตาลยังใช้ผลิตอะซีโตนและบิวทานอล (acetone and butylalcohol) โดยแทนที่จะใช้เชื้อยีสต์เป็นตัวหมักก็ใช้แบคทีเรียแทน แม้ว่ามนุษย์สามารถผลิตอะซีโตน และ บิวทานอลได้โดยวิธีอื่น แต่วิธีการหมักนี้ก็ยังคงใช้กันอยู่แบคทีเรียที่ใช้คือเชื้อ *Clostridia* ซึ่งจะย่อยน้ำตาลซูโครส ในกากน้ำตาลที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาก่อน (sterilized) ขบวนการเต็มไปด้วยขั้นตอนที่ละเอียดอ่อนและสะอาด เครื่องมือ เครื่องใช้ จะต้องนึ่งฆ่าเชื้อเสียก่อน การหมักใช้เวลา 36-48 ชั่วโมง ซึ่งจะเกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจนเกิดขึ้น ถัดจากนั้นก็นำของเหลวที่ได้ไปแยกด้วยวิธีกลั่นแยกส่วน ทำให้ได้บิวทานอล เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 และอะซีโตนบริสุทธิ์ บิวทานอล ส่วนที่เหลือจากการกลั่นได้แก่โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ซึ่งใช้เป็นอาหารสัตว์ได้

ถ้านำเอทิลแอลกอฮอล์ไปทำปฏิกิริยาต่อไปจะได้เอธิลอาซีเตท ซึ่งมีประโยชน์ใช้เป็นตัวทำละลายที่ดีใช้กันมากในอุตสาหกรรมการพิมพ์ และการผลิตหนังเทียม หรือใช้ละลายเซลลูลอยด์หรือยางไม้ (resins and gum) ซึ่งใช้ใน อุตสาหกรรมการเคลือบผิววัสดุ

บิวธิลอาซีเตทใช้ในการสกัดสารฟีนอล หรือใช้ผสมเคมีเคลือบผิวไนโตรเซลลูโลส แลคเกอร์ บิวธิลอะซิเตท ระเหยได้เร็ว เป็นตัวทำลายที่ยาก และเคลือบผิวไม่ลอก ใช้ได้ทั้งร้อนและเย็น

สารอามีลอะซีเตท ซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์จากกากน้ำตาลเช่นกัน ก็เป็นตัวทำละลายที่ดี ใช้ในเคมีเคลือบผิว ไนโตรเซลลูโลส นอกจากนี้ยังใช้อุตสาหกรรมผลิตกลิ่น ผสมอาหารได้ดีที่สุดอีกด้วย

อะซีโตนเป็นตัวทำละลายที่ดีอีกตัวหนึ่ง ใช้ละลายอเซเทลีน ใช้ทำกาวฟิล์มถ่ายรูป กระจกนิรภัย และ เรยอง (cordite) ในแง่ที่เป็นตัวทำละลาย ที่ดีมันจึงถูกนำมาผสมกับน้ำมันเครื่องรถยนต์ หรือใช้ในอุตสาหกรรมเภสัช หรือให้สกัดสารอินซูลินจากไต ฮอร์โมน ฯลฯ อะซีโตน เป็นสารตัวกลางของสารประกอบหลายชนิด เช่น วิตามินซี คลอโรฟอร์ม ไอโอโดฟอร์ม ซัลโฟนอล เมธิลเฮฟทีโนน เป็นต้น

บิวธิลแอลกอฮอล์ เป็นตัวทำละลายอีกเช่นเดียวกัน ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสารเคลือบผิวที่ให้คุณลักษณะเป็นเงา และต้านทานต่อการขูดขีดได้ดี ใช้ทำน้ำมันเบรกชนิดที่ใช้กับรถยนต์ขนาดกลางได้ดีอีกด้วย นอกจากนั้นแอลกอฮอล์ชนิดนี้ยังใช้ทำเป็นตัวการทำพลาสติก (plasticizer) ได้ดี คือ ใช้ผลิตสารไดบิวธิลฟธาเลต (dibutyl phthalate)

2.5.5.3 การผลิตอาหารสัตว์

คุณค่าทางอาหารของกากน้ำตาลอยู่ที่น้ำตาล ซึ่งให้พลังงานสูงและสัตว์ชอบกิน นอกจากนั้นยังมีธาตุอาหารโปรตีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส และธาตุอาหารปริมาณน้อยอื่นๆ รวมทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิตามินบีชนิดต่างๆ มีผู้วิเคราะห์แล้วว่า กากน้ำตาลมีคุณค่าทางอาหารเป็นร้อยละ 70 ของข้าวโพด ซึ่งบางครั้งสูงถึงร้อยละ 85 คุณค่าทางอาหารจะสูงยิ่งขึ้น ถ้าใช้กากน้ำตาลร้อยละ 10 ในอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง เคยมีผู้ทดลองผสมยูเรีย และแอมโมเนียลงในกากน้ำตาลเพื่อเลี้ยงสัตว์ ซึ่งพบว่าให้โปรตีนสูง ในกรณีที่ไม่มีอาหารสัตว์เพียงพอ กสิกรอาจจะใช้ซังข้าวโพด และฟางผสมด้วยกากน้ำตาลจะทำให้สัตว์มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นและกินอาหารได้มากขึ้น

กากน้ำตาลเป็นสิ่งจำเป็นในการทำไซเลจให้แก่สัตว์กิน ชาวจาไมกาใช้กากน้ำตาลราดไปบนไซเลจทำให้วัวนมกินอาหารได้มากขึ้น และวัวนมได้รับโปรตีน และธาตุอาหารที่ต้องการจากกากน้ำตาลตลอดฤดูหนาวที่วัวนม จำต้องอยู่ในคอกตลอดเวลาด้วย

แต่ก็มีขีดจำกัด กล่าวคือ วัวตัวหนึ่งไม่ควรรับกากน้ำตาล เข้าไปเกิน 1.5 ปอนด์ สัตว์ชอบกินกากน้ำตาลคลุกกับหญ้าเพราะจะช่วยทำให้รสชาติดีขึ้น มีผู้วิจัยทดลองใส่แอมโมเนียลงในกากน้ำตาล พบว่าสามารถผลิตโปรตีนได้และสัตว์สามารถกินกากน้ำตาล นี้เข้าไปและทำให้สร้างโปรตีนขึ้นในร่างกายสัตว์ได้ จึงเป็นสิ่งที่ประหลาดที่กากน้ำตาลเป็นสารคาร์โบไฮเดรต สามารถถูกสัตว์เปลี่ยนไปเป็นโปรตีนได้ผลดี

2.5.5.4 การผลิตยางสังเคราะห์

ส่วนประกอบสำคัญของน้ำอ้อยคือ กรดอโคนิติค จะผสมรวมอยู่ในกากน้ำตาล ซึ่งสามารถแยก ได้โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแคลเซียม กรดอโคนิติคนี้ทีความสำคัญในการผลิตยางสังเคราะห์ พลาสติก เรซิน และสารขัดเงา

2.5.5.5 การผลิตปุ๋ย

การใช้ทำปุ๋ยหรือปรับคุณภาพดิน กากน้ำตาลมีส่วนประกอบของโพแทสเซียม อินทรียวัตถุ และธาตุรองอื่นๆอีกมาก นอกจากนั้นยังเหมาะสำหรับปรับสภาพดินทราย หรือดินเหลวที่ไม่มีการเกาะตัว เนื่องจากขาดอินทรียวัตถุ

2.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.6.1 ทฤษฎีและความรู้ทั่วไป

เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นวิธีวิเคราะห์ที่นิยมกันอย่างมาก เพราะว่าง่ายต่อการใช้งาน มีประสิทธิภาพสูง และไม่มีข้อจำกัดใดๆ ในเรื่องของการระเหยหรือความเสถียรของสารประกอบตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อนทศวรรษ 1970 วิธีการโครมาโตกราฟีได้นำมาใช้ในการทำงานของนักวิทยาศาสตร์น้อยมากต่อมาในทศวรรษ 1970 กระบวนการแยกสารเคมีมีวิธีการต่างๆมากมาย เช่น คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Open-colum chromatography) โครมาโทกราฟีกระดาษ (paper chromatography) และทินแลร์โครมาโทกราฟี (thin-layer chromatography) แต่วิธีการเหล่านี้ยังไม่เพียงพอต่อการหาปริมาณและแยกสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้ในช่วงทศวรรษ 1970 นี้ วิธีการโครมาโทรกราฟีแบบใช้ความดัน (Pressure liquid chromatography) ได้นำมาใช้เพื่อช่วงเวลาการไหลผ่าน ดังนั้นการลดเวลาในการทำสารประกอบให้บริสุทธิ์ ถูกแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแต่อัตราการไหลไม่คงที่ซึ่งเป็นข้อโต้เถียงกันว่าหากอัตราไหลหรือความดันคงที่จะทำให้การแยกสารประกอบดีขึ้นหรือไม่ โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวความดันสูงถูกพัฒนาขึ้นมาในกลางทศวรรษที่ 1970 และถูกพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็วพร้อมๆกับการพัฒนาอุปกรณ์ที่นำมาใช้เป็น คอลัมน์และมีการเชื่อมต่อกับตัวตรวจวัด (detector) ในปลายทศวรรษที่ 1970 วิธีการใหม่ๆ เช่น โครมาโทกราฟีของเหลวแบบรีเวอร์สเฟส (Reverse phase liquid chromatography) มีความสามารถที่จะทำการแยกสารประกอบที่มีความคล้ายคลึงกันมากๆได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในช่วงทศวรรษที่ 1980 เทคนิควิธีโครมาโทรกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง ได้นำมาใช้โดยทั่วไปเพื่อการแยกสารประกอบเคมี ซึ่งวิธีนี้ทำให้การแยก การจำแนก การทำให้บริสุทธิ์ และการหาปริมาณของสารประกอบได้ดีกว่าวิธีอื่นที่กล่าวมา มีระบบคอมพิวเตอร์และระบบกลไกลอัตโนมัติทำให้เพิ่มความสะดวกต่อการใช้เทคนิควิธีโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง มากขึ้นชนิดของคอลัมน์ยังดีกว่าคอลัมน์ที่ได้ผลิตขึ้น ได้แก่ ไมโครคอลัมน์ (Micro-column), แอฟฟินิตีคอลัมน์ (Affinity Column)

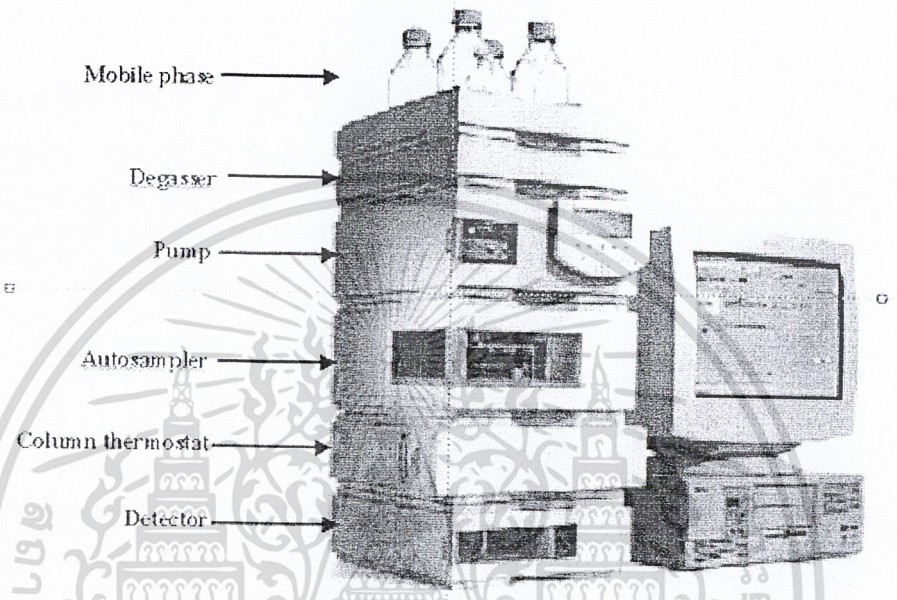
ทศวรรษที่ผ่านมามีการดำเนินงานพัฒนาไมโครคอลัมน์ และคอลัมน์ชนิดพิเศษอื่นๆกันอย่างกว้างขวาง โดยทั่วไปแล้วคอลัมน์ของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวความดันสูงสามารถวัดความยาวได้เป็นหลักร้อยในหน่วยมิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร ไมโครคอลัมน์ หรือคาปิลาลีคอลัมน์ โดยทั่วไปมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 3-200 ไมโครเมตร (1/1000 มิลลิเมตร) ส่วนเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวความดันสูงที่มีความเร็วสูงจะใช้คอลัมน์ที่สั้นกว่า ซึ่งมีความยาวของคอลัมน์ประมาณ 30 มิลลิเมตร และภายในคอลัมน์บรรจุด้วยเศษชิ้นส่วน (particles) ที่เล็กกว่า

ในปัจจุบันมีชนิดของคอลัมน์และตัวตรวจวัดให้เลือกมากมาย เพื่อความเหมาะสมในการแยกสารประกอบเคมี ถึงแม้ว่าเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวความดันสูงเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยในการตัดสินใจในงานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพ, ทางการแพทย์ และทางชีวเคมี แต่ปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทรกราฟีของเหลวความดันสูงได้ถูกนำมาใช้ด้านพลังงาน, ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง, อาหาร และด้านสิ่งแวดล้อม

2.6.2 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวความดันสูง (HPLC)



รูปที่ 2.5 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวความดันสูง (HPLC)
ที่มา : http://share.psu.ac.th/blog/science-equipment/945

ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวความดันสูง มีดังต่อไปนี้

2.6.2.1 โมบายเฟสรีเซอวัวร์ (Mobile phase reservoir) เป็นภาชนะใช้บรรจุเฟสเคลื่อนที่

2.6.2.2 เครื่องกำจัดฟองอากาศ (Degasser) เป็นอุปกรณ์ในการกำจัดฟองอากาศในสารละลาย

2.6.2.3 ปั๊ม (Pump) เนื่องจากในการแยกสารผสมในเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวความดันสูงจะอาศัยหลักการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ ที่มีอนุภาคขนาดเล็กมากจึงทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2.4 เครื่องฉีดตัวอย่าง (Sample injection) เป็นอุปกรณ์ในการฉีดสารตัวอย่างมีทั้งแบบฉีดด้วยมือ (manual sample) และแบบฉีดอัตโนมัติ (automatic sample)

2.6.2.5 คอลัมน์มี 2 ชนิดคือ

1. คอลัมน์วิเคราะห์ (Analytical column) มีความยาวประมาณ 10-30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 4-10 มิลลิเมตร วัสดุที่ใช้ทำภาชนะบรรจุ เช่น สแตนเลส (stainless steel), โพลีเอทีลีน (polyethylene), แก้ว และโพลีอีเทอร์คีโทน (Polyetherketone:PEEK) เป็นต้นสำหรับส่วนที่เป็นวัสดุที่บรรจุอยู่ภายในได้แก่ ซิลิกาเจลเรซิน (silica based resins gels bonded phases) เป็นต้น

2. การ์ดคอลัมน์ (Guard column) นิยมต่อระหว่างส่วนฉีดตัวอย่าง (injector) และส่วนของคอลัมน์วิเคราะห์ ซึ่งจะทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับสารตัวอย่างรวมทั้งตัวทำละลายเพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์วิเคราะห์ส่วนวัสดุที่บรรจุในการ์ดคอลัมน์จะคล้ายคลึงกับคอลัมน์วิเคราะห์

2.6.2.6 ตัวตรวจวัด (Detector) เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณสำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวความดันสูงเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้ได้แก่

1. ตัวตรวจวัดช่วงแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet-Visible detector) : เช่น ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอเรย์ (Diode array detector) เป็นตัวตรวจวัดที่วัดค่าดูดกลืนแสงของสาร สามารถวัดได้ทีละหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน และวัดได้ตั้งแต่ 190-900 นาโนเมตร ระบบการเดินทางของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง แสงจากแหล่งกำเนิดแสง (monochromator) คือ สลิตต์ (slit) และเกรตติ้ง (grating) เมื่อแสงตกกระทบบนเกรตติ้งแสงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ แล้วไปตกกระทบลงบนแผงไดโอดแอเรย์(Diode array) ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอเรย์สามารถเก็บข้อมูล สเปกตรัม (spectrum) ของพีค (peak) ต่างๆของโครมาโตแกรมและสามารถนำออกมาใช้งานเมื่อไหร่ก็ได้

2. ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซน (Fluorescence detector) : เป็นตัวตรวจวัดที่มีความไวสูงและเฉพาะเนื่องจากมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซน (Fluorescence) ที่ได้ออกมาจากตัวอย่างที่ถูกกระตุ้น (excited) ด้วยแสงยูวี โดยที่แสงยูวีจากแหล่งกำเนิดแสงผ่านเครื่องกรองแสง (monochromatro) เพื่อให้แสงมีความยาวคลื่นตามต้องการผ่านเข้าไปยังส่วนที่สารตัวอย่างผ่าน (flow cell) ที่มีสารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์เมื่อตัวอย่างถูกกระตุ้นจะปล่อยแสง (emission) ออกมาทุกทิศทางแต่จะมีแสงที่ทำมุม 90 องศาเท่านั้นซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะผ่านไปยังฟิวเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัดแสงที่ไม่ต้องการออก จากนั้นจึงผ่านเข้าไปยังโฟโตเซลล์ (photo cell) ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม ดังนั้นทั้งความยาวคลื่นแสงที่ตัวอย่างปล่อยออกมา (excitation) และแสงที่จำเพาะกับตัวอย่าง (emission) จึงเป็นความยาวคลื่นที่เป็นลักษณะจำเพาะกับตัวอย่างนั้นๆเท่านั้น ดังนั้นตัวอย่างที่เหมาะกับตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซน เช่น ตัวอย่างสารชีวภาพ, เลือด และปัสสาวะ เป็นต้น

3. ตัวตรวจวัดดรรชนีหักเหแสง (Refractive index detector : RI detector) : ใช้วัดปริมาณสารใดก็ได้ที่มีค่าดรรชนีหักเหแตกต่างจากเฟสเคลื่อนที่ นั้นคือจะเกิดความแตกต่างกันระหว่างส่วนที่มีเฟสเคลื่อนที่ผ่าน (reference cell) และส่วนที่มีสารที่เราสนใจ (sample cell) ภายในตัวตรวจวัดจึงทำให้ได้ค่าดรรชนีหักเหที่ต่างกัน จึงตรวจวัดสัญญาณได้

4. ตัวตรวจวัดเซลล์ไฟฟ้าเคมี (Electrochemical detectors): ใช้วัดการสูญเสียหรือได้รับอิเลคตรอนของสารที่ออกมาจากคอลัมน์

5. ตัวตรวจวัดการนำไฟฟ้า (Conductivity detectors): ใช้วัดความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารที่ต้องการวิเคราะห์กับเฟสเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.1.2 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

3.1.4 เครื่อง evaporator

3.1.5 เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave)

3.1.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

3.1.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.1.8 ตู้เย็นอุณหภูมิ -83 องศาเซลเซียส

3.1.9 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.10 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

3.1.11 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3.1.12 ตู้บ่มปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.1.13 ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina air flow)

3.1.14 เครื่องเขย่า

3.1.15 ถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.1.16 ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

3.1.17 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

3.1.18 หลอดทดลอง (test tube)

3.1.19 กระบอกตวง (cylinder)

3.1.20 บีกเกอร์ (beaker)

3.1.21 คิวเวตแก้ว

3.1.22 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

3.1.23 เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)

3.1.24 ตะเกียงแอลกฮอล์

3.1.25 ปิเปต (pipette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

3.2.1 ยีสต์สกัด (yeast extract)

3.2.2 เปปโตน (peptone)

3.2.3 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3.2.4 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)

3.2.5 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)

3.2.6 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

3.2.7 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)

3.2.8 เนื้อสกัด (meat extract)

3.2.9 Tween-80

3.2.10 แอมโมเนียมอะซิเตต (CH_3COONH_3)

3.2.11 โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)

3.2.12 วุ้น (agar)

3.2.13 น้ำกลั่น

3.2.14 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)

3.2.15 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.2.16 กรดไฮโดรคลอริก (HCL)

3.2.17 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

3.2.18 ฟีนอล

3.2.19 กลูโคส

3.2.20 มอลต์สกัด (malt extract)

3.2.21 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)

3.3 วัตถุดิบ

3.3.1 ชนิดและการเก็บรักษา

กากน้ำตาลเข้มข้นซื้อจากโรงงานผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย โดยจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

ใช้เชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046, *Saccharomyces cerevisae* (Baker's yeast), *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059 สำหรับการศึกษาหาสายพันธุ์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมในการผลิตยีสต์สกัดเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในการผลิตกรดแลคติก

3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

สำหรับแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้วลาก (Streak) ลงบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) สำหรับยีสต์ จะใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้วลาก (Streak) ลงบนอาหารแข็ง YM (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1- 3 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (Subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

3.5.1.1 กล้าเชื้อสำหรับการผลิตยีสต์สกัด

เชื้อที่ใช้คือ *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046, *Saccharomyces cerevisae* (Baker's yeast), *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059 นำแต่ละเชื้อถ่ายลงบนอาหารแข็ง YM ด้วยเทคนิค streak แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 1-2 ลูป ลงในอาหาร Pre-culture (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และทำการเจือจางตัวอย่างน้ำหมักจนสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ปราศจากเชื้อ

3.5.1.2 กล้าเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

เชื้อที่ใช้คือ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติก ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้วลาก (Streak) ลงบนอาหารแข็ง (MRS agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ถ่ายเชื้อจำนวน 1-2 ลูป ลงในอาหารเหลว (MRS broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำหมักจนสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ปราศจากเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมของยีสต์ 4 สายพันธุ์

โดยอาหารที่ใช้ศึกษามีอยู่ 2 ชนิด คือ อาหารเหลว YM และ อาหารดัดแปลง (Modified medium)(ภาคผนวก ก) โดยจะทำการแบ่งอาหารทั้ง 2 ชนิด ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นใส่กล้าเชื้อยีสต์ร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหาร ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาทำการวัดค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956) และวัดการเจริญของเซลล์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

3.7 การศึกษาการผลิตโปรตีนสูงสุดของยีสต์ 4 สายพันธุ์ และการผลิตยีสต์สกัด (yeast autolysate) เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน (ธีระวุฒิ, 2544)

หลังจากทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ทำการเพาะเลี้ยงยีสต์แต่ละสายพันธุ์ในสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยแบ่งอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นใส่กล้าเชื้อยีสต์ร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ยีสต์มีการเจริญสูงสุด หลังจากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเซลล์กับส่วนที่เป็นของเหลวออกจากกัน นำเซลล์มาละลายน้ำในอัตราส่วนร้อยละ 15-20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับพีเอชให้ได้ 5.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 โมลาร์ นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวมาพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80 – 90 องศาเซลเซียส ลดอุณหภูมิลง นำไประเหยน้ำออกด้วยเครื่อง evaporator หลังจากนั้นจึงทำให้แห้ง โดยการนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส บดให้เป็นผง แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahal (AOAC, 2000) (ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดโดยเทคนิคออโตไลเสท

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม และเชื้อยีสต์ที่ผลิตปริมาณโปรตีนได้สูงสุดจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahal (AOAC, 2000)

เตรียมอาหารในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตร 3.8 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 ทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์จากข้อ 3.5.1.1 ร้อยละ 5 (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร) (สุรนารถ, 2550) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตั้งอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที (Dahui Wang และคณะ,2009) อัตราการให้อากาศ 4.0 vvm (J.N. Nigam, 1998)

เพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ยีสต์มีการเจริญสูงสุด หลังจากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเซลล์กับส่วนที่เป็นของเหลวออกจากกัน นำเซลล์มาละลายน้ำในอัตราส่วนร้อยละ 15-20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับพีเอชให้ได้ 5.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 โมลาร์ นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวมาพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80 – 90 องศาเซลเซียส ลดอุณหภูมิลง นำไประเหยน้ำออกด้วยเครื่อง evaporator หลังจากนั้นจึงทำให้แห้ง โดยการนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส บดให้เป็นผง ซึ่งผงยีสต์ออโตไลเสทที่ได้นำไปเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

3.9 การศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

นำอาหารสังเคราะห์จากข้อ 3.6 มาดัดแปลงและแบ่งออกเป็นอาหารสังเคราะห์ 8 สูตร ดังตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 อาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ

สูตรอาหาร / สารเคมี	สูตร 1 กรัมต่อลิตร	สูตร 2 กรัมต่อลิตร	สูตร 3 กรัมต่อลิตร	สูตร 4 กรัมต่อลิตร	สูตร 5 กรัมต่อลิตร
Glucose	40	-	-	-	-
Molasses	-	40 กรัมน้ำตาล	40 กรัมน้ำตาล	40 กรัมน้ำตาล	40 กรัมน้ำตาล
Yeast extract	10	10	-	-	-
Yeast autolysate	-	-	5	10	15
K_2HPO_4	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
$MnSO_4.4H_2O$	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
$CaCO_3$	20	20	20	20	20

ตารางที่ 3.1(ต่อ) อาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ

สูตรอาหาร / สารเคมี	สูตร 6 กรัมต่อลิตร	สูตร 7 กรัมต่อลิตร	สูตร 8 กรัมต่อลิตร
Glucose	40	40	40
Molasses	-	-	-
Yeast extract	-	-	-
Yeast autolysate	5	10	15
K_2HPO_4	0.25	0.25	0.25
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	0.1	0.1
$MnSO_4.4H_2O$	0.03	0.03	0.03
$CaCO_3$	20	20	20

หมายเหตุ สูตร 1 คือชุดควบคุม (Synthetic medium, SM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.1 ศึกษาการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลคติกในอาหารสังเคราะห์

นำอาหารสังเคราะห์สูตร1 จากในตาราง 3.1 มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.5 จากนั้นนำมาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 จากการทดลองในข้อ 3.5.1.2 ปริมาณร้อยละ 5 (Fitzpatrick และคณะ, 2001) บ่มในสภาวะนิ่ง (Dembczynski และ Jankowski, 2002; จงกมล, 2550) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Tanaka, 2006) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาลด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956) หาค่าพีเอช และวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC

3.9.2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนราคาถูกโดยใช้กากน้ำตาลเปรียบเทียบระหว่างอาหารสังเคราะห์เพื่อผลิตกรดแลคติก

นำอาหารสังเคราะห์สูตร1 และ 2 จากในตาราง 3.1 มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.5 จากนั้นนำมาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 จากการทดลองในข้อ 3.5.1.2 ปริมาณร้อยละ 5 (Fitzpatrick และคณะ, 2001) บ่มในสภาวะนิ่ง (Dembczynski และ Jankowski, 2002; จงกมล, 2550) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Tanaka, 2006) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาลด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956) หาค่าพีเอช และวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC

3.9.3 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบระหว่างยีสต์สกัดกับยีสต์ออโตไลเสทในอาหารสังเคราะห์

นำอาหารสังเคราะห์ทุกสูตรจากในตาราง 3.1 มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.5 จากนั้นนำมาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 จากการทดลองในข้อ 3.5.1.2 ปริมาณร้อยละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 (Fitzpatrick และคณะ, 2001) บ่มในสภาวะนิ่ง (Dembczynski และ Jankowski, 2002; จงกมล, 2550) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Tanaka, 2006) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาลด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956) หาค่าพีเอช และวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC

3.10 การศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในระดับ ฟลาสก์ 2 ลิตรกับถังหมัก 2 ลิตร

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมกับจากตาราง 3.1 มาทำการหมักเพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์ 2 ลิตรและในถังหมัก 2 ลิตร

3.10.1 การผลิตกรดแลคติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

ปริมาตรอาหารที่ใช้หมักคือ 1,330 มิลลิลิตร ทำการเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มในสภาวะนิ่ง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาลด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956) หาค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC และวิเคราะห์การเจริญของเชื้อด้วยวิธี Total plate count (AOAC, 2000)

3.10.2 การผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ปริมาณอาหารที่ใช้หมักคือ 1,330 มิลลิลิตรทำการเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 (70 มิลลิลิตร) ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ไม่ต้องพ่นอากาศและควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.5 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาลด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956) วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC และวิเคราะห์การเจริญของเชื้อด้วยวิธี Total plate count (AOAC, 2000)

3.11 การวิเคราะห์ผล

3.11.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยวิธี Total plate count (AOAC, 2000)

นำน้ำหมักที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเทอาหารแข็ง (MRS agar) ลงไปในจานเพาะเชื้อ ทำการหมุนวนจานเพาะเชื้อให้อาหารและน้ำหมักเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งจานเพาะเชื้อทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว ทำการคว่ำจาน เพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำจานเพาะเชื้อออกมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11.2 การวัดปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)

การวัดปริมาณกรดแลคติกจะใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยนำน้ำหมักที่ได้จากการเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงต่างๆ มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ๆได้มา วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดยกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อน การวิเคราะห์จะใช้คอลัมน์ InersilC8-3ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

3.11.3 การวัดปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)

วัดปริมาณน้ำตาลในอาหารสังเคราะห์โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956)

3.11.4 วัดค่าความเป็นกรดด่าง (พีเอช) ตลอดการทดลอง

3.12 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ

แต่ละการทดลองเป็นแบบสุ่มอิสระโดยสมบูรณ์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าทางสถิติใช้ SPSS 17.0 (Statistic Package for Social Science) การเปรียบเทียบใช้การทดสอบของ Duncan (new multiple range test) ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในการพิจารณาว่ามีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

การทดลองในระดับฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตร ทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Independent Sample T-test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการผลิตโปรตีนสูงสุดของยีสต์ 4 สายพันธุ์และการผลิตยีสต์สกัด (yeast autolysate) เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Candida utilis* TISTR 5001 , *Candida utilis* TISTR 5046 , Baker's Yeast และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (FM) และอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB (Yeast malt extract broth) โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาทำการวัดค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ(ร้อยละ) และวัดการเจริญของเซลล์ และทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahal (AOAC, 2000) พบว่า

พบว่าเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร FM มีความเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นยีสต์สกัด เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแสดงให้เห็นจากค่าปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) 47.79 ซึ่งเป็นค่าปริมาณโปรตีนที่สูงที่สุด ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองกับการทดลองของ Ahmad และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตโปรตีนระหว่าง *Arachniotus* sp. และ *Candida utilis* ในกระบวนการหมัก พบว่าในกระบวนการหมักที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง *Candida utilis* ให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่า *Arachniotus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบผลการศึกษาการผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 4 สายพันธุ์ ใน อาหาร MM และ YM เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนสูงสุดโดยเทคนิค Autolysis

เชื้อ	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)		ผู้ทำการทดลอง
	อาหาร MM	อาหาร YM	
Candida utilis TISTR 5001	47.79	39.65	น.ส.ชญานุช จิตต์อารีย์เทพ น.ส.ธีรนันท์ อิ่มจิตต์ น.ส.นันทรัต จารุทโรภาสน์
Candida utilis TISTR 5046	45.5	39.53	น.ส.ณิชชาภัทร ชื่นจิตร์ น.ส.นพมาส ภาณุโชติเสถียรชัย น.ส.เบญจพร คุณากรวิชญ
Baker's Yeast	44.5	34.4	นายณัฐกานต์ วรกุล น.ส.ทิพย์นภา โดน้อย นายทิวากร ศิริพงษ์
Saccharomyces cerevisiae TISTR 5059	46.27	44.85	น.ส.ปวีณา โต๊ะสำลี น.ส.มณีวรรณ วศินอุดมพร น.ส.รัตตินันท์ นิตยสุข

หมายเหตุ MM หมายถึง Modified Medium

YM หมายถึง Yeast malt extract Medium

4.2 ผลศึกษาแหล่งคาร์บอนราคาถูกโดยใช้กากน้ำตาลเปรียบเทียบระหว่างอาหารสังเคราะห์เพื่อผลิตกรดแลคติก

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1 (Synthetic medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยนำไปบ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงมาวัดปริมาณกรดแลคติก วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ(ร้อยละ) และค่าพีเอช พบว่า

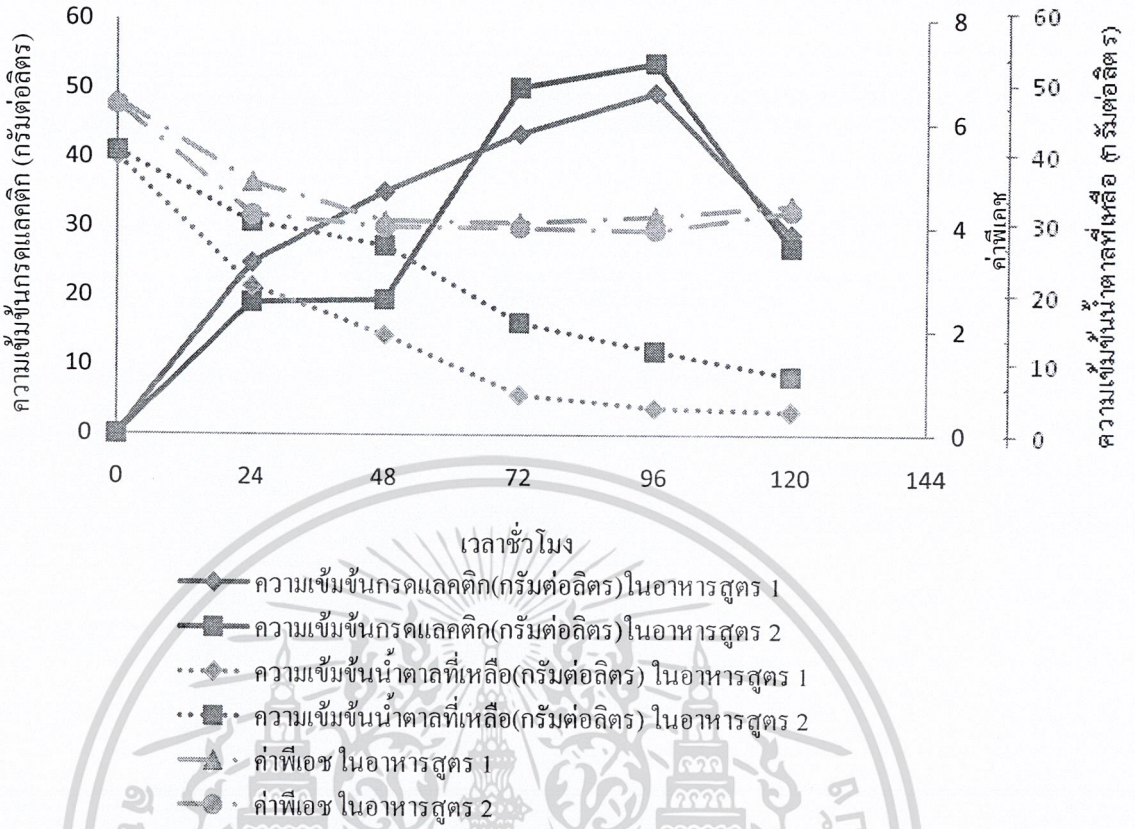
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 53.79 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยได้ปริมาณสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1 ซึ่งได้กรดแลคติกเพียง 49.51 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 และเมื่อทำการวัดค่าพีเอชในชั่วโมงดังกล่าว ได้ค่าพีเอช 3.94 และ 4.22 ในอาหารสูตร 2 และ สูตร 1 ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตร 1 (ร้อยละ 9.56) มีค่าต่ำกว่าอาหารสูตร 2 (ร้อยละ 29.44) จากการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีปริมาณกรดแลคติกสูงกว่า เพราะในกากน้ำตาลมีน้ำตาลหลากหลายชนิด และสารประกอบอื่นๆที่เซลล์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่า อาหารที่มีเพียงกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wee และคณะ (2004) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากโมลาสในการผลิตกรดแลคติก โดยใช้เชื้อ *Enterococus faecalis* ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าที่ความเป็นกรดด่าง 7.0 ได้ปริมาณกรดแลคติก 95.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94.9 และนอกจากนี้ยังมีนักวิจัยหลายท่านที่ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น

Bulut และคณะ (2004) ทำการศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และได้ทำการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนราคาถูกชนิดต่างๆ คือ ฝักถั่ว กากน้ำตาล และรำข้าวสาลี พบว่ากากน้ำตาลจะให้ปริมาณกรกแลคติกสูงสุดคือ 49 กรัม

Kotzamanidis และคณะ (2002) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาลโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130 ได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด 88 กรัมต่อลิตร จากกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการทรีท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงแนวโน้มของความเข้มข้นกรดแลคติก ความเข้มข้นน้ำตาล และพีเอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1 และ สูตร 2 เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

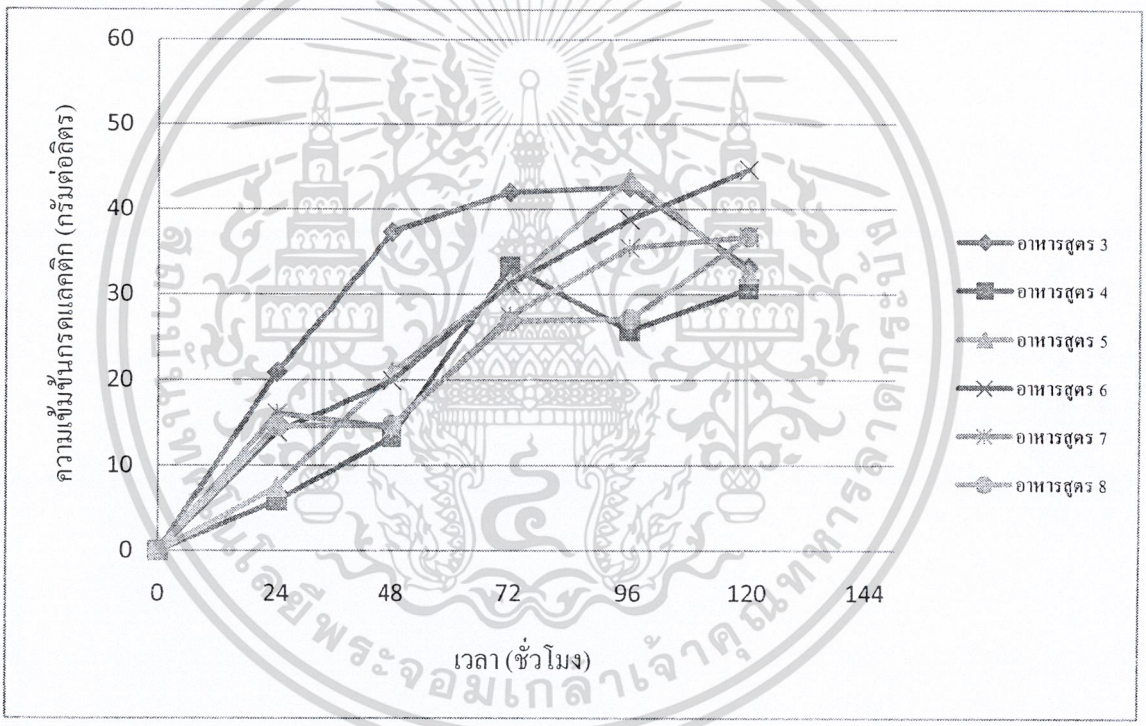
4.3 ผลการศึกษา แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบระหว่างยีสต์สกัดกับยีสต์ออโตไลเสทในอาหารสังเคราะห์

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในอาหารสูตรที่ 3 ถึง สูตรที่ 8 โดยนำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการเก็บทุก 24 ชั่วโมง มาวัดปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอช พบว่า

เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุดเท่ากับ 44.63 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 โดยใช้อาหารสูตร 6 (ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ยีสต์ออโตไลเสท 5 กรัม เป็นแหล่งไนโตรเจน) รองลงมาคือ อาหารสูตร 5 (ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์ออโตไลเสท 15 กรัม) ได้ปริมาณกรดแลคติก 43.62 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96, อาหารสูตร 3 (ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์ออโตไลเสท 5 กรัม) ได้ปริมาณกรดแลคติก 42.74 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96, อาหารสูตร 8 (ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์ออโตไลเสท 15 กรัม) ได้ปริมาณกรดแลคติก 36.75 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120, อาหารสูตร 7 (ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์ออโตไลเสท 10 กรัม) ได้ปริมาณกรดแลคติก

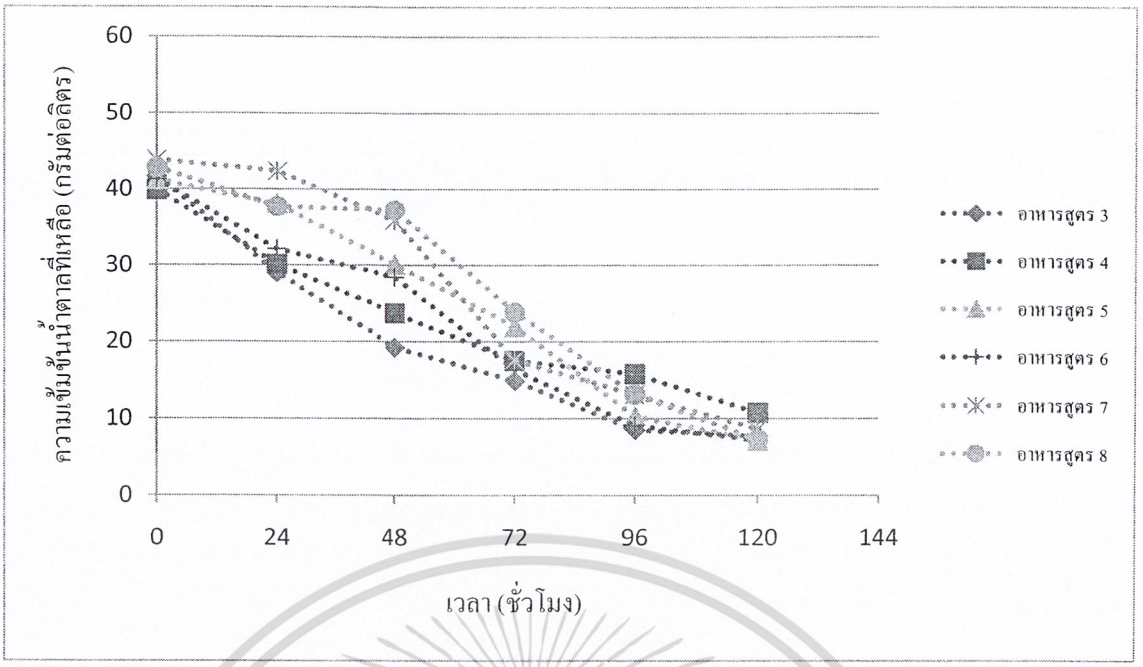
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

36.72 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120, อาหารสูตร 4 (ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์ออโตไลเสท 10 กรัม) ได้ปริมาณกรดแลคติก 33.25 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่ได้ในอาหารสูตร 6 นั้นมีความแตกต่างจากอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ) ในสูตรอาหารสูตรที่ 6, 5, 3, 8, 7 และ 4 มีร้อยละ 17.48, 25.00, 20.46, 19.61, 19.60 และ 43.87 ส่วนพีเอชในขณะที่มีการผลิตกรดแลคติกสูงสุด ในอาหารสูตรที่ 6, 5, 3, 8, 7 และ 4 นั้นมีค่า 4.01, 3.99, 4.20, 3.91, 3.91 และ 3.88 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 ,4.3 การผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ แสดงให้เห็นว่าค่าปริมาณกรดแลคติกที่สูงที่สุด เกิดขึ้นในเวลาที่แตกต่างกัน จึงทำการพิจารณาที่อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ถึง สูตรที่ 8 เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ถึงสูตรที่ 8 เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

จากการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าปริมาณยีสต์ออโตไลเสท ที่แตกต่างกันที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่งผลต่อการผลิตกรดแลคติก และเมื่อทำวิเคราะห์อัตราการผลิตกรดแลคติก พบว่า อาหารสูตร 4 มีอัตราการผลิตกรดแลคติกสูงที่สุดคือ 0.46 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างจากสูตรอาหารอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.3) จึงได้นำอาหารสูตร 4 มาทำการศึกษาเปรียบเทียบ กับอาหารสูตร 1 (ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมียีสต์สกัด 10 กรัมเป็นแหล่งไนโตรเจน) และ สูตร 2 (ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และมียีสต์สกัด 10 กรัมเป็นแหล่งไนโตรเจน) พบว่า อาหารสูตร 2 มีปริมาณกรดแลคติก 53.79 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิต 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าอาหารสูตร 1 และ สูตร 4 ซึ่งมีค่าปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 49.51 และ 33.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีอัตราการผลิต 0.51 และ 0.46 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.4, 4.5) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตกรดแลคติก จะพบว่า อาหารสูตร 2 มีอัตราการผลิตกรดแลคติกสูงที่สุด จึงนำไปทำการศึกษาต่อในระดับฟลาสก์และระดับถังหมัก 2 ลิตร โดยการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยีสต์สกัดมีคุณสมบัติเหมาะสมมากกว่ายีสต์ออโตไลเสท ในการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เพราะยีสต์สกัดแตกต่างจากยีสต์ออโตไลเสทที่ผนังเซลล์ เนื่องจากยีสต์ออโตไลเสทเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ย่อยสลาย โปรตีน และผนังเซลล์ ซึ่งผนังเซลล์จะทำให้จุลินทรีย์ต้องทำการย่อยสลายผนังเซลล์เสียก่อนที่จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ แตกต่างจากยีสต์สกัดที่ประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรตที่ละลาย และกรดนิวคลีอิก ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ทันที ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ เปปโตน ถั่วเหลืองและแอมโมเนียซัลเฟตที่เติมลงในเวย์และกลูโคสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดีและเหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกได้แก่ สารสกัดยีสต์

Nancib และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ เปปโตน ยูเรีย และแอมโมเนียซัลเฟตที่เติมลงในน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตกรดแลคติกได้ดี คือ สารสกัดยีสต์

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ น้ำแช่ข้าวโพด ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 พบว่าเมื่อใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 89 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นกรดแลคติก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 3 ถึง สูตรที่ 8

สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ)
สูตร 3	96	4.20[a]	42.74[a]	20.46[c]
สูตร 4	72	3.88[b]	33.25[c]	43.87[a]
สูตร 5	96	3.99[ab]	43.62[a]	25.00[b]
สูตร 6	120	4.01[ab]	44.63[a]	17.48[c]
สูตร 7	120	3.91[b]	36.72[b]	19.60[c]
สูตร 8	120	3.91[b]	36.75[b]	19.61[c]

สูตร 3 (กากน้ำตาล + YA 5 กรัม +แร่ธาตุ)
สูตร 4 (กากน้ำตาล + YA 10 กรัม +แร่ธาตุ)
สูตร 5 (กากน้ำตาล + YA 15 กรัม +แร่ธาตุ)
สูตร 6 (กูลโคส + YA 5 กรัม +แร่ธาตุ)
สูตร 7 (กูลโคส + YA 10 กรัม +แร่ธาตุ)
สูตร 8 (กูลโคส + YA 15 กรัม +แร่ธาตุ)

*YA หมายถึง ยีสต์ออโตไลเสท

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และตัวอักษรที่ไม่เหมือนกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบผลได้ และอัตราการผลิต ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ถึงสูตรที่ 8

สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
สูตร 3	96	5.00[b]	0.44[a]
สูตร 4	72	1.89[d]	0.46[a]
สูตร 5	96	4.23[c]	0.45[a]
สูตร 6	120	6.18[a]	0.37[b]
สูตร 7	120	4.26[c]	0.30[e]
สูตร 8	120	5.04[b]	0.30[e]

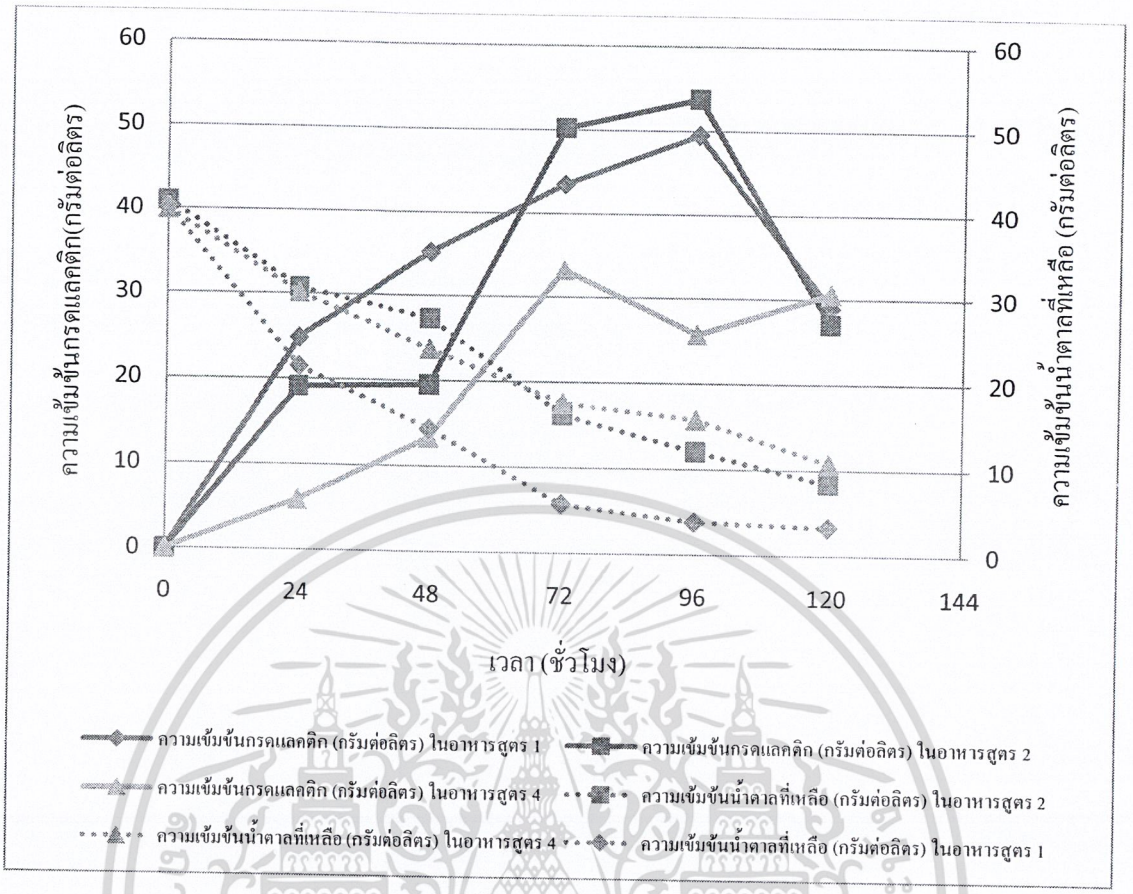
หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และตัวอักษรที่ไม่เหมือนกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นกรดแลคติก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร 1, 2 และ 4

สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ)
สูตร 1	96	4.22[a]	49.51[b]	9.56[e]
สูตร 2	96	3.94[b]	53.79[a]	29.44[b]
สูตร 4	72	3.88[b]	33.25[c]	43.87[a]

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และตัวอักษรที่ไม่เหมือนกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดแลคติก และความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร 1, 2 และ 4 เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบผลได้ และอัตราการผลิต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร 1, 2 และ 4

สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
สูตร 1	96	12.89^{a}	0.51^{b}
สูตร 2	96	4.45^{b}	0.56^{a}
สูตร 4	72	1.89^{c}	0.46^{c}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และตัวอักษรที่ไม่เหมือนกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในระดับ ฟลาสก์ 2 ลิตรกับถังหมัก 2 ลิตร

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 โดยใช้อาหารสูตร 2 (ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์สกัด 10 กรัมเป็นแหล่งไนโตรเจน) เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์ ขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 ทำการควบคุมพีเอชโดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) 20 กรัมต่อลิตร บ่มในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดในอัตราความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ที่ 6.5 ตลอดการทดลอง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าการผลิตกรดแลคติกโดยใช้ถังหมักจะมีค่าสูงสุดอยู่ในชั่วโมงที่ 84 ซึ่งมีปริมาณกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 74.12 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ร้อยละ 19.52 ค่าผลได้ 9.62 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 0.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต 2.10×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์จะให้ค่าปริมาณกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 36.19 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ร้อยละ 46.04 ค่าผลได้ 1.90 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 0.43 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต 2.64×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 84 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการผลิตกรดแลคติกในระดับถังหมักจะให้ค่าต่างๆสูงกว่าในระดับฟลาสก์ และใช้ระยะเวลาสั้นกว่า ยกเว้นค่าปริมาณน้ำตาลที่เหลือในการผลิตกรดแลคติกในระดับถังหมักจะน้อยกว่าในระดับฟลาสก์ เนื่องมาจากเมื่อเซลล์ได้ทำการใช้น้ำตาลจากอาหารเลี้ยงเชื้อมาผลิตกรด เมื่อเซลล์ทำการผลิตกรดแลคติกมากเท่าใด น้ำตาลที่เหลือก็จะน้อยลงเรื่อยๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

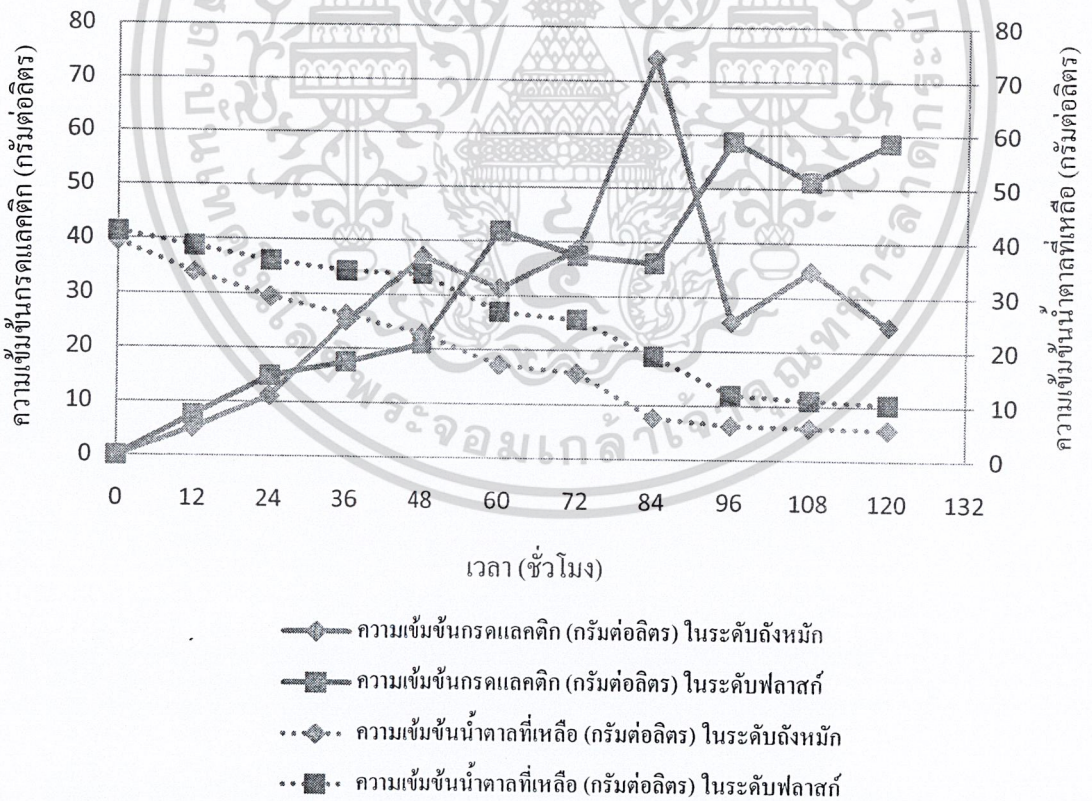
ตารางที่ 4.6 แสดงค่า P- value การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ผลได้ อัตราการผลิต และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ในระดับฟลาสก์และถังหมัก 2 ลิตร

สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU ต่อมิลลิลิตร)
Flask	84	36.19	46.04	1.90	0.43	$2.64x10^8$
Fermenter	84	74.12	19.52	9.62	0.70	$2.10x10^9$
ค่า P-value	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

หมายเหตุ : P-value < 0.01 = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

0.01 < P-value < 0.05 = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

P-value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดแลคติก และความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือในระดับฟลาสก์ และระดับถังหมัก ขนาด 2 ลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลเพื่อผลิตยีสต์ออโตไลเสท โดยใช้เชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์เพื่อหาสายพันธุ์และสูตรอาหารที่เหมาะสม พบว่าสายพันธุ์ที่เหมาะสมคือ *Candida utilis* TISTR 5001 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 47.79 % และศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสทเพื่อผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 โดยศึกษาแหล่งคาร์บอนในน้ำตาลกลูโคสและกากน้ำตาล และศึกษาแหล่งไนโตรเจนในยีสต์สกัดและยีสต์ออโตไลเสท จากผลการทดลองพบว่า กากน้ำตาลที่มีปริมาณ 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 53.79 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิต 4.45 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น และอัตราการผลิต 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 96 ของระยะเวลาการหมัก และได้ศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในอาหารสังเคราะห์ระดับฟลาสก์ 2 ลิตร และถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร พบว่าในระดับถังหมักให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุด โดยผลิตกรดแลคติกได้ 74.12 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 9.62 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.70 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล. 2545. การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากแป้งและกากน้ำตาล. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, พระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

ธีรวุฒิ ฤทธิ์เดชา. 2544. การเลียนแบบกลิ่นรสเนื้อโดยใช้ยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประดิษฐ์ ครุวัณณา, ปทุมพร ฉิมอเนก, พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์ และ ลาวัณย์ ไกรเดช. 2530. การคัดเลือกเชื้อและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับหมักแอลกอฮอล์จากน้ำอ้อยและกากน้ำตาล. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, ประดิษฐ์ ครุวัณณา และ จรูญ คำนวณตา. 2530. การศึกษาผลของสภาพการหมักต่อประสิทธิภาพการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2546. วัตถุเจือปนอาหาร เล่ม 1. นครปฐม : โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตร แห่งชาติ.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ . 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

Ahmad, N. and Marth, E.A. 1989. Behaviour of *Listeria monocytogens* at 7, 13, 21 and 35°C in tryptone broth acidified with acetic, citric or lactic acid. Journal of Food Protection. 52, 688-695.

Ahmad, S., Fayyaz and Abu Saeed Hashmi. 2010. Production of Microbial biomass protein by sequential culture fermentation of *Arachniotus* sp. And *Candida utilis*. Pakistan Journal of Botany. 42(2) : 1225-1234

Albercht, J.J. and Deindoerfer, F.H. 1996. Autolyzed yeast extracts: make foods flavorful. Food Eng. 92-95.

Altaf, M., Naveena, B.J. and Reddy, G. 2005. Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L(+) lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation. Food Technology and Biotechnology. 43,3 : 235-239.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Axelson, L. 1993. Lactic acid bacteria : Classification and physiology In S. Salminen & A. von Wright (Eds) , Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects 2nd ed. New York : Marcel Dekker

Bulut, S., Elibol, M. Ozer and Dursum. 2004. Effect of different carbon sources on L(+) –lactic acid production by *Rhizopus oryzae.* Biochemical Engineering Journal. 21 : 33-37.

Chao, K.C. ; McCarthy, E.F. and McConaghy, G.A. 1980. Yeast autolysis process. U.S Patent. 4,218,481.

Creager, Joan G. , Black, Jacquelyn G. and Davison, Vee E. Microbiology. Principle and Applications. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1994

Daliey, O.D., Dowd, M.K. and Mayorga, J.C. 2000. Influences of lactic on the solubilization of protein during steeping. Journal Agriculture Food Chemistry. 48 : 1352-1357.

D.K.D. Dali,A.M. Deschamps,F. Richard-Forget, (2010) Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins,**Food Control 21**,370–380

Dziezak, J.D. 1987. Yeast and yeast derivertives : definition, Characteristics and processing. Food Tech. 41(2) : 104-121.

E. Guillemard, F. Tondu, F. Lacoin2 and J . Schrezenmeir,(2010) Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic Lactobacillus casei DN-114001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial,**British Journal of Nutrition 103**, 58-68

Food and Drug Administration. 1988. Code of Federal Regulations. U.S. Government Printing Office, Washiton. D.C. Title 21.

Gopal Reddy , Md. Altaf , B.J. Naveena , M. Venkateshwar, E. Vijay Kumar, (2008) Amylolytic bacterial lactic acid Fermentation, **Biotechnology Advances 26** , 22–34

Gradner, W.H. 1972. Acidulants in food processing. Hand book of food additive 2nd ed. Lp : 225-270.

Hough, J.S. and Maddox, I.S. 1970. Yeast autolysis. Process Biochem. 5 : 50-52.

Huang, L.P., Jin, B., Lant, P. and Zhou, J. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus.* Biochemical Engineering journal. 23 : 265-276.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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(4), 759-763.

Jose M. Lorenzo, Maria C. Garcia Fontan, Aida Cachaldora, Inmaculada Franco, Javier Carballo, (2010) Study of the lactic acid bacteria throughout the manufacture of dry-cured lacon (a Spanish traditional meat product). Effect of some additives, Food **Microbiology 27**, 229–235.

Kadam, S.R., Patil, SS., Bastawde, KB., Khire, J.M. and Gokhale. 2006. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. Process Biochemistry (41) : 72-116.

Ketan I. Metha and C.D. Callihan. 2007. Production of protein and fatty acids in the anaerobic fermentation of molasses by *E. ruminantium.* Journal of the American Oil Chemists' Society, Chemistry and Materials Science, Issue Volume 61, Number 11/November, 1984. Pages 1728-1734.

Khalaf, S.A. 2001. Lactic acid production by interspecific hybrids of *Rhizopus* strains from potato processing peel waste. Egypt Journal of Microbiology. 36(1), 89-102.

Kotzamanidis, T. Roukas and G. Skaracis. 2002. Optimization of lactic acid production from beet molasses by lactobacillus delbrueckii NCIMB 8130. World Journal of microbiology 18: 441-448.

Martak , J., Schlosser, S., Sabolova, Kristofikova, L. and Rosenberg, M. 2003. Fermentation of lactic acid with *Rhizopus arrhizus* in a stirred tank reactor with a periodical bleed and feed operation. Process Biochemistry. 25, 1-11.

Mossel, D.D.D. 1989. Adequate protedtion of the public against food – transmitted diseases of microbial etiology. International Journal of Food Microbiology. 9, 271-294.

Muller, V. 2001. Bacterial fermentation. Encyclopedia of life Science. 1-7.

Nagodawithana, T.W. 1994. Savory flavor. In Nagodawithana, T.W. (ed.). Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients. New York : John Wiley & Sons.

Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, Blanchard, Boudrant and 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A. 2004. L(+) lactic acid fermentation and is product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology. 7.2 : 167-179.

Nlumthanorm, A. 1997. Production of yeast extracts from spent brewer's yeast. Master's Thesis, Department of biotechnology, Graduate School, Mahidol University

Oh, H., Wee, Y.J., Yun, J.S., Hun, S.H., Jung, S. and Ryu, H.W. 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. Bioresource Technology. 96 : 1554-4562.

Pailin Panvichit. 2005. Application of com posite PDMS/PVDE membrane in perstraction system of ethanol fermentation in fed-batch process from cane molasses, Suranaree University of Technology School of Biotechnology.

Pauli, T. and Fitzpatrick, J.J. 2002. Malt combing nut as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic acid by fermentation with *Lactobacillus casei* Process Biochemistry52 38 : 1-6.

Peppler, H.J. 1982. Yeast extract. In Rose, A.K. (ed.) Economic Microbiology. Vol.7. London : Academic Press.

Potman, R.P. and Wesdrop, J. 1994. Method for the preparation of a yeast extract. U.S. Patent 5,288,509.

Prescott, A.M., Harley, J.P. and Kiein, D.A. 2008. Microbiology. 7th edition. New York : McGraw-Hill

Reed, G. and Nagodawithana, T.W. 1991. Yeast technology. 2nd ed. New York : AVI. Publlshing

Rojan P. John , G.S. Anisha , K. Madhavan Nampoothiri , Ashok Pandey, (2009) Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production, **Biotechnology Advances 27**, 145–152

Roukas, T. and Kotzekidou, P. 1998. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed culture of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* cell using fedbatch culture. Enzyme and Microbial Technology. 22 : 199-204.

Roukas. 1998. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan. J. Process biochemistry Vol 33, 805-810.

Salminen, S., Wright, A. and Ouweland, A. 2004. Lactic acid bacteria. 3 rd ed. New York : Marcel Dekker.

Salminen, S. and Von Wright, A. 1993. Lactic acid bacteria. New York : Marcel Dekker

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wee, Y.J., Kim. J.N., Yun, J.S. and Ryu, H.W. 2004. Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. Enzyme and Microbial Technology. 35 : 568-573.

Wee, Y.J., Kim. J.N., Yun, J.S. and Ryu, H.W. 2006. Pilot-Scale Lactic Acid Production via Batch Culturing of *Lactobacillus* sp. RKY2 Using Corn Steep Liquor As a Nitrogen Source. Technol Biotechnol. 44,2 : 293-298.

Yun, J.S., Wee, T.J. and Ryu, H.W. 2003. Production of optically pure l(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. Enzyme and Microbial Technology. 33 : 416-423.

[Online].Available : http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK5/chapter3/t5-3-l4.htm

[Online].Available : http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=83&i2=15

[Online].Available : http://www.thaisugarmill.com/index.php?lang=th&ds=product_detail-view&id=2GEIwQ08LXmNYdyD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อาหาร Yeast malt extract agar (YMA)

เปปโตน (peptone)	5	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	3	กรัมต่อลิตร
มอลต์สกัด (malt extract)	3	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	3	กรัมต่อลิตร
วุ้น (agar)	15	กรัมต่อลิตร
ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6-7		

1.2 อาหาร Yeast malt extract broth (YMB)

เปปโตน (peptone)	5	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	3	กรัมต่อลิตร
มอลต์สกัด (malt extract)	3	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	3	กรัมต่อลิตร
ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6-7		

1.3 อาหาร MRS (Fu และ Mathews, 1999; จงกมล, 2550)

เนื้อสกัด (meat extract)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
ดี-กลูโคส	20	กรัมต่อลิตร
Tween-80	1	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONA)	5	กรัมต่อลิตร
ไตรแอมโมเนียมซิเตรท (CH_3COONH_3)	2	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.05	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 (Nancib และคณะ, 2001; Senthurant และคณะ ,1999)

1.4 อาหาร Pre-culture

กลูโคส (glucose)	20	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม

ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6-7

1.5 อาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลคติก (ดัดแปลงจาก Youssef และคณะ, 2000; Vasala และคณะ, 2005)

*กลูโคส	40	กรัมต่อลิตร
*ยีสต์สกัด	10	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.10	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัมต่อลิตร

ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6-7

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ทำการปรับค่าพีเอช แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.6 อาหารดัดแปลง (Modified medium) สำหรับการผลิตยีสต์สกัด (Rajoka, 2006; Li, 2009; Ahmed, 2010)

ยีสต์สกัด	0.5	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมซัลเฟต	5	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์	0.13	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.5	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.0±0.1

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดนำมาละลายในสารละลายกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร เพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรทำการปรับค่าพีเอช แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric (Dubois และคณะ, 1956)

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

1.1.2 คิวเวตแก้ว

1.1.3 ปิเปต

1.2 สารเคมี

1.2.1 กรดซัลฟูริก (reagent grade 95.5%,specific gravity 1.84)

1.2.2 สารละลายฟีนอล เข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดย ละลายฟีนอล (Phenol) 5 กรัม ในน้ำกลั่น 95 กรัม

1.2.3 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1000 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.0	1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 วิธีการ

1.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล ร้อยละ 5 ลงไป 1 มิลลิลิตร

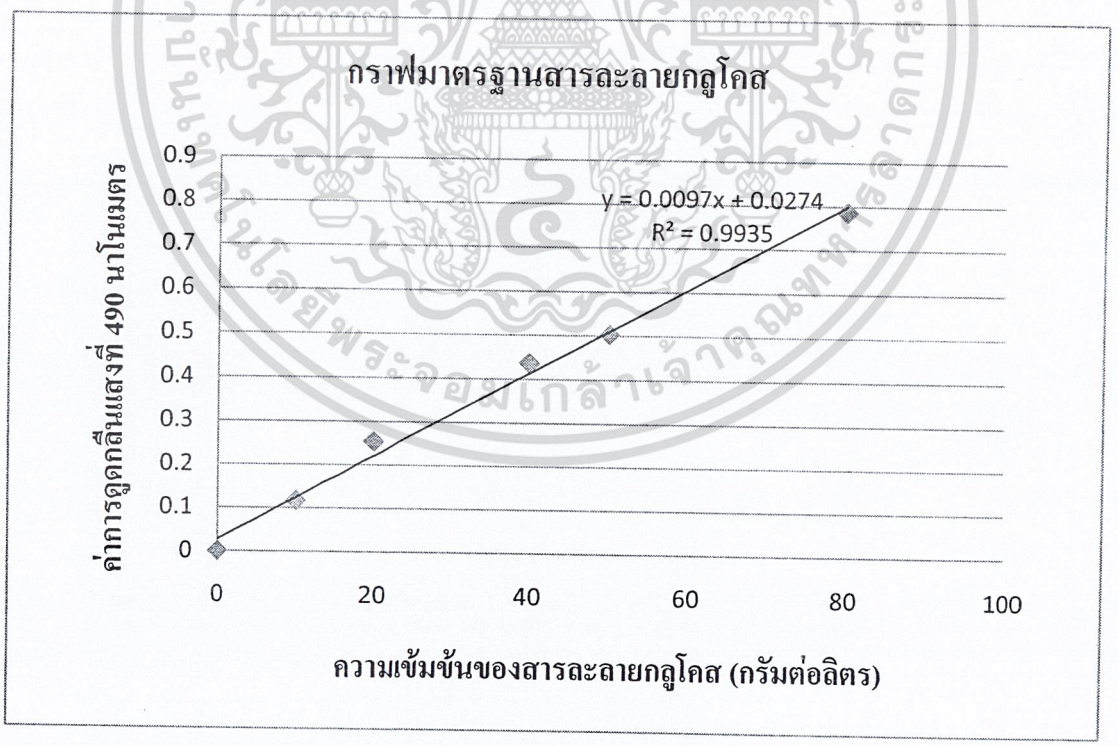
1.3.2 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรง จะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการปล่อยลงที่ข้างหลอด

1.3.3 ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที

1.3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

1.3.5 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร}) \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1000}$$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjedahl medthod (A.O.A.C. 2000)

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 Digestion unit

2.1.2 Distillation unit

2.1.3 Titration unit

2.1.4 Boiling chips

2.1.5 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4 93-98%) reagent grade

2.1.6 กรดบอริก (Boric acid) เข้มข้น ร้อยละ 2

2.1.7 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

2.1.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ร้อยละ 30

2.1.9 Mix indicator

2.1.10 คะตะลิสต์ผสม (catalyst mixture) ประกอบด้วย โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ ร้อยละ 96 คอปเปอร์ซัลเฟต ร้อยละ 3.5 และ เซเลเนียมไดออกไซด์ ร้อยละ 0.5

2.2 การเตรียม Mix indicator

2.2.1 เตรียม Bromocresol green ร้อยละ 0.1 ในแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 และ Methyl red ร้อยละ 0.1 ในแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95

2.2.2 ผสม 10 มิลลิลิตร Bromocresol green Methyl red กับ 2 มิลลิลิตร Methyl red

2.3 วิธีการ

2.3.1 ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 5 กรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ใส่ลงใน digestion tube

2.3.2 เติม catalyst ลงไป 2 กรัม เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 25 มิลลิลิตร และ boiling chips

2.3.3 นำ digestion tube มาใส่ใน digest unit ย่อยสลายโปรตีนจนได้สารละลายสีฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 รอให้สารละลายสีฟ้าเย็น และหมดควันของไอกรดก่อน เติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร

2.3.5 ปิเปตกรดบอริก 20-25 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask 250 มิลลิลิตร หยด mix indicator 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปวางใต้เครื่องกลั่นโดยให้ปลายของ condenser จุ่มในสารละลาย

2.3.6 นำ digestion tube มาเข้าเครื่องกลั่น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 30 ลงใน digestion tube 50 มิลลิลิตร เปิดชุดกลั่น และทำการกลั่นประมาณ 3-5 นาที แอมโมเนียมที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา จะผ่าน condenser ลงสู่สารละลายกรดบอริก สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากกสีม่วงน้ำเงิน (bluish purple) ไปเป็นสีเขียว-น้ำเงิน เมื่อสารละลายบอริกเปลี่ยนสีประมาณ 5 นาที ลดระดับของกรดบอริก ใน Erlenmeyer flask ให้ปลาย condenser อยู่เหนือระดับของเหลว 1 เซนติเมตร ล้างปลายท่อ condenser ด้วยน้ำกลั่น แล้วให้ปฏิกิริยาดำเนินไปอีก 1-2 นาที

2.3.7 นำ flask ที่กลั่นเสร็จแล้วมาไทเทรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล จนสีเขียวน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีใส-ไม่มีสี (อาจไทเทรตจนเป็นสีชมพู ลบปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกออก 0.02 มิลลิลิตร) จะสังเกตจุดยุติได้ง่ายขึ้น เนื่องจากสีชมพูจะเข้มข้นเมื่อหยดกรดไฮโดรคลอริกเกินเพียงหยดเดียว

2.3.8 ทำแบลงค์ (ตั้งแต่ข้อ 1-8) โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

2.3.9 คำนวณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน $= \frac{(A-B)*CD*100}{E*1000}$

เปอร์เซ็นต์โปรตีน = (เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน)*6.25

เมื่อ A = มิลลิลิตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับแบลงค์

C = ความเข้มข้น (N) ของกรดไฮโดรคลอริก

D = 14

E = น้ำหนักของตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

3.1 วิธีการเตรียมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85

3.1.1 ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 นำตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจาง

3.2.2 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างแต่ละความเจือจางที่เหมาะสมใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วจานละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้ 3 ซ้ำ ในแต่ละระดับความเจือจาง

3.2.3 นำอาหารแข็ง MRS ไปหลอมให้ละลายแล้วทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร

3.2.4 เขย่าจานโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็ง

3.2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

3.2.6 นับโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีรวมทั้ง 3 จาน แล้วหาค่าเฉลี่ยรายงานจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร โดยคูณค่าเฉลี่ยนั้นด้วยระดับความเจือจางที่ตรวจนับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วย เครื่อง High Performance Liquid Column (HPLC)

4.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแลคติกด้วย HPLC

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแลคติกด้วย HPLC ประกอบด้วย

คอลัมน์ : inertsil C8-3

เฟสเคลื่อนที่ : กรดซัลฟูริก

อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาณตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ : 20 ไมโครลิตร

เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง: 30 นาที

เครื่องตรวจสอบ : เครื่อง UV visible ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

การเตรียมตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ : ตัวอย่างที่นำมาทำการทดสอบได้มาจากส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงจากตัวอย่างที่เก็บเพื่อทำการวิเคราะห์ทุกชั่วโมง กรองส่วนใสผ่านเซลลูโลสเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อนวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วย HPLC

4.2 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

1. เปิดทุกยูนิตของ HPLC

2. ยก Sinker ใส่ในขวดของเฟสเคลื่อนที่

3. เปิด Drain ของปั๊มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั๊ม

4. ให้สังเกตว่าในสายยางของ Sinker มีฟองอากาศอยู่หรือไม่ ถ้ายังมีให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจนปั๊มหยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ปั๊มหยุดทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ปิด Drain valve

6. ตั้งค่าอัตราการไหล ค่าความดันสูงสุด และค่าความดันที่ต่ำสุดที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับปั๊ม (ค่าความดันสูงสุดคือค่าความดันที่คอลัมน์รับได้สูงสุด)

7. ตั้งพารามิเตอร์ให้กับเครื่องตรวจสอบ

8. สั่งปั๊มทำงานตามสภาวะที่ใช้วิเคราะห์

4.3 ขั้นตอนการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

1. ปิดปั๊ม HPLC

2. เทเฟสเคลื่อนที่ลงในบีกเกอร์

3. เปิด Drain ของปั๊มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั๊ม

4. ยก Sinker ออกจากเฟสเคลื่อนที่เก่า แล้วจุ่มในบีกเกอร์ที่มีเฟสเคลื่อนที่ใหม่อยู่รอจนปั๊มดูดเฟสเคลื่อนที่ในบีกเกอร์ประมาณ 20-30 มิลลิลิตร

5. ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์แล้วเช็ดสายของ Sinker ด้วยกระดาษทิชชู่ที่สะอาดแล้วนำ Sinker จุ่มลงในเฟสเคลื่อนที่ใหม่

6. ในระหว่างขั้นตอนที่ 1-5 ถ้าปั๊มหยุดทำงานให้กดปุ่ม Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด

7. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจนปั๊มหยุดทำงานเองหรือให้กด Purge เพื่อให้ปั๊มหยุดทำงาน

8. ปิด Drain valve ที่ปั๊มแล้วสั่งปั๊มทำงานตามสภาวะที่ใช้วิเคราะห์

4.4 ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง

1. ตรวจดูสถานะของเครื่องแสดงผลให้อยู่ในสถานะ Ready

2. ตรวจดูให้แน่ใจว่าเครื่องตรวจสอบอยู่ในสถานะ Ready

3. รอจน baseline ค่อนข้างนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ถ้า baseline นิ่งสูงกว่าศูนย์เล็กน้อยสามารถสั่งศูนย์อัตโนมัติโดยกด Z ทำการฉีดตัวอย่าง

4.5 ตัวอย่างการฉีด HPLC

1. ล้างเข็มฉีดตัวอย่างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง

2. ล้างเข็มตัวอย่างที่ต้องการจะฉีดด้วยตัวอย่าง 3 ครั้งดูดตัวอย่างโดยไม่มีฟองอากาศในเข็มฉีดแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ตามที่จะฉีดเข้าระบบ HPLC

3. แทงเข็มเข้าไปใน inject ให้สุดโดย injector (ถ้าต้องการ fill sample ให้เต็ม loop ต้องฉีด sample มากกว่า valumn ของ loop 5 เท่า)

4. เมื่อ HPLC system พร้อมให้บิด injector มาที่ตำแหน่ง inject (กรณีไม่มี AUTO-START ให้กดปุ่ม START ที่ C-R7)

5. รอประมาณ 5-10 วินาที และดึงเข็มตัวอย่างออกจาก injector

6. ล้าง injector ด้วยน้ำกลั่น 5-10 มิลลิลิตร

4.6 ขั้นตอนการปิดเครื่อง

1. หลังจากฉีดตัวอย่างสุดท้ายเสร็จแล้วให้ run เฟสเคลื่อนที่ต่ออีก 30 นาที

2. สั่งปิดปั๊ม

3. ปิดเครื่อง HPLC แล้วยก Sinker ให้พ้นเฟสเคลื่อนที่

4.7 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีหยุดใช้ไม่เกิน 1 เดือน)

1. RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที

2. RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เก็บคอลัมน์ 30 นาที

3. ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีหยุดใช้มากกว่า 1 เดือน)

1. RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที

2. RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เก็บคอลัมน์ 60 นาที

3. หยุดปั๊มแล้วถอดคอลัมน์ออกจากระบบแล้วต่อ pipe เปล่าแทนที่จะปิดคอลัมน์ด้วย Purge ให้แน่น

4.9 ขั้นตอนการใช้งาน C-R7A

1. กดปุ่ม C-R7A ในกรณีที่มี 2 drive ให้ใส่แผ่น system disk ใน drive 1 และ บันทึกข้อมูลใน drive 2 จะปรากฏหน้าจอ

2. กด win 1 จะปรากฏน่าจอ MENU ของ WIN1 เลือกข้อ 2 ตามด้วย ENTER จะปรากฏ G หรือ L เพื่อเรียก Analysis File ที่เคยสร้าง File เก็บไว้, F ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูก Load ขึ้นมาใช้งาน, R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่าใน Analysis File ที่ Load ขึ้นมาใช้อยู่, A ในกรณีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File กับทุกๆครั้งของการฉีด

วิธีการสร้าง Analysis File ใหม่

- เลือก E เพื่อปรากฏหน้าจอ Analysis File

- แก้ไขพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ WIDTH 5

DRIFT 0

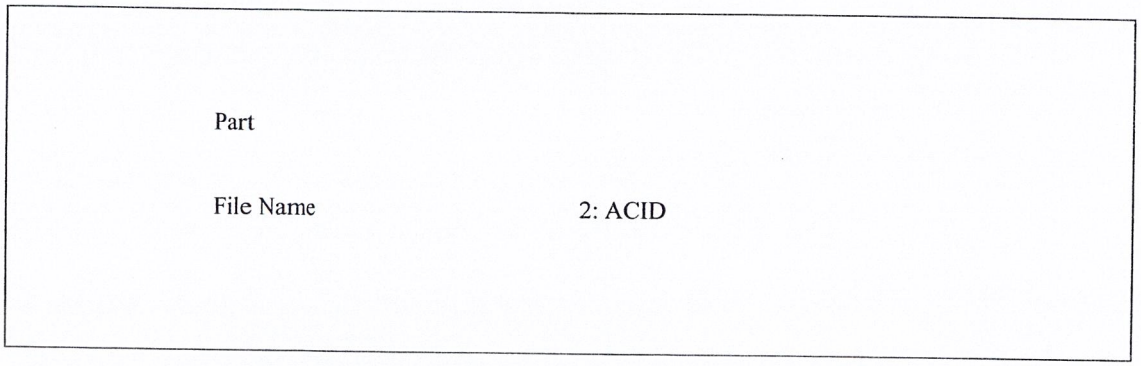
และ T.DBL (min) 1000

- กด EXIT เพื่อออกจากหน้าจอ จะปรากฏคำถาม SAVE FILE? •YES •NO กด Y จะปรากฏ

Part	
File Name	2:

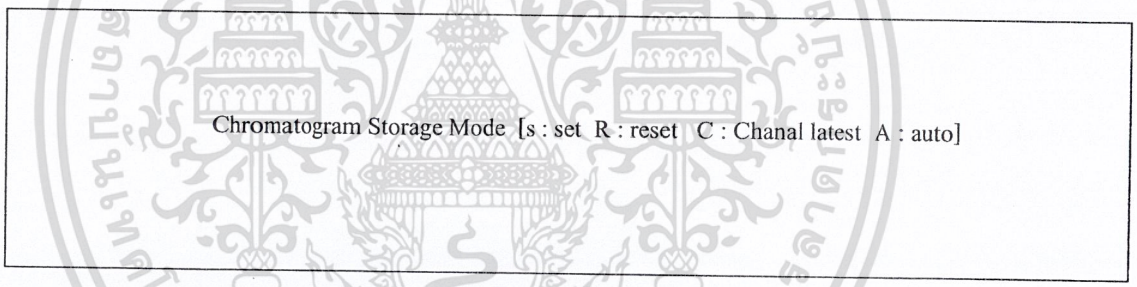
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำหนด Drive และชื่อ Analysis File ตามที่ต้องการตรงตำแหน่ง File Name ตามด้วย Enter เช่น

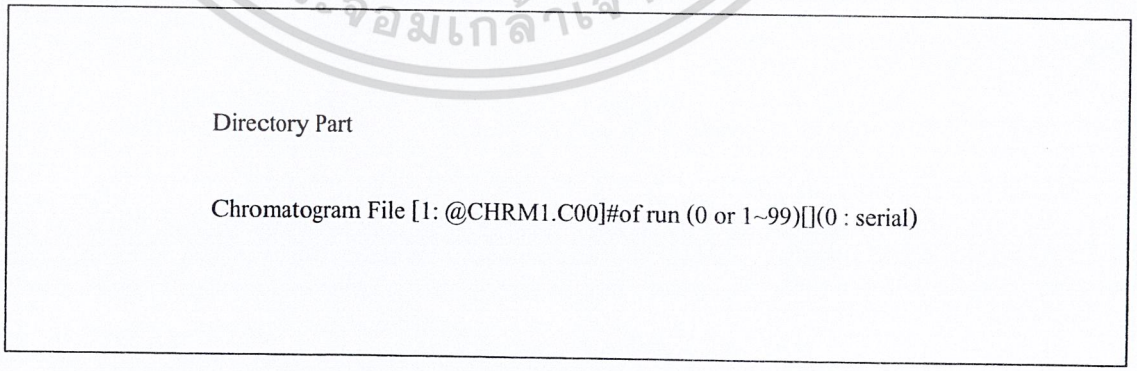


หลังจากการ Save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ Win 1

ตั้งชื่อ File สำหรับ Save ข้อมูลของ Chromatogram เลือกตามข้อ 3 ตามด้วย ENTER จะปรากฏ



เลือก S เมื่อต้องการที่จะตั้งชื่อ file สำหรับเซฟ จะปรากฏ



กำหนด Drive และชื่อ File ตามด้วย ".C00" และ ENTER จำนวนโครมาโตแกรมที่ต้องการ Save ในชื่อเดียวกันนี้ (สูงสุดที่ 99) และ ENTER เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Directory Part

Chromatogram File [2: LACTIC.C00]#of run (0 or 1~99)[](0 : serial)

เลือก R เมื่อต้องการยกเลิกชื่อข้างต้น

C ยกเลิกการ Save ของโครมาโตแกรมสุดท้าย

A เมื่อต้องการให้เครื่อง Save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

- เลือกข้อ 1 จากหน้าจอ MENU ของ WIN 1 จากนั้นรอจนสังเกตเห็นเส้น BASELINE ค่อนข้างเรียบจากนั้นทำการ Zero สัญญาณจาก Detector โดยกดปุ่ม ZERO สัญญาณจาก Detector จนกว่าจะสามารถ set 0 ที่ Detector ได้

ทำการ test slope ของสัญญาณที่ส่งมาโดยกด S ที่เครื่อง C-R7A เครื่องจะใช้เวลาทดสอบประมาณ 10 เท่าของค่า Width ที่ตั้งไว้ใน Analysis File หลังจากการทดสอบ สิ้นสุดค่า slope ที่ได้จะถูก Save ใน Analysis File อัตโนมัติถ้าต้องการแก้ไขให้กลับเข้าสู่หน้า MENU ของ WIN 1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไข Analysis File

- เมื่อ BASE line นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณและให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START ในกรณีที่เครื่อง C-R7A สามารถเชื่อมต่อและควบคุมการทำงานของ HPLC จะได้สามารถของดูค่าต่างของเครื่อง HPLC ผ่านเครื่อง C-R7A ได้จากหน้า MENU ของ WIN 1 โดยเลือกข้อ 7: LC Monitor ตามด้วย ENTER

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	การเจริญของเซลล์ (OD)
0	5.38	36.94	0.00	7.13
12	4.76	10.54	71.46	10.23
24	5.23	8.49	77.02	15.28
36	5.18	7.49	79.72	16.85
48	5.32	4.26	88.47	18.13
60	5.00	3.69	90.02	21.00
72	5.18	3.65	90.12	26.55

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	การเจริญของเซลล์ (OD)
0	5.02	11.69	0.00	0.06
12	4.83	2.14	81.67	5.53
24	5.01	2.17	81.44	7.59
36	4.79	1.59	86.38	11.30
48	5.34	1.07	90.86	14.25
60	5.18	1.16	90.08	15.00
72	5.42	0.99	91.51	15.80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	การเจริญของเซลล์ (OD)
0	5.66	27.61	0.00	0.36
12	4.75	9.46	65.76	7.65
24	5.06	7.94	71.26	10.11
36	4.96	7.77	71.87	11.25
48	4.90	7.02	74.57	13.83
60	5.00	6.48	76.65	16.62
72	5.04	5.89	78.68	18.03

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	การเจริญของเซลล์ (OD)
0	6.36	13.96	0.00	0.17
12	4.51	3.30	76.36	3.82
24	5.00	3.05	78.15	7.86
36	5.07	2.63	81.16	10.88
48	5.20	2.50	82.09	11.22
60	5.64	2.09	85.03	13.80
72	5.58	1.58	88.68	8.62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ Baker's Yeast

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	การเจริญของเซลล์ (OD)
0	6.10	35.91	0.00	0.02
12	4.35	28.83	19.70	5.88
24	4.34	19.16	46.65	2.39
36	3.25	13.37	62.77	6.95
48	3.61	8.62	75.98	7.04
60	4.62	6.78	81.12	9.00
72	4.41	4.86	86.47	7.25

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ Baker's Yeast

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	การเจริญของเซลล์ (OD)
0	5.25	11.13	0.00	0.143
12	4.34	10.60	72.79	4.65
24	4.17	8.80	77.42	2.55
36	3.26	4.60	88.19	5.89
48	4.51	2.42	93.79	8.55
60	4.12	2.19	94.37	10.04
72	4.52	1.30	96.66	12.45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	การเจริญของเซลล์ (OD)
0	5.98	34.58	0.00	1.08
12	4.97	27.33	20.97	2.42
24	5.37	17.19	50.29	3.28
36	5.1	14.59	57.81	5.83
48	4.97	12.19	64.75	8.75
60	4.87	10.25	70.36	7.13
72	5.91	8.74	74.73	6.54

ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	การเจริญของเซลล์ (OD)
0	5.98	3.33	0.00	0.13
12	4.97	2.51	24.62	4.10
24	5.37	2.16	35.14	6.30
36	5.10	0.67	79.88	10.42
48	4.97	0.64	80.78	12.25
60	4.87	0.50	84.98	12.19
72	5.91	0.45	86.49	9.87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณกรดแลคติกในอาหารสังเคราะห์ ทั้ง 8 สูตรในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)							
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6	สูตร 7	สูตร 8
0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	24.84	19.11	20.92	5.89	7.50	13.91	16.10	14.59
48	35.21	19.51	37.36	13.35	20.89	19.92	14.40	14.77
72	43.53	50.23	42.02	33.25	31.27	31.24	27.45	26.88
96	49.51	53.79	42.74	25.76	43.62	38.78	35.47	27.15
120	29.01	27.06	33.16	30.65	32.50	44.63	36.72	36.75

ตารางที่ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารสังเคราะห์ทั้ง 8 สูตรในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช							
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6	สูตร 7	สูตร 8
0	6.43	6.36	6.49	6.47	6.45	6.46	6.41	6.47
12	4.76	4.33	4.49	5.11	4.60	3.55	3.55	3.55
24	4.87	4.24	4.13	4.07	4.13	4.10	3.96	3.79
36	3.96	3.92	4.15	4.44	4.16	3.91	3.70	3.73
48	4.13	4.01	4.13	4.09	3.79	3.95	3.78	3.72
60	4.03	3.96	4.16	4.00	3.96	3.93	4.03	4.08
72	4.09	3.99	4.28	3.88	3.80	3.96	3.89	3.84
84	4.24	3.87	4.30	3.68	3.84	3.96	3.90	3.84
96	4.22	3.94	4.20	4.00	3.99	3.82	3.88	3.76
108	4.26	3.96	4.57	3.95	3.94	3.98	3.94	3.83
120	4.43	4.31	4.40	4.07	4.00	4.01	3.91	3.91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 8 สูตร ในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)							
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6	สูตร 7	สูตร 8
0	40.13	40.97	41.68	39.91	41.24	41.30	43.91	42.84
24	21.44	30.72	29.05	30.13	38.06	32.13	42.40	37.73
48	14.4	27.33	19.2	23.72	30.111	28.44	35.88	37.27
72	5.72	16.16	14.91	17.511	22	16.40	17.6	23.86
96	3.84	12.06	8.53	15.8	10.311	9.08	13.13	13.15
120	3.31	8.4	7.7	10.77	7.155	7.22	8.611	7.28

ตารางที่ 12 แสดง ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และพีเอช จากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์ และถังหมัก 2 ลิตร

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		พีเอช		จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU ต่อมิลลิตร)	
	ถังหมัก	ฟลาสก์	ถังหมัก	ฟลาสก์	ถังหมัก	ฟลาสก์	ถังหมัก	ฟลาสก์
0	0	0	39.44	41.33	6.5	6.37	7.6×10^{6}	6.6×10^{6}
12	5.14	7.60	33.89	38.70	6.5	5.41	2.24×10^{8}	1.64×10^{8}
24	11.22	14.86	29.48	36.09	6.5	3.86	2.05×10^{9}	1.44×10^{8}
36	24.98	17.52	26.22	34.30	6.5	3.70	5.4×10^{8}	4.3×10^{8}
48	37.10	20.99	22.80	33.83	6.5	3.71	7.75×10^{8}	1.04×10^{9}
60	31.35	41.9	17.22	26.98	6.5	3.63	7.04×10^{8}	4.85×10^{8}
72	38.53	37.46	15.80	25.69	6.5	3.65	1.09×10^{9}	1.76×10^{9}
84	74.12	36.18	7.7	19.03	6.5	3.63	2.10×10^{9}	2.64×10^{8}
96	25.43	58.74	6.35	11.96	6.5	3.88	1.20×10^{9}	5.05×10^{8}
108	34.81	51.27	5.97	11.10	6.5	3.75	1.86×10^{9}	3.65×10^{9}
120	24.73	58.57	5.76	10.40	6.5	3.77	1.50×10^{9}	2.35×10^{9}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณกรดแลคติกของอาหารสูตร 3 ถึง สูตร 8 ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่างซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ANOVA

lactic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	324.130	5	64.826	62.653	.000
Within Groups	12.416	12	1.035		
Total	336.546	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

lactic

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4.000	3	33.25300		
7.000	3		36.72200	
8.000	3		36.75700	
3.000	3			42.74400
5.000	3			43.62500
6.000	3			44.63100
Sig.		1.000	.967	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่าพีเอชของอาหารสูตร 3 ถึง สูตร 8 ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ANOVA

pH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.207	5	.041	2.138	.130
Within Groups	.233	12	.019		
Total	.440	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

pH

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4.000	3	3.8800	
7.000	3	3.9100	
8.000	3	3.9100	
5.000	3	3.9900	3.9900
6.000	3	4.0100	4.0100
3.000	3		4.2000
Sig.		.316	.104

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของร้อยละของน้ำตาลที่เหลือของอาหารสูตร 3 ถึง สูตร 8 ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่างซึ่งแสดงการมี นัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ANOVA

sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1466.297	5	293.259	120.575	.000
Within Groups	29.186	12	2.432		
Total	1495.483	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

sugar

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
6.000	3	17.48200		
7.000	3	19.60500		
8.000	3	19.61600		
3.000	3	20.46400		
5.000	3		25.00000	
4.000	3			43.87300
Sig.		.050	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่าผลได้ของอาหารสูตร 3 ถึง สูตร 8 ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ANOVA

yield

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30.799	5	6.160	395.999	.000
Within Groups	.187	12	.016		
Total	30.986	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

yield

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05			
trt	N	1	2	3	4
4.000	3	1.89400			
5.000	3		4.23700		
7.000	3		4.26600		
3.000	3			5.00000	
8.000	3			5.04100	
6.000	3				6.18300
Sig.		1.000	.781	.694	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของอัตราการผลิตกรดแลคติกของอาหารสูตร 3 ถึง สูตร 8 ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ANOVA

product

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.082	5	.016	133.704	.000
Within Groups	.001	12	.000		
Total	.083	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

product

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
7.000	3	.30200		
8.000	3	.30600		
6.000	3		.37800	
3.000	3			.44400
5.000	3			.45500
4.000	3			.46200
Sig.		.666	1.000	.081

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณกรดแลคติกของอาหารสูตร 1 สูตร 2 และสูตร 4 ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ANOVA

lactic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	704.747	2	352.373	280.992	.000
Within Groups	7.524	6	1.254		
Total	712.271	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

lactic

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4.000	3	33.25300		
1.000	3		49.51300	
2.000	3			53.79600
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่าพีเอชของอาหารสูตร 1 สูตร 2 และสูตร 4 ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ANOVA

pH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.198	2	.099	8.373	.018
Within Groups	.071	6	.012		
Total	.268	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

pH

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05	
trt	N	1	2
4.000	3	3.8800	
2.000	3	3.9400	
1.000	3		4.2200
Sig.		.524	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของร้อยละน้ำตาลที่เหลือของอาหารสูตร 1 สูตร 2 และสูตร 4 ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ANOVA

sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1780.388	2	890.194	157.678	.000
Within Groups	33.874	6	5.646		
Total	1814.262	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

sugar

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05		
trt	N	1	2	3
1.000	3	9.56500		
2.000	3		29.44200	
4.000	3			43.87300
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่าผลได้ของอาหารสูตร 1 สูตร 2 และสูตร 4 ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ANOVA

yield

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	198.799	2	99.399	1338.233	.000
Within Groups	.446	6	.074		
Total	199.245	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

yield

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05		
trt	N	1	2	3
4.000	3	1.89400		
2.000	3		4.45300	
1.000	3			12.89400
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของอัตราการผลิตกรดแลคติกของอาหารสูตร 1 สูตร 2 และสูตร 4 ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ANOVA

product

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.015	2	.008	46.491	.000
Within Groups	.001	6	.000		
Total	.016	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

product

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4.000	3	.46200		
1.000	3		.51700	
2.000	3			.56300
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณกรดแลคติกในระดับฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2ลิตรด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Independent Sample T-test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

T-Test

Group Statistics

	trt	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
lactic	Flask	3	36.18600	3.550696	2.049995
	Fermentation	3	74.12500	2.397827	1.384386

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
lactic	Equal variances assumed	.785	.426	-15.337	4	.000	-37.939000	2.473662	-44.806988	-31.071012
	Equal variances not assumed			-15.337	3.510	.000	-37.939000	2.473662	-45.202042	-30.675958

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของร้อยละน้ำตาลที่เหลือในระดับฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตรด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Independent Sample T-test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

T-Test

Group Statistics

	trt	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
sugar	Flask	3	46.04100	3.097128	1.788128
	Fermentation	3	19.52500	.620010	.357963

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
sugar	Equal variances assumed	7.769	.049	14.540	4	.000	26.516000	1.823606	21.452858	31.579142
	Equal variances not assumed			14.540	2.160	.003	26.516000	1.823606	19.201266	33.830734

ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่าผลได้ในระดับฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตรด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Independent Sample T-test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

T-Test

Group Statistics

	trt	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
yield	Flask	3	1.90100	.123077	.071059
	Fermentation	3	9.62000	.479595	.276894

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
yield	Equal variances assumed	2.151	.216	-27.002	4	.000	-7.719000	.285867	-8.512693	-6.925307
	Equal variances not assumed			-27.002	2.262	.001	-7.719000	.285867	-8.821943	-6.616057

ตารางที่ 25 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของอัตราการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตรด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Independent Sample T-test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

T-Test

Group Statistics

	trt	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
product	Flask	3	.43000	.028931	.016703
	Fermentation	3	.70300	.015524	.008963

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
product	Equal variances assumed	2.125	.219	-14.402	4	.000	-.273000	.018956	-.325631	-.220369
	Equal variances not assumed			-14.402	3.064	.001	-.273000	.018956	-.332625	-.213375

ตารางที่ 26 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระดับฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตรด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Independent Sample T-test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

T-Test

Group Statistics

trt		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
colony	Flask	3	2.6400E8	6.87895E7	3.97157E7
	Fermentation	3	2.1000E9	6.00000E7	3.46410E7

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
colony	Equal variances assumed	.230	.656	-34.838	4	.000	-1.83600E9	5.27004E7	-1.98232E9	-1.68968E9
	Equal variances not assumed			-34.838	3.928	.000	-1.83600E9	5.27004E7	-1.98339E9	-1.68861E9