สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนราคาถูกเพื่อผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Application of Inexpensive Carbon and Nitrogen Sources for Lactic Acid Production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

T117331

นางสาวปวีณา โต๊ะสำลี
นางสาวมณีวรรณ วศินอุดมพร
นางสาวรัตตินันท์ นิตยสุข

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
สำนักหอสมุดกลาง
เลขทะเบียน 117331
วัน เดือน ปี 20 ก.ค. 2554

b 1234008X
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

APPLICATION OF INEXPENSIVE CARBON AND NITROGEN SOURCES FOR LACTIC ACID PRODUCTION BY *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

MISSPAWEENA TOHSAMLEE

MISSMANEEWAN WASINUDOMPORN

MISSRATTINAN NITTAYASUK

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR F SCIENCE

IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนราคาถูกเพื่อผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Application of Inexpensive Carbon and Nitrogen Sources for Lactic Acid Production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

ชื่อนักศึกษา นางสาวปวีณา โต๊ะสำลี

นางสาวมณีวรรณ วศินอุดมพร

นางสาวรัตตินันท์ นิตยสุข

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ. อารี ฤทธิบูรณ์	
ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	
รศ. สุขใจ ชูจันทร์	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

ประธานสาขาวิชาชีววิทยา

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนราคาถูกเพื่อผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปวีณา โต๊ะสำลี
	นางสาวมณีวรรณ วศินอุดมพร
	นางสาวรัตตินันท์ นิตยสุข
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

การศึกษาการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ โดยใช้ยีสต์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046, *Saccharomyces cerevisae* (Baker's yeast) and *Saccharomyces cerevisae* TISIR 5059 พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Candida utilis* TISTR 5001 ในอาหารดัดแปลงมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดคือร้อยละ 47.79 การศึกษาการประยุกต์ใช้กากน้ำตาลและสารสกัดจากเซลล์ยีสต์เพื่อผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 โดยเจาะจงไปที่แหล่งคาร์บอนคือ กลูโคสและกากน้ำตาล และแหล่งไนโตรเจนคือ ยีสต์สกัดและสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ พบว่ากากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตรและยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตรคือแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ระยะเวลาที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 96 มีความเข้มข้นของกรดแลกติกเท่ากับ 45.72 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้และอัตราการผลิต เท่ากับ 1.79 กรัมต่อกรัม และ 0.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ การศึกษาศักยภาพของการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ 5 ลิตรเปรียบเทียบกับถังหมัก 5 ลิตร พบว่าการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตรมีความเข้มข้นของกรดแลกติกสูงที่สุดคือ 59.84 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้และอัตราการผลิต เท่ากับ 1.27 กรัมต่อกรัม และ 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ระยะเวลาที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : กรดแลกติก , เชื้อแลคโตบาซิลัส แรมโนซัส เอทีซีซี 10863

Title	Application of Inexpensive Carbon and Nitrogen Sources for Lactic Acid Production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863
Student	MissPaweena Tohsamlee
	MissManeewan Wasinudomporn
	MissRattinan Nittayasuk
Degree	Bachelor of science
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2553
Advisor	Assoc.Prof. Sukjai Choojun

ABSTRACT

Application 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* TISIR 5059, were used to determine the suitable strain and medium. The result showed that the suitable strain was *Candida utilis* TISTR 5001 in Modified medium with 47.79% of the protein content.Utilization of sugarcane molasses and yeast autolysate for lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 was studies 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 and 10 g/l of yeast extract is the most suitable nitrogen source. The lactic acid concentration was 45.72 g/l at 96 hr of fermentation time. Yield and production were 1.79 g/g and 0.48 g/l/hr respectively. The efficiency of lactic acid production in 5 liters flask and 5 liters fermentor were investigated subsequently. The result presented that the fermentation 5 liters fermentor showed higher yield of lactic acid. The lactic acid concentration, yield and productivity rate were 59.84 g/l, 1.27 g/g substrate and 0.62 g/l/hr respectively at 96 hr of fermentation time

Keywords : Lactic acid , *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากความช่วยเหลือ ความร่วมมือ ตลอดจนคำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ รศ. อารี ฤทธิบูรณ์ ประธานกรรมการและ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะแนวทางการปฏิบัติงาน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานทำให้โครงงานมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณพี่ๆเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษาความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ต่างๆรวมถึงพี่ปริญญาโท พี่โจ้ พี่แจ๊ค พี่นา รวมทั้งเพื่อนๆ ที่มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์

หากโครงงานพิเศษชิ้นนี้มีสิ่งใดที่ขาดตกบกพร่อง ทางคณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณความดีที่ปรากฏในโครงงานพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นคุณความดีของผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

นางสาวปวีณา โต๊ะสำลี

นางสาวมณีวรรณ วศินอุดมพร

นางสาวรัตตินันท์ นิตยสุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	
สารบัญ	III
สารบัญตาราง	IX
สารบัญรูป	XI
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**3**
2.1 ความสำคัญของกรดแลกติก	3
2.2 คุณสมบัติของกรดแลกติก	3
2.3 การประยุกต์ใช้กรดแลกติก	6
2.3.1 ในอุตสาหกรรมอาหารและส่วนที่เกี่ยวข้องกับอาหาร	6
2.3.2 ในอุตสาหกรรมที่ไม่ใช่อาหาร	6
2.3.3 ในอุตสาหกรรมการผลิตสารสังเคราะห์โพลิเมอร์	7
2.4 กระบวนการผลิตกรดแลกติก	8
2.4.1 กระบวนการผลิตทางเคมี	8
2.4.2 กระบวนการผลิตทางชีวภาพ	9
2.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก	10
2.5.1 เฮทเทอโรแลกติกเฟอร์เมนเทชัน	11
2.5.2 โฮโมแลกติกเฟอร์เมนเทชัน	11
2.6 เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus rhamnosus*	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก	14
2.7.1 แหล่งคาร์บอน	14
2.7.2 แหล่งไนโตรเจน	14
2.7.3 พีเอชของอาหาร	15
2.7.4 อุณหภูมิ	15
2.7.5 การให้อากาศ	15
2.8 สารสกัดจากยีสต์	15
2.8.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต	16
2.8.2 กระบวนการผลิตสารสกัดจากยีสต์	16
2.8.3 คุณภาพของสารสกัดจากยีสต์	17
2.8.4 การนำยีสต์สกัดไปใช้ประโยชน์	17
2.9 กากน้ำตาล (Molasse) ในประเทศไทย	18
2.9.1 ประเภทของกากน้ำตาล	18
2.9.2 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล	19
2.9.3 สารปนเปื้อนในกากน้ำตาล	19
2.9.4 วิธีปรับปรุงคุณภาพกากน้ำตาล	20
2.9.5 ประโยชน์ของกากน้ำตาล	20
2.10 High Performance Liquid Chromatography	20
2.10.1 ทฤษฎีและความรู้ทั่วไป	20
2.10.2 ทฤษฎีการปฏิบัติ	20
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	**23**
3.1 เครื่องมือ	23
3.2 สารเคมี	24
3.3 วัตถุดิบ	24
3.3.1 การเก็บวัตถุดิบ	24
3.3.2 การเตรียมวัตถุดิบ	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.4 เชื้อจุลินทรีย์	25
3.4.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	25
3.4.2 การเก็บรักษาเชื้อ	25
3.4.3 การตรียมกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059	25
3.4.4 การตรียมกล้าเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001	25
3.4.5 การตรียมกล้าเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046	26
3.4.6 การตรียมกล้าเชื้อ Baker's Yeast	26
3.4.7 การตรียมกล้าเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863	26
3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	26
3.5.1 อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (pre – culture)	26
3.5.2 อาหารสังเคราะห์ (Yeast Malt medium, YM)	26
3.5.3 อาหารดัดแปลง (Modified medium, MM)	27
3.5.4 อาหารเหลว MRS	27
3.5.5 อาหารสังเคราะห์ชุดควบคุม (Synthetic medium , SM)	27
3.5.6 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร	28
3.5.7 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร	28
3.5.8 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากยีสต์ 15 กรัมต่อลิตร	28
3.5.9 อาหารกากน้ำตาลที่มียีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร	28
3.5.10 อาหารกากน้ำตาลที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร	29
3.6 การศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ 4 สายพันธุ์ที่ผลิตปริมาณโปรตีนได้สูงสุดและเปรียบเทียบ	29
ระหว่างอาหารสังเคราะห์และอาหารดัดแปลงเพื่อนำมาใช้ผลิตสารสกัดจากยีสต์	29
3.6.1 การเลี้ยงเชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์ในอาหารสังเคราะห์	29
3.6.2 การเลี้ยงเชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์ในอาหารดัดแปลง	29
3.6.3 วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Kjeldhal	30
3.7 การผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์	30
3.7.1 การเลี้ยงเชื้อยีสต์	30
3.7.2 การทำออโตไลซีส	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.8 ศึกษาปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารชุดดัดแปลง 30

3.8.1 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร 30

3.8.2 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร 31

3.8.3 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากยีสต์ 15 กรัมต่อลิตร 31

3.9 ศึกษาการเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก 31

3.9.1 อาหารสังเคราะห์ 31

3.9.2 อาหารกากน้ำตาลที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน 31

3.9.3 อาหารกากน้ำตาลที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน 31

3.9.4 อาหารสูตรดัดแปลง 32

3.10 ศึกษาศักยภาพของการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตรเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 5 ลิตร 32

3.10.1 การผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร 32

3.10.2 การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร 32

3.11 การวิเคราะห์ผล 32

3.11.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ทั้งหมดโดยวิธี Total plate count 32

3.11.2 การวัดปริมาณกรดแลกติก 32

3.11.3 การวัดปริมาณน้ำตาล 33

3.11.4 การหาปริมาณผลได้และอัตราการผลิต 33

3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ 33

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง **34**

4.1 ผลการศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ 4 สายพันธุ์ที่ผลิตปริมาณโปรตีนได้สูงสุดและเปรียบเทียบระหว่างอาหารสังเคราะห์และอาหารดัดแปลงเพื่อนำมาใช้ผลิตสารสกัดจากยีสต์ 34

4.1.1 การศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ 4 สายพันธุ์ในอาหารสังเคราะห์ 34

4.1.2 การศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ 4 สายพันธุ์ในอาหารสูตรดัดแปลง 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.2 ผลของการศึกษาปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลง 40

4.2.1 การศึกษาปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมในอาหารที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร 41

4.2.2 การศึกษาปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมในอาหารที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร 41

4.2.3 การศึกษาปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมในอาหารที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 15 กรัมต่อลิตร 41

4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก 44

4.3.1 อาหารสังเคราะห์ 44

4.3.2 อาหารสูตรดัดแปลง MM 1 44

4.3.3 อาหารสูตรดัดแปลง MM 4 45

4.3.4 อาหารสูตรดัดแปลง MM 5 45

4.4 ผลการศึกษาศักยภาพของการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 5 ลิตร 48

4.4.1 การผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร 48

4.4.2 การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร 49

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ **53**

5.1 สรุปผลการทดลอง 53

5.2 ข้อเสนอแนะ 54

เอกสารอ้างอิง **55**

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 59

ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ 61

ภาคผนวก ค ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.2	คุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพของกรดแลกติก	5
4.1.1	แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและร้อยละการใช้น้ำตาลในอาหาร YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001	36
4.1.2	แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและร้อยละการใช้น้ำตาลในอาหาร FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001	36
4.1.3	แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและร้อยละการใช้น้ำตาลในอาหาร YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมงของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046	37
4.1.4	แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและร้อยละการใช้น้ำตาลในอาหาร FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมงของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046	37
4.1.5	แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและร้อยละการใช้น้ำตาลในอาหาร YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมงของเชื้อ Baker's Yeast	38
4.1.6	แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และร้อยละการใช้น้ำตาลในอาหาร FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมงของเชื้อ Baker's Yeast	38
4.1.7	แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และร้อยละการใช้น้ำตาลในอาหาร YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมงของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059	39
4.1.8	แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และร้อยละการใช้น้ำตาล ในอาหาร FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมงของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059	39
4.1.9	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนจากสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 4 สายพันธุ์ ในอาหาร YM และอาหาร FM	40
4.2.1	แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลงทั้ง 3 สูตร	42
4.2.2	แสดงการเปรียบเทียบผลได้และอัตราการผลิต ในอาหารสูตรดัดแปลงทั้ง 3 สูตร	42
4.3.1	แสดงค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลงทั้ง 3 สูตร	46
4.3.2	แสดงการเปรียบเทียบผลได้และอัตราการผลิต ในอาหารสูตรดัดแปลงทั้ง 3 สูตร	47
4.4.1	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดแลกติก ผลได้ อัตราการผลิตและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในฟลาสก์และถังหมักขนาด 5 ลิตร	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.2.1	โครงสร้างโมเลกุลของกรดแลกติกแบบ 3 มิติ	4
2.2.2	โครงสร้างโมเลกุลของกรดแลกติก	4
2.2.3	ไอโซเมอร์ของกรดแลกติก คือ L(+) lactic acid และ D(-) lactic acid	5
2.5.1	กลไกการเกิดกรดแลกติกแอซิดกลุ่มเฮทเทอโรเฟอเมนเททีพ	11
2.5.2	กลไกการเกิดกรดแลกติกแอซิดกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ	12
4.2.1	แสดงความเข้มข้นกรดแลกติกที่เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ที่ผลิตได้ในอาหารดัดแปลงที่มีปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์แตกต่างกัน คือ 5, 10,15 กรัมต่อลิตร	43
4.2.2	แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการใช้ของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารดัดแปลงที่มีปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์แตกต่างกัน คือ 5, 10,15 กรัมต่อลิตร	43
4.3.1	แสดงความเข้มข้นกรดแลกติกที่เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ผลิตได้ในอาหารทั้ง 4 สูตร	47
4.3.2	แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการใช้ของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารทั้ง 4 สูตร	48
4.4.1	แสดงความเข้มข้นกรดแลกติกที่เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ผลิตได้ในฟลาสก์และถังหมัก	51
4..4.2	แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการใช้ของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในฟลาสก์และถังหมัก	51
4.4.3	แสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในฟลาสก์และถังหมัก	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เภสัชกรรม อุตสาหกรรมฟอกหนังและอุตสาหกรรมสิ่งทอ นอกจากจะนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารแล้วยังมีการนำกรดแลกติกมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติหรือที่เรียกว่า " Biodegradable plastic " (Rojan และคณะ.2008) ซึ่งจะช่วยลดมลพิษในสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้กรดแลกติกจึงเป็นที่ต้องการมากขึ้นเพื่อที่จะใช้ในการผลิตและพัฒนาพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ โดยปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ในปัจจุบันพบว่า มาจากกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ร้อยละ 100 (Jacques และคณะ.1999) ซึ่งกรดแลกติกที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆได้อย่างกว้างขวาง

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติซึ่งสามารถผลิตได้ทั้งจากการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการหมักทางชีวภาพ การสังเคราะห์ทางเคมีของกรดแลกติกนั้นโดยส่วนใหญ่แล้วจะเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแลกโทไนไทร์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่น เช่น การสลายน้ำตาลโดยใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของโพรพิลีนไกลคอล การเกิดปฏิกิริยาของอะซีทัลดีไฮด์ การเกิดปฏิกิริยาของแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์และน้ำที่ระดับอุณหภูมิและความดันสูง การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของกรดคลอโรโพรพิโอนิก และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดไนตริกในโพรพิลีน ซึ่งในกระบวนการการผลิตนั้นวิธีที่กล่าวมาข้างต้นนี้มีค่าใช้จ่ายสูงทำให้ไม่คุ้มค่ากับปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ และการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นจะทำให้ได้กรดแลกติกในรูปผสมคือทั้งแบบแอล และแบบดี (Datta และคณะ.1995) ซึ่งกระบวนการผลิตกรดแลกติกทางกระบวนการชีวภาพด้วยการหมักโดยใช้จุลินทรีย์เป็นตัวผลิตจะสามารถเลือกผลิตกรดแลกติกแบบแอลหรือแบบดี ก็ได้ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้เราได้มีการศึกษาการใช้วัตถุดิบต้นทุนต่ำ โดยเลือกใช้วัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมน้ำตาลคือกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ซึ่งผลิตขึ้นเองเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดแลกติก เพื่อลดต้นทุนการผลิตกรดแลกติกและใช้แทนอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีราคาแพง สิ่งเหล่านี้ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตทางชีวภาพสามารถแข่งขันทางด้านราคากับการผลิตทางด้านเคมีได้ และที่ได้เปรียบการผลิตทางเคมีที่สุดคือการผลิตทางชีวภาพผลผลิตที่ได้จะมีความปลอดภัยสูงหรือที่เรียกว่า" Green Product " แต่อาจจะมีผลผลิตข้างเคียงบ้างเล็กน้อยที่เรียกว่า" By Product " นอกจากนี้การใช้วัสดุเหลือใช้ยังมีส่วนช่วยลดปริมาณขยะอินทรีย์ที่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อผลิตกรดแลกติกโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากเซลล์ยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูก โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในการผลิตกรดแลกติก

1.2.2 เพื่อศึกษาสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนสูงเพื่อใช้เป็นสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

1.2.3 เพื่อศึกษาปริมาณของสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสม เพื่อผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

1.2.4 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตรกับถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาสายพันธุ์ของเซลล์ยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนสูงและปริมาณของสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากเซลล์ยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูก และเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์กับถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาลและสารสกัดจากเซลล์ยีสต์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนราคาถูก

1.4.2 ทำให้ทราบถึงศักยภาพของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 เพื่อผลิตกรดแลกติก

1.4.3 สามารถประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อผลิตในเชิงพาณิชย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของกรดแลกติก

กรดแลกติก เป็นสารอินทรีย์ที่พบมากในธรรมชาติ และมีการใช้ในอาหาร จะต่างกับกรดอื่นๆคือ มีลักษณะหนืด และเป็นของเหลวที่ไม่มีกลิ่น สำหรับ food-grade D, L- lactic acid ที่ขายทั่วไปจะเป็นสารละลายที่ไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะตัวและมีความเข้มข้นร้อยละ 50 และร้อยละ 80

กรดแลกติกละลายได้ดีในน้ำ ใช้มากในอุตสาหกรรมทำไวน์ เบียร์ น้ำผลไม้ต่างๆ ทั้งชนิดที่อัดคาร์บอนไดออกไซด์ และไม่อัดคาร์บอนไดออกไซด์ แยม เยลลี่ น้ำสลัดต่างๆใช้สารละลาย pepper oleoresin นอกจากนี้ยังใช้ในพวกผักดอง pickles และ relishes ใช้ช่วยในการปรับความเป็นกรดด่างและเพิ่มกลิ่นรส

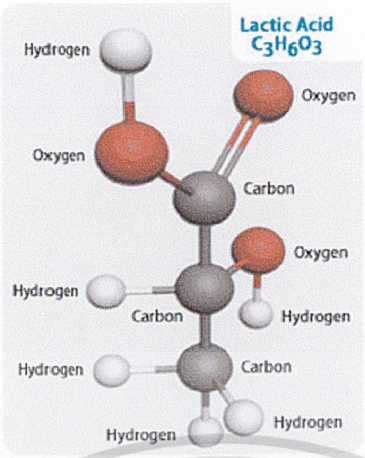
กรดแลกติกเตรียมได้จากการหมัก highly refined sucrose แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการเปลี่ยนเป็นผลึกของแคลเซียมแลกเตต จากนั้น decompose โดยกรดซัลฟิวริกเพื่อให้ได้กรดบริสุทธิ์ สำหรับวิธีอื่นๆนั้น อาจทำโดยการหมักแป้งมันฝรั่ง กากน้ำตาลหรือข้าวโพด โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* หรือ *Lactobacillus bulgaricus* จากนั้นใช้วิธีทำให้บริสุทธิ์แบบเดียวกัน หรือจะใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายได้ หรืออาจเตรียมกรดแลกติกโดยการ hydrolyze lactonitrile

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ช่วยเพิ่มรสชาติและช่วยป้องกันการเสื่อมในอาหารหมักดอง และในผลิตภัณฑ์นม โดยทั่วไปสามารถพบกรดแลกติกในร่างกายคน สัตว์ พืชและจุลินทรีย์ได้ตามธรรมชาติ กรดแลกติกถูกตรวจพบเป็นครั้งแรกในนมเปรี้ยว โดยนักเคมีชาวสวีเดนจึงทำให้ทราบว่ากรดแลกติกเป็นผลที่เกิดขึ้นจากการหมักจุลินทรีย์ จากการสำรวจการผลิตกรดแลกติกทั่วโลกอยู่ที่ประมาณ 50,000 ตันต่อปี โดยสองในสามส่วนที่ผลิตได้มาจากกระบวนการหมักส่วนที่เหลือมาจากกระบวนการทางเคมี กรดแลกติกที่ผลิตได้ร้อยละ 85 มักนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยกรดแลกติกทำหน้าที่เป็นตัวปรับสภาพความเป็นกรดในอาหารเพื่อให้เกิดรสชาติของความเปรี้ยวที่พึงประสงค์ของอาหารและเครื่องดื่ม ตลอดจนการใช้ในอาหารแปรรูปและผลิตภัณฑ์นม กรดแลกติกยังสามารถใช้เป็นสารกันบูดเพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์อาหารได้

2.2 คุณสมบัติของกรดแลกติก

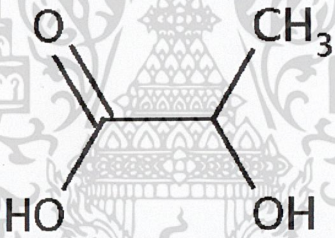
กรดแลกติก (2-hydroxypropionic acid หรือ 2-hydroxypropanoic acid) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ CH3-CHOHCOOH (J.S.-Yun และคณะ.2009) จัดเป็นสารอินทรีย์ที่พบได้ทั่วไป มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1และรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2.1 โครงสร้างโมเลกุลของกรดแลกติกแบบ 3 มิติ

ที่มา : http://www2.siit.tu.ac.th/pakorn/articles/A277p2x2.jpg (10/6/2553)



รูปที่ 2.2.2 โครงสร้างโมเลกุลของกรดแลกติก

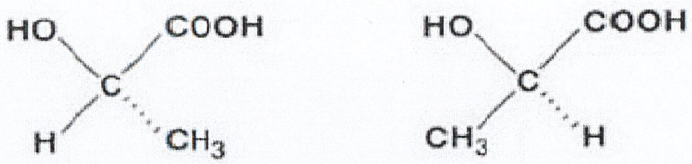
ที่มา : http://i.ddimg.com/img/mol/DB04398.mol.jpg (10/6/2553)

กรดแลกติกมี 2 รูปแบบ (isomeric form) ได้แก่

1. รูป D (-) lactic acid หรือ Levorotatory lactic acid ไม่พบในกระบวนการทางชีวเคมีของมนุษย์ แต่พบในกระบวนการชีวเคมีของจุลินทรีย์ (Benning,1990) ดังรูปที่2.1.3

2. รูป L (+) lactic acid หรือ Dextrorotatory เป็นรูปที่มีอยู่ในกระบวนการชีวเคมีของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งมนุษย์ด้วย เป็นรูปที่พบได้ทั่วไป และมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างสูง (Nagodawithana,1998) ดังรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



L (+) Lactic acid D (-) Lactic acid

รูปที่ 2.2.3 ไอโซเมอร์ของกรดแลกติก คือ L(+) lactic acid และ D(-) lactic acid

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพของกรดแลกติก

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ	กรดแลกติก
สถานะ	ของเหลว ผลึกของแข็ง
สี	ใส หรือเหลืองอ่อน
กลิ่น	ฉุน
น้ำหนักโมเลกุล	90.08
ค่าคงที่ของการแตกตัว (Ka ที่อุณหภูมิ 25องศาเซลเซียส)	1.37×10^{-4}
จุดหลอมเหลว	16.8 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	82 องศาเซลเซียส ที่ 0.5 มิลลิเมตรปรอท 122 องศาเซลเซียส ที่ 14 มิลลิเมตรปรอท
ค่าความร้อนของการเผาไหม้	1361 KJ/mole
ค่าความร้อนจำเพาะ	190J/mole/C
ความถ่วงจำเพาะ(น้ำ=1)	1.2
ความคงตัว	มีความเสถียรภายใต้สภาวะปกติ
สภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง	ความร้อน สารที่เข้ากันไม่ได้
วัตถุที่ควรหลีกเลี่ยง	กรดไฮโดรฟลูออริก หรือกรดกัดแก้ว กรดไนตริก สารออกซิไดซ์ ไอโอไดด์
สารเคมีอันตรายที่เกิดจากการสลายตัว	คาร์บอนไดออกไซด์ และคาร์บอนมอนอกไซด์ จะเกิดขึ้นเมื่อสลายตัวด้วยความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา : Niju และคณะ2004

2.3 การประยุกต์ใช้กรดแลกติก (Lactic acid application)

2.3.1 ในอุตสาหกรรมอาหารและส่วนที่เกี่ยวข้องกับอาหาร (food and food – related industries)

ประมาณร้อยละ 85 ของกรดแลกติกที่ผลิตได้ทั้งหมดถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารเพิ่มความเป็นกรดในอาหาร (acidulant) เป็นสารที่ช่วยทำให้เกิดความสมดุลของกรดด่างในอาหาร (buffer) ช่วยในการถนอมอาหาร ใช้เป็นสารช่วยจับสารชนิดอื่น (chelating agent) เป็นสารเพิ่มกลิ่นและรสชาติ (flavor enhancer) และช่วยให้เนื้อสัมผัสของอาหารมีสภาพดีขึ้น ที่พบโดยทั่วไปคือ อาหารหมักดอง ขนมหวาน ขนมปัง เครื่องดื่มทั่วไป เครื่องดื่มหรืออาหารที่แปลงจากนม (diary products) เบียร์ ไวน์ เป็นต้น กรดแลกติกมีส่วนช่วยให้ผิวพรรณขาวขึ้น และฟื้นฟูสภาพผิวหนังให้กลับสู่สภาพเดิม ซึ่งกรดแลกติกที่นำมาใช้เป็นกรดแลกติกในรูป L(+) form ซึ่งเป็นกรดแลกติกที่ร่างกายใช้ได้ และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย เมื่อไม่นานมานี้ พบว่ากรดแลกติกยังถูกนำมาใช้ในการขนส่งผลิตภัณฑ์อาหารจำพวก เป็ด ไก่ ปลาอีกด้วย

2.3.2 ในอุตสาหกรรมที่ไม่ใช่อาหาร

กรดแลกติกถูกนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความเป็นกรดในอุตสาหกรรมฟอกหนัง (Ruter ,1975) อย่างไรก็ตาม ในอุตสาหกรรมประเภทนี้มักใช้กรดอินทรีย์ เพราะมีราคาถูกกว่า ดังนั้นถ้าหากว่ามีการพัฒนากรดแลกติกให้ได้ปริมาณสูงขึ้นและราคาถูกลง น่าจะเป็นการประยุกต์ใช้ในอีกรูปแบบหนึ่ง เป็นการเปิดตลาดของกรดแลกติกให้กว้างขึ้น นอกจากนี้แล้วกรดแลกติกยังถูกนำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรมการผลิตเซลโลเฟน ซึ่งต้องการกรดแลกติกที่มีรูปแบบ (isomer form) ที่แน่นอน (Data และคณะ 1995;Purac 1989; Van Ness 1985) กรดแลกติกแบบ L (+) from ร่างกายมนุษย์สามารถใช้ได้ไม่เกิดอันตราย ใช้เป็นสารต้านทานการผุของฟัน และใช้ในการรักษาการขาดแคลเซียม เป็นต้น (Hallan และคณะ1986; Dunn และคณะ 1988) ส่วนกรดแลกติกในรูป D (+) from ได้มีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์เช่นกัน โดยใช้เป็นตัวบ่งชี้ฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Smith.1991) ซึ่งสามารถแบ่งการผลิตเป็นด้านต่างๆดังนี้

-ด้านเวชภัณฑ์สำอาง

กรดแลกติกเป็นสารในกลุ่ม AHA หรือ Alpha Hydroxy Acid เป็นกรดอินทรีย์ที่พบได้ในธรรมชาติ และสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์สำอาง ประโยชน์ของ AHA สำหรับกลุ่มเวชภัณฑ์สำอาง ในปริมาณร้อยละ 3-15 คือ

1. ทำให้ผิวหน้าเรียบเนียน
2. ทำให้ผิวหน้าดูมีน้ำมีนวล
3. ทำให้รูขุมขนไม่เกิดการอุดตัน
4. ช่วยลดการเกิดความมันส่วนเกินและช่วยให้ปัญหาสิวดีขึ้น

ส่วนการใช้AHA ทางด้านการแพทย์นั้น มีประโยชน์ในการรักษาโรคต่างๆ ดังนี้

1. ช่วยทำให้สิวและตุ่มขนอักเสบมีจำนวนน้อยลง
2. ทำให้ฝ้าจางลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ช่วยเรื่องรอยย่นบนใบหน้า

4. ช่วยรักษาผื่นจากแสงแดด เช่น ผื่นดำจากแสง solar lentigenes , ภาวะเสื่อมสภาพจากแสง acitinic degeneration

ข้อดีของการใช้ AHA ในการผลัดเซลล์ผิว คือ ไม่พบว่ามีพิษต่อร่างกาย การลอกนั้นตื้น ดังนั้นจึงมีผลข้างเคียงเล็กน้อย และผู้ป่วยสามารถทนได้ดีต่อสารที่ใช้

ข้อเสียของการใช้ AHA ในการผลัดเซลล์ผิว และเวชภัณฑ์สำอางที่มี AHA คือผิวหนังจะมีความไวต่อแสงอุลตราไวโอเลตเพิ่มขึ้น กล่าวคือ อาจมีการไหม้ของผิวได้ง่ายขึ้นเมื่อตากแดด หรือรู้สึกแสบผิวมากขึ้น และถ้าหากต้องโดนแดดมากเป็นประจำ อาจมีความเสี่ยงต่อมะเร็งผิวหนังเพิ่มมากขึ้น

- ด้านการแพทย์

นักวิจัยจากมหาวิทยาลัยเร ฮวน คาร์ลอส (Universidad rey Juan Carlos) พัฒนาวัสดุชีวภาพโพลิเมอร์ที่สามารถประยุกต์ใช้ได้กับการผ่าตัด และเป็นวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ วัสดุชีวภาพโพลิเมอร์ที่ได้มาจากกรดแลกติกนี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์อย่างมากมาย โดยเฉพาะวัสดุเย็บแผลที่ย่อยสลายได้ นอกจากนี้ยังถูกใช้อย่างกว้างขวางในโครงสร้างของเนื้อเยื่อหัวใจ และใช้เป็นอุปกรณ์สำหรับซ่อมแซมกระดูกชิ้นเล็กๆ เช่น กระดูกที่มือ ข้อต่อ และเท้า เป็นต้น วัสดุนี้จะย่อยสลายอย่างช้าๆ และกลายเป็นส่วนหนึ่งของร่างกายในที่สุด มวลของมันจะถูกถ่ายไปยังกระดูกที่หักอย่างต่อเนื่อง ช่วยในกระบวนการรักษาและลดภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้น

2.3.3 ในอุตสาหกรรมการผลิตสารสังเคราะห์โพลิเมอร์ (lactic acid polymer)

กรดแลกติกถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตโพลิเมอร์เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1932 โดยบริษัท Carothers แต่มีคุณภาพไม่ดี (Holten,1971) โครงการจึงถูกชะงักไว้จนกระทั่งในปี ค.ศ.1954 บริษัท Dupont ได้จดทะเบียนสิทธิบัตรของสารโพลิเมอร์ของกรดแลกติกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่อย่างไรก็ตามสารโพลิเมอร์นี้ถูกทำลายได้ง่ายด้วยน้ำ การผลิตจึงถูกระงับลงอีก (Lower,1954) จนกระทั่ง ค.ศ. 1972 บริษัท Ethicon ได้ผลิตสารโพลิเมอร์ระหว่างกรดแลกติก และกรดไกลโคลิก พบว่าได้ผลดี ปัจจุบันนี้ได้ถูกนำมาใช้เป็นเส้นใยในการเย็บแผล การผลิตสารโพลิเมอร์จากกรดแลกติกเท่านั้น ต้องการสารตั้งต้นที่มีความบริสุทธิ์สูงและสามารถทนความร้อนสูงได้ด้วย ปกติแล้วที่ใช้มากคือกรดแลกติกที่อยู่ในรูป L-form นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของกรดแลกติกรูป L-from และรูป D-form นั้นต้องมีสัดส่วนที่แน่นอน ไม่เช่นนั้นแล้วจะทำให้สารโพลิเมอร์ที่ได้มีคุณสมบัติไม่ดี สารโพลิเมอร์ของกรดแลกติกได้ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง กล่าวคือ นำมาใช้ในการเป็นตัวควบคุมการหลั่งของยาในตัวผู้ป่วย (controlled drug release) โดยยาจะถูกฝังอยู่ในแคปซูลขนาดเล็กที่ทำจากสารโพลิเมอร์ของกรดแลกติก ยาจะค่อยๆหลั่งออกมา ซึ่งทำให้ยาอยู่ในตัวผู้ป่วยนานขึ้น สามารถที่จะออกฤทธิ์ได้ดีและยังช่วยลดอาการข้างเคียงของการใช้ยาอีกด้วย (Mason และคณะ1976) ในด้านการเกษตร สารโพลิเมอร์ของกรดแลกติกจะถูกนำมาใช้ในการควบคุมการหลั่งของปุ๋ยและยาฆ่าแมลง นอกจากนี้ยังพบสารโพลิเมอร์ของกรดแลกติกในเครื่องอุปโภคจำพวกภาชนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และกระดาษ สารโพลิเมอร์ของกรดแลกติกนี้สามารถที่จะถูกย่อยสลายในทางชีวภาพ และสามารถที่จะทนต่อความร้อนสูงได้ด้วย จึงเป็นการช่วยให้สภาพแวดล้อมของโลกไม่เกิดการเสียหาย

2.4 กระบวนการผลิตกรดแลกติก (Synthesis of lactic acid)

2.4.1 กระบวนการผลิตทางเคมี (Chemical synthesis)

การสังเคราะห์กรดแลกติกโดยวิธีการทางเคมีที่นิยมใช้โดยทั่วไป สารตั้งต้นที่ใช้คือ ไฮโดรเจนไซยาไนด์และอะซิทัลดีไฮด์ โดยสารทั้งสองชนิดจะทำปฏิกิริยากันที่ความดันบรรยากาศ เกิดเป็นสารประกอบแลกโตไนไตรท์ ซึ่งจะถูกนำมากลั่นและทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริก หรือกรดเกลือ ได้ผลลัพธ์เป็นกรดแลกติกและมีเกลือแอมโมเนียมเป็นผลพลอยได้ กรดแลกติกที่ได้ในขั้นตอนนี้มีลักษณะหยาบจึงถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยการนำมาทำปฏิกิริยากับเมทานอลได้เป็นเมทธิลแลกเตต ซึ่งจะถูกนำกลับมาใช้อีก กรดแลกติกที่สังเคราะห์ได้นี้จะอยู่ในรูปทั้ง D และ L ซึ่งสัดส่วนการผลิตที่ได้ไม่สามารถบอกได้จึงทำให้วิธีการนี้ไม่เป็นที่นิยม ในปัจจุบันการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการทางเคมีแบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนที่ 1 นำไฮโดรเจนไซยาไนด์ทำปฏิกิริยากับอะซิทัลดีไฮด์ได้แลคโตไนไตรท์ทำปฏิกิริยาที่ความดันบรรยากาศ ดังสมการที่ 1

$$\underset{\text{อะซิทัลดีไฮด์}}{CH_3CHO} + \underset{\text{ไฮโดรเจนไซยาไนด์}}{HCN} \longrightarrow \underset{\text{แลกโตไนไตรท์}}{CH_3CHOHCN} \qquad (1)$$

ขั้นตอนที่ 2 นำแลกโตไนไตรท์มาย่อยด้วยไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟูริก ได้กรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียมเป็นของเหลือทิ้ง ดังสมการที่ 2

$$\underset{\text{แลกโตไนไตรท์}}{CH_3CHOHCN} + H_2O + \tfrac{1}{2}\underset{\text{กรดซัลฟูริก}}{H_2SO_4} \longrightarrow \underset{\text{กรดแลกติก}}{CH_3CHOHCOOH} + \tfrac{1}{2}\underset{\text{เกลือแอมโมเนียม}}{(NH_4)_2SO_4} \qquad (2)$$

ขั้นตอนที่ 3 นำกรดแลกติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำเป็นอนุพันธ์ของเอสเทอร์ คือเมทธิลแลกเตต แล้วนำเมทธิลแลกเตตมากลั่นและย่อยได้กรดแลกติก ส่วนเมทานอล ไฮโดรเจนไซยาไนด์ และสารปนเปื้อนอื่นๆ จะถูกกำจัดออกโดยนำมาผ่านถ่านกัมมันต์ และทำการแลกเปลี่ยนไอออน ดังสมการ 3 และ 4

$$\underset{\text{กรดแลกติก}}{CH_3CHOHCOOH} + \underset{\text{เมทธานอล}}{CH_3OH} \longrightarrow \underset{\text{เมทธิลแลกเตต}}{CH_3CHOCOOCH_3} + H_2O \qquad (3)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$CH_3CHOCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$ (4)

เมทธิลแลกเตต กรดแลกติก เมทธานอล

2.4.2 กระบวนการผลิตทางชีวภาพ (biosynthesis)

การผลิตกรดแลกติกโดยวิธีนี้ต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้นั้นถูกจัดเข้ากลุ่มกัน เรียกว่า แลกติกแอซิคแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria, LAB) แลกติกแอซิคแบคทีเรียที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* ซึ่งอยู่ใน Family *Lactobacteriaceae* แลกติกแอซิคแบคทีเรียมีจำนวนมากมาย มีลักษณะเป็นแท่งหรือกลม และสามารถผลิตกรดแลกติกเป็นสารสุดท้ายเกือบเพียงอย่างเดียวจากแหล่งคาร์บอนในกระบวนการทางชีวเคมี ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Carnobacterium, Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Vagococcus, Aerococcus, Alloiococcus, Tetragenococcus, Atopobium* (Schleifer และ Ludeing.1995) ซึ่งสามารถสร้างกรดแลกติกในทั้งรูป D และ L หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง นอกจากแลกติกแอซิคแบคทีเรียกลุ่มข้างต้นแล้ว ยังพบว่าแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* บางชนิดสามารถที่จะผลิตกรดแลกติกได้ และกำลังมีการศึกษาถึงศักยภาพของแบคทีเรียชนิดนี้ในการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมด้วย (Danner และคณะ1998 ; Severson 1998; Frize และClaus 1992)

ในการหมักระดับอุตสาหกรรมนั้นเป็นการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (batch fermentation) ซึ่งเริ่มใช้กันมาตั้งแต่ราวปี ค.ศ.1890 โดยปกติแล้วความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีอยู่ถังหมักอยู่ในระหว่างร้อยละ 5-12 (โดยน้ำหนัก) และใช้การถ่ายเชื้อที่ร้อยละ 5-10 (โดยปริมาตร) อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 36-48 องศาเซลเซียส พีเอชของการหมักถูกควบคุมโดยการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ หรือ แคลเซียมคาร์บอเนต ให้มีพีเอชคงตัวอยู่ที่ 5.4-6.4 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธ์จุลินทรีย์ที่นำมาหมัก กระบวนการหมักดำเนินไปราว 5-10 วัน การหมักแบบนี้ในทางอุตสาหกรรมได้ผลผลิตประมาณร้อยละ 93-95 อย่างไรก็ตามการหมักแบบไม่ต่อเนื่องนี้มีข้อเสียคือ เกิดความไม่แน่นอนระหว่างการหมักแต่ละครั้ง ทำให้ไม่สามารถทำนายผลผลิตได้ เกิดของเสียจากการหมักมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งมวลชีพและยิปซัม ผลก็คือทำให้ผลผลิตต่ำ (low productivity) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ราคาต้นทุนการผลิตกรดแลก-ติกแพง (Tejayadi และ Cheryan 1995) สำหรับกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องนั้น ได้มีผู้พยายามศึกษาค้นคว้าเป็นเวลานาน แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จในการเข้าสู่ระบบอุตสาหกรรม เนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์ของแลกติกแอซิคแบคทีเรีย และเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

การผลิตกรดแลกติกทางชีวภาพ โดยทำการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรตด้วยเชื้อที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ ดังสมการ

-กระบวนการหมักและทำให้เป็นกลางในรูปเกลือ

$C_6H_{12}O_6 + Ca(OH)_2 \longrightarrow (2CH_3CHOHCOO\text{-})Ca^{2+} + 2H_2O$

คาร์โบไฮเดรต แคลเซียมไอดรอกไซด์ แคลเซียมแลกเตต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-ย่อยด้วยกรดซัลฟูริก

$$2(CH_3CHOHCOO\text{-})Ca^{2+} + H_2SO_4 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH + CaSO_4$$

แคลเซียมแลกเตต กรดแลกติก แคลเซียซัลเฟต

-ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน

$$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOCOOCH_3 + H_2O$$

กรดแลกติก เมทธานอล เมทธิลแลกเตต

-ย่อยด้วยน้ำ

$$CH_3CHOCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$$

เมทธิลแลกเตต กรดแลกติก เมทธานอล

แคลเซียมแลคเตตจะถูกขับออกจากเซลล์ และการใส่กรดซัลฟูริกจะทำให้ได้กรดแลกติกและแคลเซียมซัลเฟต และทำการแยกแคลเซียมซัลเฟตออกโดยการกรอง กรดแลกติกจะได้จากการย่อย ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน และการกลั่น

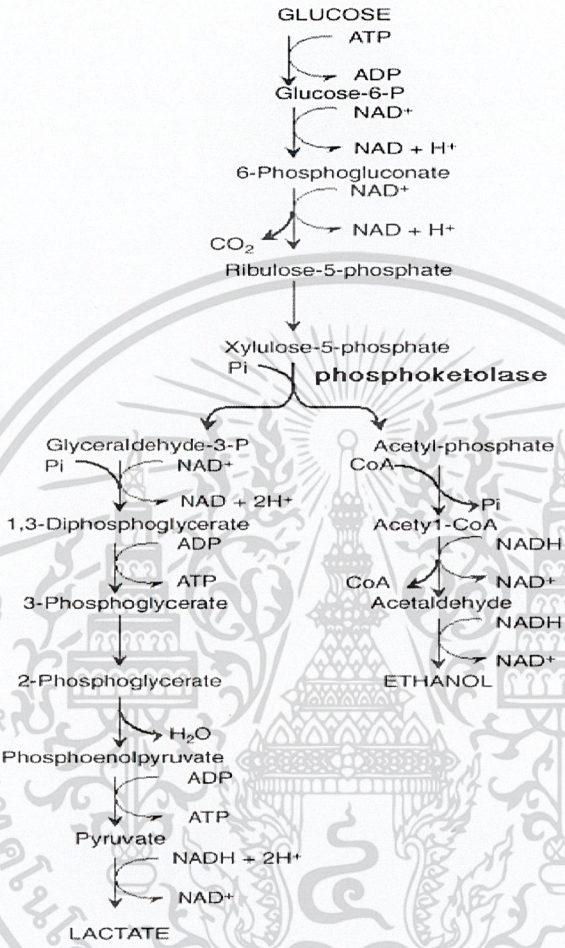
2.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก

แลกติกแอซิดแบคทีเรีย จัดอยู่ในเฟมิลี *Lactobacilliceae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ ทนกรด มีทั้งลักษณะรูปร่างท่อน และรูปร่างกลม (Salminen,1998) ในการเจริญใช้พลังงานจากกระบวนการหมัก น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส มีความต้องการอาหารที่สมบูรณ์ น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส มีความต้องการอาหารที่สมบูรณ์ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียแลกติก คือความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ซึ่งทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น เนยแข็ง ผักดอง แบคทีเรียแลกติกมีบทบาทในการหมักอาหาร และเครื่องดื่มหลายชนิดด้วยกันเช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผักและผลไม้ดอง ไส้กรอก เบียร์ ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ แบคทีเรียแลกติกต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังต้องการวิตามิน และเกลือแร่อีกหลายชนิดในการเจริญซึ่งความต้องการสารอาหารต่างๆ เหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ ชนิดของการหมักน้ำตาลกลูโคสแบ่งได้ 2 ชนิด ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 เฮทเทอโรแลกติกเฟอร์เมนเทชัน (Heterolactic fermentation)

เป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลกติก เอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และกรดอะซิติก โดยกระบวนการหมักได้จากกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ



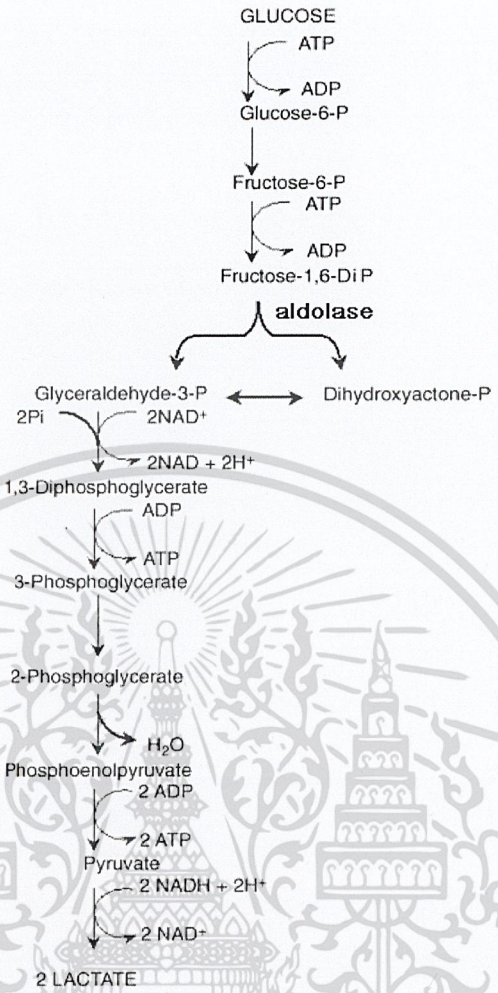
รูปที่ 2.5.1 กลไกการเกิดกรดแลกติกแอซิดกลุ่มเฮทเทอโรเฟอเมนเททีพ

ที่มา: http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.htm (15/10/53)

2.5.2 โฮโมแลกติกเฟอร์เมนเทชัน (Homolactic fermentation)

เป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ โดยกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ โดยกลไกการเกิดกรดแลกติก คือการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูวิกแอซิด (pyruvic acid) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสด้วยวิธีไกลโคไลซิสแล้วเปลี่ยนไพรูวิกแอซิดเป็นกรดแลกติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5.2 กลไกการเกิดกรดแลกติกแอซิดกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ

ที่มา : http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.html (15/10/53)

2.6 เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus rhamnosus* (ที่มา: Narayanan และคณะ, 2004)

เชื้อ *L. rhamnosus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มแลกติกแอซิดแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคน และสัตว์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ แยกได้จากทางเดินอาหาร ในลำไส้เล็ก และในลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังพบบริเวณช่องคลอด มีลักษณะคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นแท่งสั้นๆ เป็นพวกแฟคัลเตตีฟแอนแอโรบ เจริญได้ในสภาวะกรด สามารถเจริญได้ที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30-40 องศาเซลเซียส

เชื้อ *L. rhamnosus* เป็นกลุ่มเฮทเทอโรเฟอเมนเททีฟที่ผลิตแอล (+) แลกติก และเอทธานอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศน้อย และกรดแลกติกที่ได้จะอยู่ในรูปเกลือของกรดแลกติก เช่น แคลเซียมแลกเตท โซเดียมแลกเตท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดแลกติกที่จุลินทรีย์ผลิตได้ยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ สำหรับการปรับปรุงรสชาติ ผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อและผลไม้ต่างๆ นอกจากนี้จุลินทรีย์ในกลุ่มแลกติกแอซิคแบคทีเรียที่มีชีวิต สามารถนำไปใช้เป็นสารเสริมชีวนะ (Probiotics) เป็นส่วนผสมอาหารของมนุษย์และสัตว์คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เติมลงไปในอาหารจะก่อให้เกิดประโยชน์แก่สุขภาพของมนุษย์และสัตว์ที่บริโภคอาหาร ทั้งยังเพิ่มคุณค่าอาหาร โดยจุลินทรีย์บางประเภทสามารถสร้างวิตามินบีได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังช่วยสลายสารอาหารโดยใช้เอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส แพคติเนส เซลลูเลส แลคเตส และอื่นๆที่สร้างขึ้น จุลินทรีย์ในกลุ่มแลกติกแอสิคแบคทีเรีย ยังช่วยรักษาสมดุลในระบบทางเดินอาหารโดยไปครอบครองพื้นที่ผิวของลำไส้เพื่อไม่ให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคสามารถเกาะได้ ทั้งยังกระตุ้นให้เกิดหรือเพิ่มภูมิคุ้มกันบางชนิดภายใน ซึ่งเป็นแบบไม่เฉพาะเจาะจง ตลอดจนจุลินทรีย์สามารถสร้างสารคล้ายสารปฏิชีวนะซึ่งมีฤทธิ์ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ได้ การประยุกต์ใช้กับสัตว์หลายชนิด ได้แก่ ไก่ สุกร โค ตลอดจนสัตว์น้ำต่างๆ พบว่าสามารถนำสารเสริมชีวนะนี้มาทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ เพื่อลดปัญหาสารตกค้างที่ส่งผลมาถึงผู้บริโภคได้ คุณสมบัติดังกล่าวของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแลกติกแอซิคแบคทีเรีย สำหรับการประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมปฏิชีวนะทำให้มีการศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลายในยุโรป อเมริกาและญี่ปุ่น พร้อมทั้งมีการนำมาประยุกต์ใช้กับมนุษย์และการเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจต่างๆ ดังนั้นจึงเรียกว่าเป็น Friendly bacteria หรือ beneficial bacteria หรือ healthy bacteria

สามารถจำแนก Lactobacillus ตามลักษณะการใช้อาหาร และการสร้างสาร จำแนกได้เป็น 3 กลุ่มคือ

1. Obligate homofermentative lactobacilli

เป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตตีฟเพียงอย่างเดียว หมักน้ำตาลกลูโคสจะได้กรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปได้ร้อยละ 85 หรือมากกว่า ในการหมักน้ำตาลกลูโคสหรือกลูโคเนตไม่เกิดแก๊ส เช่น *L. delbrueckii, L. leichmanii* และมีบางชนิดหมักน้ำตาลกลูโคสไม่เกิดแก๊ส แต่ถ้าเป็นกลูโคเนตเกิดแก๊ส เช่น *L. casei, L. plantarum* เป็นต้น

2. Facultative heterofermentative lactobacilli

กลุ่มนี้ทำให้เกิดการหมักทั้งสองแบบ ซึ่งหมักน้ำตาลกลูโคสจะได้กรดแลกติกประมาณร้อยละ 65 นอกจากนั้นเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ กรดอะซิติก และเอทานอล เกิดแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคสและกลูโคเนต อุณหภูมิที่เชื้อเจริญได้มีผลต่อการแบ่งเป็นชนิดต่างๆ เช่น *L. fermentum* เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 15 องศาเซลเซียส

3. Obligately heterofermentative lactobacilli

เชื้อกลุ่มนี้ทำให้เกิดการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเตตีฟเพียงอย่างเดียว การหมักคาร์โบไฮเดรตจะเกิดกรดแลกติก CO_2 กรดอะซิติก เช่น *L. higardii, L. trichodes* และ *L. heterohiochii* เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

2.7.1 แหล่งคาร์บอน

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าเมื่อนำเวย์มาเติมกลูโคสลงไป 20 กรัมต่อลิตรร่วมกับยีสต์สกัดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรกรดแลกติกที่ผลิตได้จะเพิ่มมากขึ้น

Yun และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* RYK แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลกาแลกโทส กลีเซอรอล เวย์และแป้ง จะให้ปริมาณกรดแลกติก 2.7, 1.26, 2.24, 1.68, 1.84, และ1.19 ตามลำดับซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำ

Bulet และคณะ (2004) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส โมลาส ฝักถั่ว และรำข้าวสาลี พบว่า น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียวให้กรดแลกติกในปริมาณที่สูงเช่นเดียวกับที่ใช้น้ำตาลจากฝักถั่วให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 58 กรัมต่อลิตร

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากโมลาสในการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าที่ความเป็นกรดด่าง 7.0 ได้ปริมาณกรดแลกติก 95.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94.9

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ*R. arrhizus* พบว่าความเข้มข้นของแป้งที่ 20 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดแลกติก 0.85-0.92 กรัมต่อสารตั้งต้น

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด โดยนำมาย่อยกับเอนไซม์แล้วจึงนำมาผลิตกรดแลกติก ด้วยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่าเมื่อใช้ข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลีเป็นสารตั้งต้นจะให้ปริมาณกรดแลกติกมากกว่า กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่ออาหารประกอบด้วยแป้งสาลีที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 200 กรัมต่อลิตร แป้งข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้สูงถึง 5.36 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณเซลล์จะสูงถึง 14.08 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้แป้งสาลีเพียงอย่างเดียว

Takana และคณะ(2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ปริมาณต่างๆ ได้แก่ 50, 75, 100 และ 125 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ปริมาณน้ำตาล 125 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด

2.7.2 แหล่งไนโตรเจน

เชื้อจำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญ เช่นพิวรินไพริมิดินและไนโตรเจนยังเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อด้วยแหล่งไนโตรเจนพวกเกลืออินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และจากสารอินทรีย์ เช่นเปปโตน สารสกัดจากยีสต์ และน้ำแช่ข้าวโพด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอมโมเนียม ในรูปสารอินทรีย์เชื้อสามารถนำไปใช้ง่ายกว่าในรูปสารอนินทรีย์ แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นสารที่มีการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอย่างกว้างขวาง จากการศึกษาพบว่า แอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด

ประมุข ภระกูลสุขสถิต และ จุฑาทิพย์ เฉลิมโภชน์ (2549) ศึกษาผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลและน้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อนต่อการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* PD110 โดยใช้น้ำลวกข้าวโพดอ่อนเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* PD110 คือ ปริมาณน้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.7.3 พีเอชของอาหาร

โดยปกติ *Lactobacillus* sp. เจริญได้ในสภาวะกรด เจริญได้ที่พีเอช 6.5 ที่ 37 องศาเซลเซียส

ศิริประภา มั่นตรง และสุขใจ ชูจันทร์ (2530) ทำการศึกษาการเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TIATR-13419 ตรึงด้วยแอลจิเนตพบว่า ที่พีเอช 6.5 และที่ 37 องศาเซลเซียส ได้อัตราการผลิตกรดแลกติกเป็น 0.170 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.7.4 อุณหภูมิ

โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Lactobacillus* sp. อยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส

อำนาจ เจรีรัตน์ (2537) ทำการศึกษาการแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเลส โดยทดสอบการหมักหญ้าขนปริมาณ 25 กรัมในถุงพลาสติกโพลีโพรไพลีน เป็นเวลา 1 วัน ที่อุณหภูมิ 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่า *Lactobacillus* sp.I4 ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดร้อยละ 4.68 ของวัตถุแห้ง เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อหมักเป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้ไซเลสที่มีคุณภาพตามเกณฑ์ที่กำหนด

2.7.5 การให้อากาศ

โดยทั่วไป *Lactobacillus* sp. เป็นพวกแฟคัลเตตีฟแอนแอโรบ สามารถเจริญภายใต้สภาวะที่มีอากาศน้อย

Narayanan และคณะ (2004) ทำการศึกษาศักยภาพการผลิต แอล (+) แลกติกจากเชื้อ *L. rhamnosus* โดยใช้สภาวะการหมักแบบแอนแอโรบ เนื่องจาก *L. rhamnosus* เป็นแบคทีเรียชนิดแฟคคัลเททีฟแอนแอโรบ

2.8 สารสกัดจากยีสต์

สารสกัดจากยีสต์เป็นสารที่ได้จากการสกัดแยกของเหลวภายในเซลล์ยีสต์ มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล ของเหลวภายในเซลล์ยีสต์ คือไซโทพลาซึม ประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน แร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ สามารถนำมาใช้เป็นเป็นส่วนผสมในอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ใช้เป็นสาร

ปรุงแต่งอาหารให้มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อสัตว์ หรือใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพสำรับบุคคลที่อ่อนแอขาดสารอาหาร ส่วนใหญ่มักผลิตอยู่ในรูปผงหรือครีม สารสกัดจากยีสต์เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วไป เนื่องจากเป็นสารปรุงแต่งอาหารที่ได้จากธรรมชาติ มีราคาถูก และรสชาติดี

2.8.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต

เซลล์ยีสต์ที่นำมาผลิตมาจากยีสต์ทำขนมปังหรือยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ชนิดของยีสต์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis* และ*Kluyveromyces marxianus* ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดให้กลิ่นรสที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้วัตถุดิบที่ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ การจัดภาวการณ์เลี้ยง และการปนเปื้อนมีผลต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ด้วย (Reed and Nagodawithana, 1991; Torabizadeh, et al.,1996)

2.8.2 กระบวนการผลิตสารสกัดจากยีสต์

สารสกัดจากยีสต์สามารถผลิตได้หลายวิธี ที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบันแบ่งเป็น 4 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยเอนไซม์ของเซลล์ยีสต์ การสกัดด้วยกรด (hydrolysis) การสกัดด้วยสารเคมี (plasmolysis) และการสกัดด้วยวิธีทางกล ดังนี้

1. การสกัดหรือย่อยเซลล์ยีสต์ด้วยกรดแก่ (hydrolysis) ที่นิยมใช้ก็คือ กรดเกลือ (hydrochloric acid) ร่วมกับการใช้ความร้อนเพื่อย่อยผนังเซลล์และสารโมเลกุลใหญ่ในเซลล์ยีสต์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก ให้เป็นสารโมเลกุลเล็กๆ ที่ละลายน้ำได้ โดยนำเซลล์ยีสต์สดหรือแห้งมาเติมกรดเกลือลงไป แล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ทำการย่อยจนปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดถูกเปลี่ยนไปเป็นอัลฟาอะมิโนไนโตรเจน (α-aminonitrogen) ร้อยละ50-60 จากนั้นทำให้เป็นกลางด้วยด่างโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) แล้วกรองเอาตะกอนออก สารละลายที่ได้นำไปทำให้เข้มข้นขึ้น แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ยีสต์ไฮโดรไลเสท (hydrolysate yeast) สามารถเก็บไว้ปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารได้ดี

2. การสกัดด้วยสารเคมี (plasmolysis) เป็นการสกัดส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ยีสต์ ด้วยเกลืออนินทรีย์ หรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่น เกลือ น้ำตาล แอลกอฮอล์ อีเธอร์ (ether) คลอโรฟอร์ม (cholroform) และอะซิเตตอีเธอร์ (acetate ether) ที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งที่ภาวะนี้จะทำให้ยีสต์สูญเสียน้ำในเซลล์มากขึ้น ทำให้ผนังเซลล์ชั้นในแยกตัวออกจากผนังเซลล์ชั้นนอก และแตกออก สารอาหารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ก็จะไหลออกมา แล้วจึงแยกเอากากออก ทำสารละลายที่ได้ให้เข้มข้นขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ยีสต์พลาสโมไลเสท (plasmolysate yeast) ซึ่งมักจะมีปริมาณเกลืออยู่สูง ทำให้มีขีดจำกัดในการใช้กับอาหาร

3. การสกัดด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์ยีสต์ (autolysis) จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า ยีสต์ออโตไลเสท (autolysate yeast) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพที่ดีกว่าจาก 2 วิธีแรก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีกลิ่นรสใกล้เคียงกับสารสกัดจากเนื้อสัตว์ (meat extract) ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่ได้รับความสนใจมากกว่าวิธีอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์โดยปกติจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติอยู่แล้ว เมื่อเซลล์มีอายุมากและตายไป เอนไซม์ในเซลล์จะย่อยสลายผนังเซลล์และสารต่างๆ ที่มีอยู่ในเซลล์ แต่เป็นการย่อยตัวเองแบบค่อยเป็นค่อยไปทีละเล็กทีละน้อย ซึ่งต่างจากวิธีการนี้ที่จะเป็นการเร่งเซลล์ยีสต์ให้เกิดการย่อยตัวเองอย่างรวดเร็ว และเกิดในปริมาณมาก ด้วยการปรับสภาวะต่างๆ ทำให้สารประกอบเหล่านั้นออกมาภายนอกได้อย่างอิสระ

การย่อยสลายเซลล์ยีสต์วิธีนี้ ทำได้โดยนำเซลล์ยีสต์ที่ยังมีชีวิตอยู่มาทำเป็นสารแขวนลอยที่มีเซลล์ยีสต์อยู่ร้อยละ 15-20 ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.5 แล้วให้ความร้อนที่ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้ อัลฟาอะมิโนไนโตรเจนร้อยละ 50-60 จึงทำให้สารละลายเย็นลง แล้วกรองหรือเหวี่ยงแยกเอากากผนังเซลล์ออก ก่อนนำไปพาสเจอร์ไรซ์ที่ 80-90 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการระเหยน้ำออกบางส่วน แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

4. การสกัดโดยวิธีทางกายภาพ

การทำให้เซลล์ยีสต์แตกสลายโดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้เครื่องจักรกลต่างๆทำให้เซลล์ยีสต์ฉีกขาดเสียหายจนกระทั่งเซลล์แตกออก เครื่องมือที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตได้แก่ เครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดันสูงถึง 20,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อัดของเหลวผ่านรูแคบๆซึ่งอาจใช้ร่วมกับการปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงปล่อยลงในของเหลว หรือเพิ่มแรงบดและแรงเสียดสีกับเซลล์ โดยการใส่เม็ดแก้ว (glass bead) ลงในของเหลวที่มีเซลล์ยีสต์อยู่ ทำให้เซลล์เกิดแรงกดอัดและเกิดแรงเฉือนจนกระทั่งเซลล์แตกอย่างสมบูรณ์ ตัวอย่างเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ที่นิยมใช้เช่น เครื่องเฟรนช์เพลส (French press) วิธีนี้มีการปนเปื้อนจากสารที่ใช้ในกระบวนการผลิตน้อยและให้ผลผลิตเซลล์ยีสต์สูง

2.8.3 คุณภาพของสารสกัดจากยีสต์

สารสกัดจากยีสต์ที่มีคุณภาพดีควรปราศจากการปนเปื้อนของสารที่ใช้สกัดของเหลวภายในเซลล์ยีสต์ หรือปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่น สารอาหารในผลิตภัณฑ์ประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน แร่ธาตุที่เป็นประโยชน์ เอนไซม์หรือสารเคมีที่ใช้ในการสกัดควรมีคุณภาพดี เพื่อทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดแยกดีขึ้นและลดการปนเปื้อนจากสารที่ไม่เกี่ยวข้องในกระบวนการ นอกจากนี้การปรับสภาวะการสกัดให้เหมาะสมกับความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ช่วยทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นได้ ประเทศที่การผลิตสารสกัดจากยีสต์ค่อนข้างมากและส่งไปขายทั่วโลก ได้แก่ แคนาดา เยอรมนี ญี่ปุ่นและจีน (Hay, 1993; Querol และ Fleet, 2006)

2.8.4 การนำยีสต์สกัดไปใช้ประโยชน์ (Main applications of Yeast Extract)

1. ใช้เป็นสารแต่งกลิ่นรสธรรมชาติสำหรับอาหารคาว เนื่องจากเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสที่ได้จากธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับสุขภาพของผู้บริโภคอย่างสารปรุงแต่งกลิ่นรสสังเคราะห์ ประกอบกับกลิ่นและรสที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของยีสต์สกัด ส่งผลให้มีการใช้ยีสต์สกัดในการปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารแทนผงชูรส (monosodium glutamate - MSG) มีแนวโน้มว่าจะได้รับความนิยมสูงขึ้นเรื่อยๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

117331

ปัจจุบันมีการใช้ยีสต์สกัดแต่งกลิ่นอาหารบางชนิดเลียนกลิ่นธรรมชาติของเนื้อสัตว์และชีส ตลอดจนใช้แต่งรสในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ซุปกระป๋อง ซอส อาหารเสริมสำหรับทารก เป็นต้นยีสต์สกัดและผลิตภัณฑ์จากยีสต์สกัดเป็นที่นิยมบริโภคมากในประเทศแถบยุโรป ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ โดยชื่อทางการค้าของ ผลิตภัณฑ์ยีสต์สกัดสำหรับบริโภคที่เป็นที่รู้จัก ได้แก่ Vegemite และ Marmite

2. ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและสารส่งเสริมการเจริญสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จากองค์ประกอบหลักของยีสต์สกัดที่อุดมไปด้วยไนโตรเจน วิตามิน และสารส่งเสริมการเจริญ ยีสต์สกัดจึงถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมการผลิตสารปฏิชีวนะ ยาและอาหารเสริม อุตสาหกรรมผลิตผลิตภัณฑ์จากนม เป็นต้น

2.9 กากน้ำตาล (Molasse) ในประเทศไทย

กากน้ำตาลเป็นของเหลวสีดำที่เหนียวข้น ซึ่งไม่สามารถจะตกผลึกน้ำตาลได้อีก เป็นเนื้อของสิ่งที่ไม่ใช่น้ำตาลที่ละลายปนอยู่ในน้ำอ้อย ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ท (invert sugar) และสารเคมี เช่น ปูนขาว ซึ่งใช้ในการตกตะกอนให้น้ำอ้อยใส ส่วนประกอบของกากน้ำตาลจะปรวนแปรไม่แน่นอน แล้วแต่ว่าได้มาจากอ้อยพันธุ์ไหนและผ่านกรรมวิธีอย่างไร แต่มักจะหนีไม่พ้นน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ทกับน้ำ ปัจจุบันนี้ โรงงานน้ำตาลทันสมัย มีความสามารถในการสกัดน้ำตาลออกจากกากน้ำตาลได้มากขึ้นแต่ก็ไม่หมดเสียทีเดียว เพราะถ้าสกัดให้ออกหมดจริงจะสิ้นค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงมีน้ำตาลซูโครสบางส่วนที่สูญเสียไปกับกากน้ำตาล ซึ่งมักจะสูญเสียไปมากกว่าสูญเสียไปทางอื่น โดยทั่วๆไปจะมีซูโครสปนอยู่ในกากน้ำตาลเฉลี่ยร้อยละ 7.5

2.9.1 ประเภทของกากน้ำตาล

1. กากน้ำตาลเป็นผลผลิตพลอยได้ที่มีคุณค่า เป็นส่วนของของเหลวที่เหลือหลังจากการแยกผลึกของน้ำตาลออกแล้วมีลักษณะเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้ม องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ตกผลึกในการผลิตน้ำตาลทรายนั้นจะมีกากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้เกิดขึ้นประมาณร้อยละ 4 ถึง 6 ของปริมาณอ้อยที่ใช้ในการผลิต กากน้ำตาลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามวิธีกรรมในการผลิตน้ำตาลทราย คือ

2. กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว (plantation white sugar) ซึ่งเราเรียกว่า black-strap molasses จะมีปริมาณกากน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 50-60 กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (refine sugar) ซึ่งเราเรียกว่า refinery molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 48

3. กากน้ำตาลที่ได้จากการทำบางส่วนของน้ำอ้อยแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหย (inverted can juice) ซึ่งเราเรียกว่า invert molasses หรือ hightest molasses วิธีนี้เป็นการผลิตกากน้ำตาลโดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล

ส่วนประกอบหลักของกากน้ำตาล 32 ตัวอย่าง ที่ได้จากโรงงานน้ำตาลในแอฟริกาใต้ ในปี 1957 จากโรงงาน 17 แห่ง

องค์ประกอบ	(ร้อยละโดยน้ำหนัก)
น้ำ	20.65
ซูโครส	36.60
รีดิวซิงชูการ์	13.00
น้ำตาลที่ใช้หมักเชื้อได้ทั้งหมด	50.50
เถ้าของซัลเฟต	15.10
ยางและแป้ง (gum & starch)	3.43
ขี้ผึ้ง	0.38
ไนโตรเจนทั้งหมด	0.95
ซิลิกาในรูป SO_2	0.46
ฟอสเฟตในรูปP_2O_5	0.12
โพแทสเซียมในรูป K_2O	4.19
แคลเซียมในรูป CaO	1.35
แมกนีเซียมในรูป MgO	1.12

ส่วนประกอบที่สำคัญของกากน้ำตาล คือ น้ำตาลที่ใช้หมักเชื้อได้ทั้งหมดซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 50โดยน้ำหนัก กากน้ำตาลจากบางโรงงานมีส่วนประกอบนี้ ถึงร้อยละ 75 ซึ่ง 2ใน 3 เป็นน้ำตาลชนิดอินเวอร์ท

ที่มา: สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2.9.3 สารปนเปื้อนในกากน้ำตาล

องค์ประกอบและสารปนเปื้อนที่มีในทั่วไปของกากน้ำตาล ได้แก่ น้ำ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลรีดิวซิงซูการ์ เถ้าซัลเฟต ยางและแป้ง ขี้ผึ้งไนโตรเจน ซิลิกาในรูปซิลิกาออกไซด์ (SiO_2) ฟอสเฟตในรูปฟอสเฟตออกไซด์ (P_2O_2) โปแตสเซียมในรูปโพแทสเซียมออกไซด์ (K_2O) แคลเซียมในรูปแคลเซียมออกไซด์ (CaO)

ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล (2545) มีปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในกากน้ำตาลในปริมาณค่อนข้างสูง โดยเฉพาะธาตุแมงกานีสและธาตุเหล็กที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว

Pailin (2005) กากน้ำตาลประกอบด้วยตัวยับยั้งและไม่เป็นประโยชน์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ไอออนของโลหะหนัก ปริมาณของน้ำตาลที่สูงมากเกินไป และสารป้องกันเชื้อรา เพื่อรักษาสภาพของกากน้ำตาลจึงต้องทำการปรับปรุงสภาพก่อนการนำมาใช้เป็นซับสเตรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.4 วิธีปรับปรุงคุณภาพกากน้ำตาล (T.Roukas,2002)

-วิธี Sulfuric acid

โดยการปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายกากน้ำตาลให้เท่ากับ 3.0 ด้วยกรดซัลฟิวริก 1 นอร์มัล วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5000g 15 นาทีนำส่วนน้ำมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มัล นำสารละลายที่ได้ทำให้ปลอดเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

-วิธี Carbon activated

ใส่ถ่านกัมมันต์ 15 กรัม ลงในสารละลายกากน้ำตาล 200 มิลลิลิตร คนผสมที่ 50 องศาเซลเซียส 15 นาที ทำการแยกถ่านกัมมันต์ออกด้วยการกรอง ทำซ้ำ 4 ครั้งหรือจนกว่าจะได้สารละลายกากน้ำตาลที่ปราศจากสี ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล นำสารละลายที่ได้ทำให้ปลอดเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2.9.5 ประโยชน์ของกากน้ำตาล

อุตสาหกรรมการผลิตเหล้าและแอลกอฮอล์ เป็นแหล่งใหญ่ที่ต้องการกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ สำคัญในอุตสาหกรรม ผลิตน้ำตาลและแอลกอฮอล์ ผลผลิตที่ได้จากการหมักกากน้ำตาลได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ บิวธิลแอลกอฮอล์ อาซีโตน กรดซิตริก กลีเซอรอล (glycerol) และ ยีสต์ เอทิลแอลกอฮอล์ใช้ทำกรด อาซีติค เอธีลอีเธอร์ ฯลฯ สารประกอบอื่นที่ ได้จากการหมักกากน้ำตาล ได้แก่ เอธิลอาซีเตท บิวธิลอา-ซีเตท อามีลอาซีเตท น้ำส้มสายชู และคาร์บอนไดออกไซด์แข็ง ในอดีตชาวเกาะเวสต์อินดีส ผลิตเหล้ารัมจากกากน้ำตาล นอกจากนั้นถ้านำกากน้ำตาลที่ทำให้ บริสุทธิ์ไปหมักและกลั่นจะได้ เหล้ายิน (gin) ส่าเหล้าหรือยีสต์ที่ตายแล้ว เป็นผลพลอยได้ซึ่งนำไปทำอาหารสัตว์ นอกจากนี้กากน้ำตาลยังใช้ทำยีสต์สำหรับทำขนมปังและเหล้าได้ด้วย ยีสต์บางชนิดที่ให้โปรตีนสูงคือ *Torulopsis utilis* ก็สามารถเลี้ยงขึ้นมาได้จาก กากน้ำตาล กากน้ำตาลสามารถนำมาทำกรดเป็นแลกติกได้ แม้ว่าจะทำได้น้อยมาก

2.10 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.10.1 ทฤษฎีและความรู้ทั่วไป

เทคนิควิธีโครมาโทกราฟฟี่ชนิดของเหลวความดันสูง (HPLC) เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่นิยมกันอย่างมาก เพราะว่าง่ายต่อการใช้งาน, มีประสิทธิภาพสูง และไม่มีข้อจำกัดใดๆในเรื่องการระเหยหรือความเสถียรของสารประกอบตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

2.10.2 ทฤษฎีการปฏิบัติ

1) Stationary phase ใน HPLC หมายถึง ของแข็งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ซึ่ง mobile phase จะไหลผ่านอย่างต่อเนื่อง สารละลายตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าไปยัง mobile phase ที่ไหลผ่าน inject port สารละลายตัวอย่างจะไหลไปพร้อมกับ mobile phase องค์ประกอบสารละลายที่แพร่ไปจะเกิดปฏิกิริยากับ stationary phase แบบ non-covalent ปฏิกิริยาของ stationary phase และตัวอย่างร่วมกับ mobile phase จะทำให้เกิดการ

แพร่หรือการแยกตัวขององค์ประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่นตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ stationary phase มากกว่าทำปฏิกิริยากับ mobile phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกมาจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า และมี retention time นานกว่าตรงกันข้ามกับตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ mobile phase มากกว่า stationary phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าและมี retention time น้อยกว่า

2) Mobile phase ใน HPLC หมายถึง ตัวทำละลายที่จะใช้กับคอลัมน์ หรือ stationary phase อย่างต่อเนื่อง mobile phase เปรียบเสมือนตัวพาสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสารละลายตัวอย่างถูกฉีดเข้าไปยัง mobile phase ผ่านไปยัง injector port สารละลายตัวอย่างจะไหลผ่านคอลัมน์ไปพร้อมๆกันกับ mobile phase องค์ประกอบของสารละลายที่แพร่ผ่านไปจะทำปฏิกิริยากันแบบ non-covalent กับคอลัมน์ ปฏิกิริยาทางเคมีของ mobile phase + ตัวอย่างกับคอลัมน์ เป็นการควบคุมการแพร่และการแยกตัวขององค์ประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่นตัวอย่างที่มีปฏิกิริยาที่รุนแรงกับ mobile phase มากกว่า stationary phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกมาจากคอลัมน์เร็วกว่า และมี retention time สั้นกว่า แต่ถ้าตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงกับ stationary phase มากกว่า mobile phase จะทำให้ตัวอย่างหลุดออกมาจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า และมี retention time นานกว่า mobile phase สามารถเปลี่ยนได้เพื่อควบคุมการเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างและ stationary phase ซึ่ง mobile phase มีหลายชนิดได้แก่ isocratic , gradient และ polytypic

3) Injector สำหรับ HPLC ตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าไปใน HPLC จะผ่านเข้าไปใน injector port โดยจะประกอบด้วย injection valve และ sample loop ตัวอย่างจะถูกละลายใน mobile phase ก่อนที่จะถูกฉีดเข้าไปใน sample loop ผ่านทาง injection valve การหมุนรอบของ valve จะเป็นการเปิด-ปิด เพื่อฉีดตัวอย่างเข้าไปยัง mobile phase ที่ไหลอยู่

4) HPLC pumps มีหลายชนิดสำหรับใช้ในการวิเคราะห์เช่น reciprocating piston pumps ประกอบด้วย motorเล็กๆสำหรับดันลูกสูบให้เคลื่อนที่ไปหน้า-หลัง อย่างรวดเร็ว มีhydraulic ปริมาตร 35-400 ไมโครลิตร จังหวะที่ลูกสูบดึงมาด้านหลัง separate column valve จะถูกปิด แล้วลูกสูบจะดูดตัวทำละลายจากที่เก็บ Mobile phase ในจังหวะที่ลูกสูบดันไปข้างหน้า pump จะดันสารตัวทำละลายออกสู่ column จากที่เก็บ ช่วงของอัตราการไหลสามารถเปลี่ยนได้โดยการเปลี่ยนจังหวะปริมาตรของลูกสูบแต่ละรอบ หรือเปลี่ยนจังหวะความถี่

5) Detector สำหรับ HPLC คือองค์ประกอบที่ตอบสนองต่อสารประกอบตัวอย่างที่หลุดออกมา และให้ peak ปรากฏบน chromatograph ในภายหลัง detector จะอยู่ตรงตำแหน่งที่ถัดจาก stationary phase เพื่อคอยตรวจสอบสารประกอบที่หลุดออกจากคอลัมน์

6) Degaser เป็นอุปกรณ์ที่สำคัญสำหรับทำลายแก๊สที่เกิดขึ้นใน stationary phase เพราะแก๊สที่เกิดขึ้นมีผลต่อการ detect และทำให้คอลัมน์เสียหาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผศ.ดร.สุนทร กาญจนทวี ศึกษาการผลิตกรดแลคติคจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* เสริมด้วยสารสกัดยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ โดยใช้แหล่งสารอาหารทดแทนเพื่อลดต้นทุนการผลิต ในด้านแหล่งไนโตรเจน ซึ่งใช้ brewer's yeast extract ที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ ทั้งนี้ได้ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว จึงมีการทดลองใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังกับสูตรอาหารอื่นๆและมีการใช้ brewer's yeast extract แทนการใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *L. lactis* คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที การเติม brewer's yeast extract แทนการใช้กลูโคสในสูตรอาหาร MRS และสารสกัดยีสต์ทางการค้า โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 31.32 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่า pH ที่ 6.0 ในกระบวนการหมักแบบกะ พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติก ปริมาณ 96.34 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการป้อนอาหาร 0.1 กรัมต่อวินาที ซึ่งถือว่าเป็นกระบวนการผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดในงานวิจัยนี้ สำหรับสารสกัดยีสต์จากโรงงานเบียร์นั้นสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ร้อยละ 33 เมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนของสารสกัดยีสต์ทางการค้า

สุธิดา อยู่สำราญและคณะ(2547) ศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาลของ *Lactobacillus mali* NRIC 1692 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS สูตรดัดแปลงที่มีการใช้กากน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร แทนการใช้กลูโคส 20 กรัมต่อลิตรพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติกด้วยเชื้อ *Lactobacillus mali* NRIC 1692 คืออาหารสูตรที่ 2 ซึ่งสามารถผลิตกกรดแลกติกได้ถึง 22กรัมต่อลิตร เมื่อหมักนาน 69 ชั่วโมง มีค่าผลผลิตกรดแลกติกต่อหน่วยซับสเตรตเท่ากับ 0.71 ค่าการใช้ซูโครสเท่ากับร้อยละ 88 และมีอัตราเร็วในการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด เท่ากับ 0.66 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

เครื่องเขย่า (Incubator Shacker)

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamnar Air Flow)

เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

เครื่อง High Perfrmance Liquid Chromatgraphy (HPLC)

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

ตู้เย็น (Refrigerator)

ถังหมักขนาด 5 ลิตร

ฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร

ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

บีกเกอร์ (Beaker)

หลอดทดลอง (Test Tube)

กระบอกตวง (Cylinder)

ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask)

ปิเปตต์ (Pipette)

ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)

ตะเกียงแอลกอฮอล์

คิวเวตต์ (cuvette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

กลูโคส (glucose)

เปปโตน (peptone)

ยีสต์สกัด (yeast extract)

เนื้อสกัด (meat extract)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต($CaCl_2 . 2 H_2O$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7 H_2O$)

วุ้น (agar)

Tween – 80

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa)

ไตรแอมโมเนียมซิเตรต

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น 20%

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 4 M

กรดไฮโดรคลอริก (HCL)

3.3 วัตถุดิบ

- กากน้ำตาล (molass)
- สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ (yeast autolysate)

3.3.1 การเก็บวัตถุดิบ

กากน้ำตาลที่นำมาใช้จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารสกัดจากเซลล์ยีสต์จะเก็บไว้ในเดซิเคเตอร์

3.3.2 การเตรียมวัตถุดิบ

เตรียมกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร โดยชั่งกากน้ำตาลร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารที่ต้องการเตรียม นำมาละลายในน้ำกลั่น ใส่กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตรร้อยละ 1 ของปริมาตรอาหารที่ต้องการเตรียมหรือปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 3.6 ต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมากรองแล้วเก็บไว้ใช้ต่อไป

ลิขสิทธิ์นี้เป็นของ ... ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ โดยนำเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 มาทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในถังหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทำออโตไลซีส แล้วอบแห้งจนกลายเป็นผง เก็บไว้ที่เดซิเคเตอร์

3.4 เชื้อจุลินทรีย์

3.4.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.4.1.1 เชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059

3.4.1.2 เชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

3.4.1.3 เชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046

3.4.1.4 เชื้อ Baker's Yeast

3.4.1.5 เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

3.4.2 การเก็บรักษาเชื้อ

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ปริมาณเล็กน้อย แล้วลาก (steak) ลงบนอาหารวุ้นเอียง (MRS slant) แต่ถ้าเป็นเชื้อ *Saccharomyces cerevisae*, *Candida utilis*, Baker' Yeast จะถ่ายลงใน YM slant นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดจุกสำลีให้สนิท เก็บหลอดทดลองใส่ถุงพลาสติกแล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.4.3 การตรียมกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059

การตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น มีวิธีการดังนี้ คือ ถ่ายเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059 ปริมาณ 2 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างอาหารไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ปรับค่าความขุ่นของอาหารให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ)

3.4.4 การตรียมกล้าเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

การตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น มีวิธีการดังนี้ คือ ถ่ายเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 ปริมาณ 2 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างอาหารไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ปรับค่าความขุ่นของอาหารให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 การตรียมกล้าเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046

การตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น มีวิธีการดังนี้ คือ ถ่ายเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046 ปริมาณ 2 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างอาหารไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ปรับค่าความขุ่นของอาหารให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ)

3.4.6 การตรียมกล้าเชื้อ Baker's Yeast

การตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น มีวิธีการดังนี้ คือ ถ่ายเชื้อ Baker's Yeast ปริมาณ 2 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างอาหารไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ปรับค่าความขุ่นของอาหารให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ)

3.4.7 การตรียมกล้าเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

การตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น มีวิธีการดังนี้ คือ ถ่ายเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ปริมาณ 2 ลูป ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างอาหารไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (ปรับค่าความขุ่นของอาหารให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลว MRS)

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

3.5.1 อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (pre - culture)

กลูโคส (glucose)	2	เปอร์เซ็นต์
เปปโตน (peptone)	1	เปอร์เซ็นต์
ยีสต์สกัด (yeast extract)	0.5	เปอร์เซ็นต์

เทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (ดัดแปลงจาก Li, 2009)

3.5.2 อาหารสังเคราะห์ (Yeast Malt medium, YM)

กลูโคส (glucose)	10	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	5	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	3	กรัมต่อลิตร
มอลต์สกัด (malt extract)	3	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.2 เทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5.3 อาหารดัดแปลง (Modified medium, MM)

กากน้ำตาล (molass)	40	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	5	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต($CaCl_2 . 2 H_2O$)	0.17	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7 H_2O$)	1.04	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	0.5	กรัมต่อลิตร

นำกากน้ำตาลที่ผ่านการเตรียมแล้วจากข้อ 3.3.2 มาเติมสารอาหาร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.5 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4 โมลาร์ (ดัดแปลงจาก Rajoka, 2006; Li,2009; Ahmed, 2010)

3.5.4 อาหารเหลว (MRS broth)

เนื้อสกัด (meat extract)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	20	กรัมต่อลิตร
Tween – 80	1	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซีเตต	5	กรัมต่อลิตร
ไตรแอมโมเนียมซิเตรต	2	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.05	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7 H_2O$)	0.2	กรัมต่อลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5.5 อาหารสังเคราะห์ชุดควบคุม (Synthetic medium, SM)

ยีสต์สกัด (yeast extract)	10	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.25	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7 H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.03	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	20	กรัมต่อลิตร

3.5.6 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร (Modified medium, MM1)

สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ (yeast autolysate)	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.25	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7 H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.03	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	15	กรัมต่อลิตร

3.5.7 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร (Modified medium, MM2)

สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ (yeast autolysate)	10	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.25	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7 H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.03	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	15	กรัมต่อลิตร

3.5.8 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 15 กรัมต่อลิตร (Modified medium, MM3)

สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ (yeast autolysate)	15	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.25	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7 H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.03	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	15	กรัมต่อลิตร

3.5.9 อาหารกากน้ำตาลที่มียีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร (Modified medium, MM4)

ยีสต์สกัด (yeast extract)	10	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
กากน้ำตาล (molass)	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.25	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7 H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.03	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	15	กรัมต่อลิตร

3.5.10 อาหารกากน้ำตาลที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร (Modified medium, MM5)

สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ (yeast autolysate)	10	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
กากน้ำตาล (molass)	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.25	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7 H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.03	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	15	กรัมต่อลิตร

3.6 การศึกษายีสต์ 4 สายพันธุ์ที่ผลิตปริมาณโปรตีนได้สูงสุดและเปรียบเทียบระหว่างอาหารสังเคราะห์และอาหารดัดแปลงเพื่อนำมาใช้ผลิตสารสกัดจากยีสต์

3.6.1 การเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059, *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046 และ Baker's Yeast ในอาหารสังเคราะห์ (YM medium)

นำอาหารสังเคราะห์จากข้อ 3.5.2 มาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นใส่หัวเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059, *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046 และ Baker's Yeast ปริมาตรร้อยละ5 ของปริมาตรอาหารในฟลาสก์ บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณโปรตีน

3.6.2 การเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059*Candida utilis* TISTR 5001 , *Candida utilis* TISTR 5046 และ Baker's Yeast ในอาหารดัดแปลง

นำอาหารดัดแปลงจากข้อ 3.5.3 มาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นใส่หัวเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059, *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046 และ Baker's Yeast ปริมาตรร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารในฟลาสก์ บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3 วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Kjeldhal (A.O.A.C , 2000)

นำตัวอย่างมา 1 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask แล้วนำมาใส่กรดซัลฟิวริกที่เป็นสารใช้ในการย่อย 15 มิลลิลิตร เติม K_2SO_4 0.35 กรัม เพื่อช่วยให้จุดเดือดสูงขึ้นและเติม $CuSO_4 . 5H_2O$ เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาในการย่อย หลังจากนั้นนำไปทำการย่อยที่อุณหภูมิสูง จนได้สารละลายสีฟ้าใส$(NH_4)_2SO_4$ แล้วนำมาเติมน้ำ 20 มิลลิลิตรนำมาต่อกับเครื่องกลั่นพร้อมกับ 40% NaOHและกรดบอริก 4% เมื่อทำการกลั่นแล้วกรดบอริกจะจบกับ NH_3 แล้วนำมาไทเทรตกับ 0.1 นอร์มัล HCl โดยใช้อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง methylred และ Brom cresolgreen 2-3 หยด จนได้สารละลายสีชมพูอ่อนแล้วนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยสูตรเฉพาะของ Kjeldahl

3.7 การผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ (yeast autolysate)

3.7.1 การเลี้ยงเชื้อยีสต์

นำอาหารจากข้อ 3.5.3 มาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นใส่หัวเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 จากข้อ 3.4.4 ปริมาตรร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารในฟลาสก์ บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.7.2 การทำออโตไลซีส (autolysis)

นำอาหารไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบจากนั้นนำไปอบแห้ง นำเซลล์ที่อบแห้งแล้วมา 15 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 4 - 5.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N ให้ความร้อนอุณหภูมิ 40 - 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการระเหยน้ำออก จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสแล้วเก็บในเดซิเคเตอร์

3.8 ศึกษาปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลง

3.8.1 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร

นำอาหารสูตรดัดแปลงจากข้อ 3.5.6 มาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 175 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นใส่หัวเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 จากข้อ 3.4.7 ปริมาตรร้อยละ5 ของปริมาตรอาหารในฟลาสก์ บ่มที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณกรดแลกติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.2 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร

นำอาหารสูตรดัดแปลงจากข้อ 3.5.7 มาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 175 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นใส่หัวเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 จากข้อ 3.4.7 ปริมาตรร้อยละ5 ของปริมาตรอาหารในฟลาสก์ บ่มที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณกรดแลกติก

3.8.3 อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 15 กรัมต่อลิตร

นำอาหารสูตรดัดแปลงจากข้อ 3.5.8 มาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 175 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นใส่หัวเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 จากข้อ 3.4.7 ปริมาตรร้อยละ5 ของปริมาตรอาหารในฟลาสก์ บ่มที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณกรดแลกติก

3.9 ศึกษาการเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

3.9.1 อาหารสังเคราะห์

นำอาหารสังเคราะห์จากข้อ 3.5.5 มาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 200 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นใส่หัวเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 จากข้อ 3.4.7 ปริมาตรร้อยละ5 ของปริมาตรอาหารในฟลาสก์ บ่มที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณกรดแลกติก

3.9.2 อาหารกากน้ำตาลที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

นำอาหารกากน้ำตาลจากข้อ 3.5.9 มาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 200 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นใส่หัวเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 จากข้อ 3.4.7 ปริมาตรร้อยละ5 ของปริมาตรอาหารในฟลาสก์ บ่มที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณกรดแลกติก

3.9.3 อาหารกากน้ำตาลที่มีสารสกัดจากเซลล์ยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

นำอาหารกากน้ำตาลจากข้อ 3.5.10 มาเทใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 200 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นใส่หัวเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 จากข้อ 3.4.7 ปริมาตรร้อยละ5 ของปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารในฟลาสก์ บ่มที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณกรดแลกติก

3.9.4 อาหารสูตรดัดแปลง

เลือกสูตรอาหารที่เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณมากที่สุดจากข้อ 3.8 มาทำการเปรียบเทียบ

3.10 ศึกษาศักยภาพของการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตรเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.9 มาทำการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร กับในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.10.1 การผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร

ปริมาตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อคือ 3,500 มิลลิลิตร ทำการเติมหัวเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ปริมาตรร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ บ่มที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณกรดแลกติก

3.10.2 การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ปริมาตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อคือ 3,500 มิลลิลิตร ทำการเติมหัวเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ปริมาตรร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ไม่ต้องให้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.5 ตลอดการหมัก เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณกรดแลกติก

3.11 การวิเคราะห์ผล

3.11.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ทั้งหมดโดยวิธี Total plate count (A.O.A.C.2000)

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

3.11.2 การวัดปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)

วัดปริมาณกรดแลกติกโดยการใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยนำน้ำหมักที่ได้จากการเก็บตัวอย่างที่จำนวนชั่วโมงต่างๆ มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก โดยกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนการวิเคราะห์ ใช้คอลัมน์ Inertsil C8-3 ใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

3.11.3 การวัดปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)

วัดปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ,1956) นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ฟีนอล 1 มิลลิลิตรและกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณน้ำตาล โดยต้องมีค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 0.2-0.8 ถ้าเกินกว่านั้นต้องทำการเจือจางก่อนแล้วค่อยทำตามขั้นตอนข้างต้น

3.11.4 การหาปริมาณผลได้ และอัตราการผลิต

ปริมาณผลได้จะคิดเทียบระหว่างปริมาณกรดแลกติกที่ได้ต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปและอัตราการผลิตจะคิดเทียบระหว่างปริมาณกรดที่ได้ต่อปริมาตรน้ำหมักต่อชั่วโมงที่ใช้ในการหมัก

3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษายีสต์ 4 สายพันธุ์ที่ผลิตปริมาณโปรตีนได้สูงสุดและเปรียบเทียบระหว่างอาหารสังเคราะห์และอาหารดัดแปลงเพื่อนำมาใช้ผลิตสารสกัดจากยีสต์

4.1.1 ผลการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059, *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046 และ Baker's Yeast ในอาหารสังเคราะห์ (YM medium)

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059, *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046 และ Baker's Yeast ในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นทำการบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาล ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณเซลล์และปริมาณโปรตีน พบว่า

เชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 มีการเจริญของเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างที่ชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 5.42 และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือคือ 0.99 กรัมต่อลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1.1

เชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046 มีการเจริญของเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างที่ชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 5.64 และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือคือ 2.09 กรัมต่อลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1.3

เชื้อ Baker's Yeast มีการเจริญของเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างที่ชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 4.52 และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือคือ 3.26 กรัมต่อลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1.5

เชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059 มีการเจริญของเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างที่ชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 4.97 และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือคือ 0.64 กรัมต่อลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1.7

4.1.2 ผลการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059, *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046 และ Baker's Yeast ในอาหารดัดแปลง (MM medium)

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059 , *Candida utilis* TISTR 5001 , *Candida utilis* TISTR 5046 และ Baker's Yeast ในอาหารดัดแปลงที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นทำการบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาล ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณเซลล์และปริมาณโปรตีน พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 มีการเจริญของเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างที่ชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 5.18 และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือคือ 3.65 กรัมต่อลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1.2

เชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046 มีการเจริญของเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างที่ชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 5.04 และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือคือ 5.89 กรัมต่อลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1.4

เชื้อ Baker's Yeast มีการเจริญของเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างที่ชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 4.62 และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือคือ 6.78 กรัมต่อลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1.6

เชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059 มีการเจริญของเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างที่ชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 4.97 และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือคือ 12.19 กรัมต่อลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1.8

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีน้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด คือ ร้อยละ 47.79 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisae* TISTR 5059 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีปริมาณโปรตีนเพียงร้อยละ 44.85 ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1.9 สามารถสรุปได้ว่าเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 ที่เพาะลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีน้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเป็นสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูงและลดต้นทุนในการผลิตเพราะใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ซึ่งมีราคาถูกทดแทนอาหารสังเคราะห์ที่มีราคาแพง โดยสอดคล้องกับ Hill (1979) ได้ศึกษากระบวนการผลิตยีสต์ออโตไลเสทแล้วพบว่ายีสต์ที่เหมาะสมในการนำมาศึกษาปริมาณโปรตนในการผลิตยีสต์ออโตไลเสทคือ *Candida utilis* , *Saccharomyces cerevisiae* , *Saccharomyces fragilis* และ *Saccharomyces carlsbergensis*

Rojoka และคณะ(2005) ได้ศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากข้าวที่สีแล้วโดยเชื้อ *Candida utilis* โดยใช้ถังหมักที่มีการให้อากาศผลิตแบบต่อเนื่อง พบว่า *Candida utilis* สามารถใช้ประโยชน์จากแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดและเมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนพบว่า *Candida utilis* ให้ปริมาณโปรตีนสูง

Lee และ Kim (2001) ได้ศึกษาการผลิตชีวมวล *Candida utilis* โดยใช้กากน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน พบว่าเชื้อ *Candida utilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจที่สุดในการนำมาผลิตสารที่ให้โปรตีนสูงเนื่องจากสามารถให้โปรตีนได้สูงกว่า 50 % ของน้ำหนักแห้งเซลล์ยีสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Candida utilis* จะให้ปริมาณโปรตีนปริมาณมากและสามารถใช้ประโยชน์จากแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เนื่องจาก *Candida utilis* สามารถใช้วิถีการเผาผลาญพลังงานได้หลายชนิด ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้กากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำ ซูโครส (45 – 50%)เป็นน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลคู่ที่เชื้อยีสต์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย แหล่งไนโตรเจนและโปรตีน วิตามิน กรดอินทรีย์ และสารโลหะหนัก เช่น เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี แมกนีเซียม แคลเซียมและอื่นๆที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ โดยกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำตาล ด้วยความเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกและเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ หาซื้อได้ง่าย กากน้ำตาลจึงเหมาะสมในการนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเซลล์ยีสต์ ส่วนมุมมองทางด้านความประหยัดจึงเหมาะสมทางด้านเศรษฐกิจด้วย

ตารางที่ 4.1.1 แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และร้อยละการใช้น้ำตาล ในอาหาร YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

ชั่วโมงที่	พีเอช	การเจริญของเซลล์	ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	ร้อยละการใช้น้ำตาล
0	5.02	0.06	11.69	0.00
12	4.83	5.53	2.14	81.67
24	5.01	7.59	2.17	81.44
36	4.79	11.30	1.59	86.38
48	5.34	14.25	1.07	90.86
60	5.18	15.00	1.16	90.08
72	5.42	26.55	0.99	91.51

ตารางที่ 4.1.2 แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และร้อยละการใช้น้ำตาล ในอาหาร FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1.3 แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และร้อยละการใช้น้ำตาล ในอาหาร YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046

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

ตารางที่ 4.1.4 แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และร้อยละการใช้น้ำตาล ในอาหาร FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1.5 แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และร้อยละการใช้น้ำตาล ในอาหาร YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ Baker's Yeast

ชั่วโมงที่	พีเอช	การเจริญของเซลล์	ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	ร้อยละการใช้น้ำตาล
0	5.25	0.143	38.97	0.00
12	4.34	4.65	21.2	45.59
24	4.17	2.55	17.6	54.83
36	3.26	5.89	13.8	64.58
48	4.51	8.55	8.07	79.30
60	4.12	10.04	4.39	88.73
72	4.52	12.45	3.26	91.64

ตารางที่ 4.1.6 แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และร้อยละการใช้น้ำตาล ในอาหาร FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ Baker's Yeast

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1.7 แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และร้อยละการใช้น้ำตาล ในอาหาร YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059

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

ตารางที่ 4.1.8 แสดงค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และร้อยละการใช้น้ำตาล ในอาหาร FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1.9 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนจากสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 4 สายพันธุ์ ในอาหาร YM และอาหาร FM

สายพันธุ์ยีสต์	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)		ผู้ทำการทดลอง
	อาหาร FM	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

4.2 ผลของการศึกษาปริมาณของสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลงโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

ศึกษาหาปริมาณยีสต์ออโตไลเสทที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเติมลงไปเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 5 , 10 , 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่เกิดขึ้นเมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 โดยมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตรและเติมแร่ธาตุ ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 175 มิลลิลิตร โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น 6.5 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง น้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดแลกติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1 การผลิตกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลงที่มียีสต์ออโตไลเสท 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน (MM 1)

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารสูตรดัดแปลง MM 1 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมียีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น 6.5 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด 45.89 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 120 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรด – ด่างในชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 3.84 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือร้อยละ 4.34 มีปริมาณผลได้ 1.20 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิต 0.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกการผลิตกรดแลกติกในชั่วโมงที่ 120 มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 4.2.1 , 4.2.2 และรูปที่ 4.2.1 , 4.2.2

4.2.2 การผลิตกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลงที่มียีสต์ออโตไลเสท 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน (MM 2)

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารสูตรดัดแปลง MM 2 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมียีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น 6.5 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด 41.09 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรด – ด่างในชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 3.94 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือร้อยละ 10.85 มีค่าผลได้ 1.07 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิต 0.43 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกการผลิตกรดแลกติกในชั่วโมงที่ 96 มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 4.2.1 , 4.2.2 และรูปที่ 4.2.1 , 4.2.2

4.2.3 การผลิตกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลงที่มียีสต์ออโตไลเสท 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน (MM 3)

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารสูตรดัดแปลง MM 3 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมียีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น 6.5 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด 41.85 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 120 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรด – ด่างในชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 3.88 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือร้อยละ 5.38 มีค่าผลได้ 1.12 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิต 0.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกการผลิตกรดแลกติกในชั่วโมงที่ 120 มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 4.2.1 , 4.2.2 และรูปที่ 4.2.1 , 4.2.2

จากตารางที่ 4.2.1 และ 4.2.2 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกระหว่างอาหารสูตรดัดแปลง MM 1 , MM 2 และ MM 3 พบว่าปริมาณกรดแลกติกของอาหารสูตรดัแปลง MM 1 มีปริมาณกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แลกติก 45.89 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าปริมาณกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลง MM 2 และ MM 3 (41.09 และ 41.85 กรัมต่อลิตรตามลำดับ)อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบผลได้และอัตราการผลิตพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) จึงสรุปได้ว่าอาหารสูตรดัดแปลง MM 1 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรดัดแปลง MM 2 และ MM 3 นั่นคือยีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรเหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติก จึงเลือกใช้อาหารดัดแปลงสูตร MM 1 มาทำการศึกษาในหัวข้อต่อไป อาจเนื่องมาจากปริมาณความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอาจไปยับยั้งการเจริญของเชื้อทำให้ความสามารถในการผลิตกรดแลกติกได้น้อยลง โดยสอดคล้องกับWeeและคณะ (2004) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลสำหรับการผลิตกรดแลกติกชนิด L โดยการหมักแบบกะของเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณและแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อปริมาณกรดแลกติกที่เชื้อผลิตขึ้นและอาจเกิดปฏิกิริยา substrate inhibition

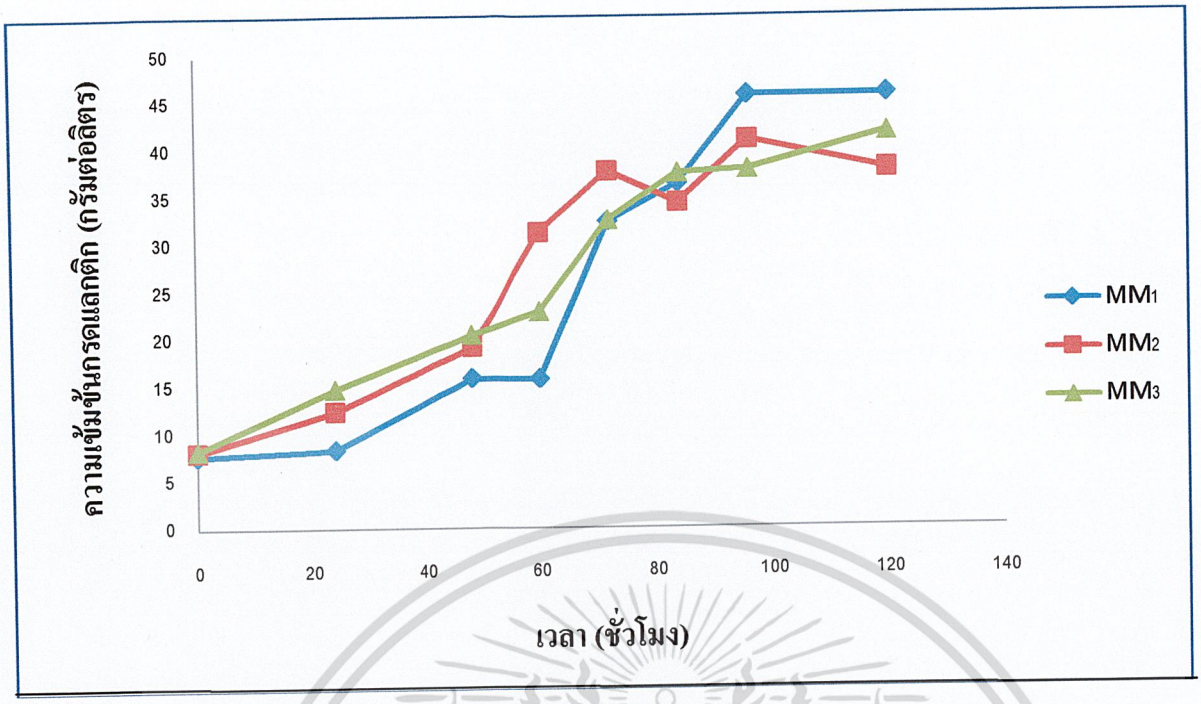
ตารางที่ 4.2.1 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลงทั้ง 3 สูตร

สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	พีเอช	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ)	ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)
MM 1	120	3.84^{b}	4.34^{c}	45.89^{a}
MM 2	96	3.94^{a}	10.85^{a}	41.09^{b}
MM 3	120	3.88^{b}	5.38^{b}	41.85^{b}

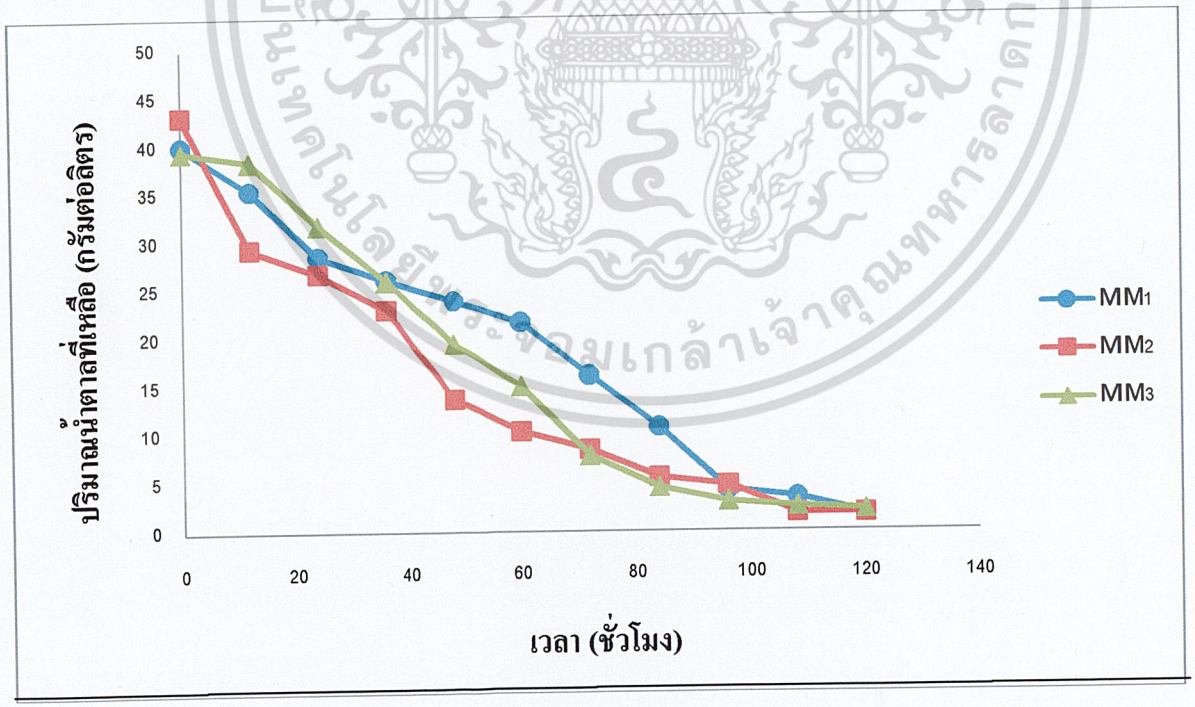
ตารางที่ 4.2.2 แสดงการเปรียบเทียบผลได้และอัตราการผลิต ในอาหารสูตรดัดแปลงทั้ง 3 สูตร

สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
MM 1	120	1.20^{a}	0.38^{b}
MM 2	96	1.07^{a}	0.43^{a}
MM 3	120	1.12^{a}	0.35^{c}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2.1 แสดงความเข้มข้นกรดแลกติกที่เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ผลิตได้ในอาหารดัดแปลงที่มีปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์แตกต่างกัน คือ 5, 10,15 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.2.2 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการใช้ของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารดัดแปลงที่มีปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์แตกต่างกัน คือ 5, 10,15 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยประกอบด้วยสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 4 สูตรด้วยกัน สูตรที่ 1 คือ อาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน สูตรที่ 2 คือ อาหาร MM 1 ที่เป็นผลการศึกษาในหัวข้อที่ผ่านมาโดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ยีสต์ออโตไลเสทเป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูก สูตรที่ 3 คือ อาหารที่มีน้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน(MM 4) และสูตรที่ 4 คือ อาหารที่มีน้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกและมียีสต์ออโตไลเสทในปริมาณที่เหมะสมที่เป็นผลการศึกษาจากหัวข้อที่แล้วเป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูก(MM 5) โดยอาหารแต่ละสูตรจะมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร แล้วเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่เกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกที่มีปริมาณสูงสุดและสามารถลดต้นทุนในการผลิตกรดแลกติก ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 175 มิลลิลิตร โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น 6.5 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง , น้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดแลกติก

4.3.1 การผลิตกรดแลกติกในอาหารสังเคราะห์

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น 6.5 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด 37.45 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 84 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรด – ด่างในชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 4.32 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือร้อยละ 20.44 มีปริมาณผลได้ 1.26 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิต 0.45 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกการผลิตกรดแลกติกในชั่วโมงที่ 84 มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 4.3.1 , 4.3.2 และรูปที่ 4.3.1 , 4.3.2

4.3.2 การผลิตกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลง MM 1

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมียีสต์ออโตไลเสทเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น 6.5 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด 45.89 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 120 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรด – ด่างในชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 3.84 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือร้อยละ 4.34 มีปริมาณผลได้ 1.20 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิต 0.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจึง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือกการผลิตกรดแลกติกในชั่วโมงที่ 120 มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 4.3.1 , 4.3.2 และรูปที่ 4.3.1 , 4.3.2

4.3.3 การผลิตกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลง MM 4

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีน้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกและมียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น 6.5 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด 45.72 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรด – ด่างในชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 4.27 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือร้อยละ 38.67 มีปริมาณผลได้ 1.79 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิต 0.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกการผลิตกรดแลกติกในชั่วโมงที่ 96 มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 4.3.1 , 4.3.2 และรูปที่ 4.3.1 , 4.3.2

4.3.4 การผลิตกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลง MM 5

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารสูตรดัดแปลงที่มีน้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกและมียีสต์ออโตไลเสทในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อที่ผ่านมาเป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูก โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น 6.5 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด 28.93 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 120 เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรด – ด่างในชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ที่ 4.34 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือร้อยละ 3.98 มีปริมาณผลได้ 0.63 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิต 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกการผลิตกรดแลกติกในชั่วโมงที่ 120 มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 4.3.1 , 4.3.2 และรูปที่ 4.3.1 , 4.3.2

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลง MM 1 และ MM 4 นั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่อาหารสูตรดัดแปลง MM 1 และ MM 4 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงอาหารสังเคราะห์และอาหารสูตรดัดแปลง MM 5 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$) ดังนั้นจึงใช้อาหารสูตรดัดแปลง MM 1 และ MM 4 เป็นตัวแทนวิเคราะห์สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในอาหารสูตรดัดแปลง MM 1 และ MM 4 มีปริมาณ 45.89 และ 45.72 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผลได้อัตราการผลิตในอาหารสูตรดัดแปลง MM 1 มีค่าเป็น 1.20 และ 0.39 ตามลำดับ ส่วนในอาหารสูตรดัดแปลง MM 1 มีค่าเป็น 1.79 และ 0.48 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในอาหารสูตรดัดแปลง MM 4 มีปริมาณผลได้และอัตราการผลิตสูงกว่าอาหารสูตรดัดแปลง MM 1 และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับอาหารสูตรดัดแปลง MM 1 จึงอาจสรุปได้ว่าจะใช้อาหารสูตรดัดแปลง MM 4 ที่มีน้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนและมียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวแทนที่ดีที่สุดของสูตรอาหารทั้งหมดที่เหมาะสมในการนำมาผลิตกรดแลกติก จึงนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในหัวข้อถัดไปและยังช่วยลดระยะเวลาในการผลิตให้สั้นลงอีกด้วยเนื่องจากสูตรอาหารอื่นใช้เวลาในการผลิตกรดแลกติก 120 ชั่วโมงแต่อาหารสูตรดัดแปลง MM 4 ใช้เวลาเพียง 96 ชั่วโมง และเนื่องจากการใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งกากน้ำตาลเป็นวัสดุเหลือใช้จากการผลิตน้ำตาลซึ่งราคาถูกและหาได้ง่าย จึงทำให้ลดต้นทุนในการผลิตลงอีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4.3.2

โดยสอดคล้องกับ Hahn – Hägerdal และ Hofvendahl (2000) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยการหมักจากวัสดุเหลือใช้ที่นำกลับมาใช้ใหม่ โดยพบว่าชนิดของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการนำมาผลิตกรดแลกติกคือแบคทีเรียในตระกูล Lactobacillus ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกสูง น้ำตาลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการนำมาผลิตแลกติกจะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงแต่เนื่องจากมีราคาแพงและกรดแลกติกมีราคาไม่ค่อยสูงจึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตกรดแลกติกและเมื่อนำวัสดุเหลือใช้ เช่น กากน้ำตาลที่ผ่านการไฮโดรไลด์แล้วได้น้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกสูงนำมาใช้ทดแทนน้ำตาลบริสุทธิ์ได้ และแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตกรดแลกติกได้ดีคือยีสต์สกัดแต่ถ้าต้องการให้ได้ผลผลิตสูงขึ้นควรเสริมแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นลงไปด้วย

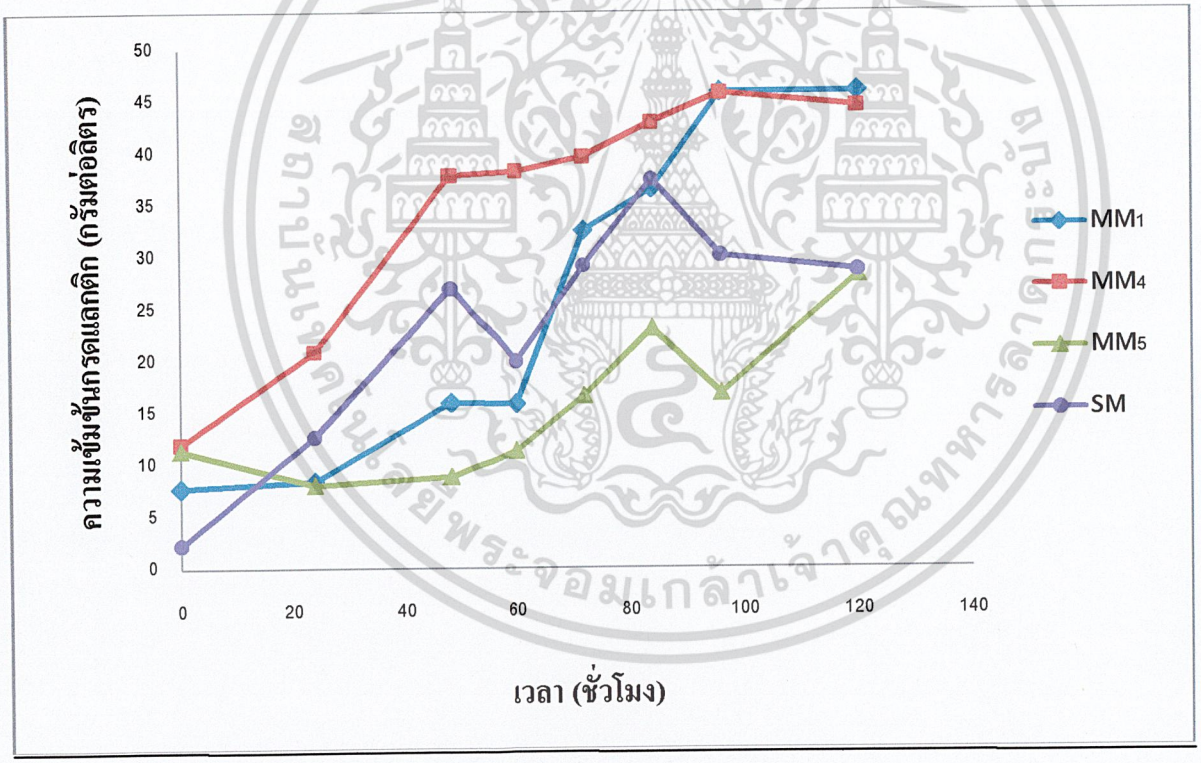
ตารางที่ 4.3.1 แสดงค่าความเป็นกรด - ด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดแลกติกในอาหารสูตรต่างๆ

สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	พีเอช	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ)	ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)
MM 1	120	3.85^{b}	4.34^{c}	45.89^{a}
MM 4	96	4.24^{a}	38.67^{a}	45.72^{a}
MM 5	120	4.35^{a}	3.98^{c}	28.93^{c}
อาหารสังเคราะห์ (ชุดควบคุม)	84	4.30^{a}	20.44^{b}	37.45^{b}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

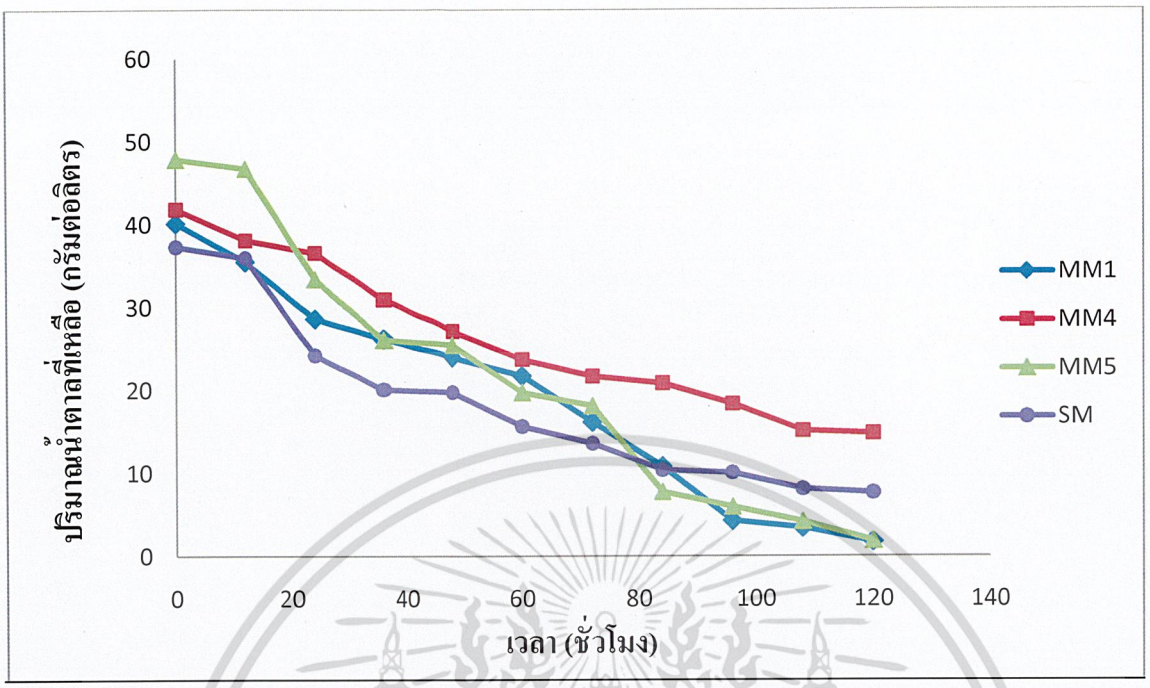
ตารางที่ 4.3.2 แสดงการเปรียบเทียบผลได้และอัตราการผลิต ในอาหารสูตรต่างๆ

สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
MM 1	120	1.20^{b}	0.38^{c}
MM 4	96	1.79^{a}	0.48^{a}
MM 5	120	0.63^{c}	0.24^{d}
อาหารสังเคราะห์ (ชุดควบคุม)	84	1.26^{b}	0.45^{b}



รูปที่ 4.3.1 แสดงความเข้มข้นกรดแลกติกที่เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ผลิตได้ในอาหารทั้ง 4 สูตร (MM1: อาหารดัดแปลงที่มีปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร, MM4: อาหารกากน้ำตาลที่มีปริมาณยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร, MM5: อาหารกากน้ำตาลที่มีปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 10 กรัม ต่อลิตร, SM : อาหารสังเคราะห์ชุดควบคุม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3.2 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการใช้ของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารทั้ง 4 สูตร (MM1: อาหารดัดแปลงที่มีปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร, MM4: อาหารกากน้ำตาลที่มีปริมาณยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร, MM5: อาหารกากน้ำตาลที่มีปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 10 กรัม ต่อลิตร, SM : อาหารสังเคราะห์ชุดควบคุม)

4.4 ผลการศึกษาศักยภาพของการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตรเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 5 ลิตร

4.4.1 การผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 โดยใช้อาหารสูตรดัดแปลง (ที่มีน้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ)เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร จากนั้นทำการบ่มในสภาวะตั้งนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นที่ 6.5 โดยทำการควบคุมความเป็นกรด – ด่างด้วยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตรและเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า การผลิตกรดแลกติกโดยใช้ฟลาสก์ขนาด 5 ลิตรนี้ จะมีสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 84 โดยมีปริมาณกรดแลกติก 31.36 กรัมต่อลิตร จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต 1.33×10^{8} CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาณผลได้ 0.99 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.37 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังตารางที่ 4.4.1, รูปที่ 4.4.1 , 4.4.2 และ 4.4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 โดยใช้อาหารสูตรดัดแปลง (ที่มีน้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ)เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากนั้นทำการบ่มในสภาวะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้การกวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นที่ 6.5 โดยทำการควบคุมค่าความเป็นกรด – ด่างด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์และทำการควบคุมความเป็นกรด – ด่างให้อยู่ที่ 6.5 ตลอดการทดลองและเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า การผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตรนี้ จะมีสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดอยู่ที่ชั่วโมง 96 โดยมีปริมาณกรดแลกติก 59.84 กรัมต่อลิตร จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต 6.70×10^8 CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาณผลได้ 1.27 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังตารางที่ 4.4.1 , รูปที่ 4.4.1 , 4.4.2 และ 4.4.3

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติก อัตราการผลิตและผลได้ทางสถิติแล้วพบที่ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) โดยที่การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตรจะให้ปริมาณกรดแลกติก อัตราการผลิตและผลได้สูงกว่าในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร จึงอาจสรุปได้ว่าการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตรให้ผลได้ดีกว่าในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร อาจเป็นผลมาจากในถังหมักมีการควบคุมค่าความเป็นกรด – ด่างที่สม่ำเสมอคือ 6.5 ตลอดเวลาของการหมักจึงทำให้มีอัตราการผลิตกรดแลกติกที่มีประสิทธิภาพดีกว่าในฟลาสก์ ซึ่งสอดคล้องกับ Idris และ Suzuna (2006) ศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด – ด่างที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรดโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่ความเป็นกรด – ด่างที่ 6.5 การใช้น้ำตาลจะเร็วและให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง Johnและคณะ(2006) ศึกษาอิทธิพลของค่าวามเป็นกรด – ด่างที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลังพบว่าค่าความเป็นกรด – ด่างที่ 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติก

ส่วนปริมาณกรดแลกติก อัตราการผลิตและผลได้ในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตรที่มีปริมาณน้อยกว่าในถังหมักขนาด 5 ลิตรอาจเนื่องมาจากการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตในการควบคุมความเป็นกรด – ด่าง โดยแคลเซียมคาร์บอเนตจะไปจับกับกรดแลกติกที่เชื้อผลิตได้เป็นเกลือแลกเตทแล้วตกตะกอนลงไปทำให้ความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้นเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ช้าทำให้ไม่สามารถควบคุมความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 ได้ตลอดเวลาเหมือนกับในถังหมัก จึงอาจทำให้เกิด product inhibition ทำให้เชื้อตายหรือมีกิจกรรมการผลิตกรดแลกติกได้น้อยลง โดยสอดคล้องกับสุธยา บุญถนอมและคณะ(2537) ได้ศึกษาผลของกรดแลกติกที่มีต่อเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตแหนม พบว่ากรดแลกติกมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการทำกิจกรรมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* โดยอัตราการเจริญเติบโตและการเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

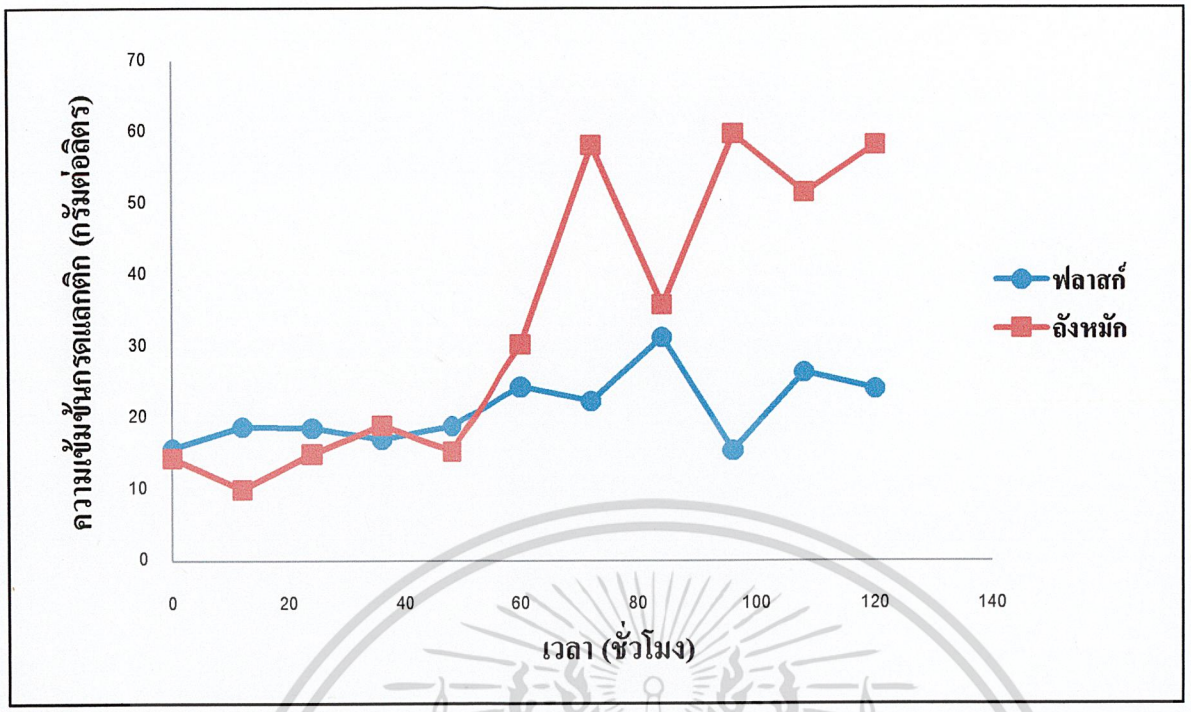
จำนวนเซลล์ของเชื้อจะลดลงตามค่าความเข้มข้นของกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งกิจกรรมการสร้างกรดแลกติกจะลดลงด้วย

ตารางที่ 4.4.1 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดแลกติก ผลได้ อัตราการผลิตและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ในฟลาสก์และถังหมักขนาด 5 ลิตร

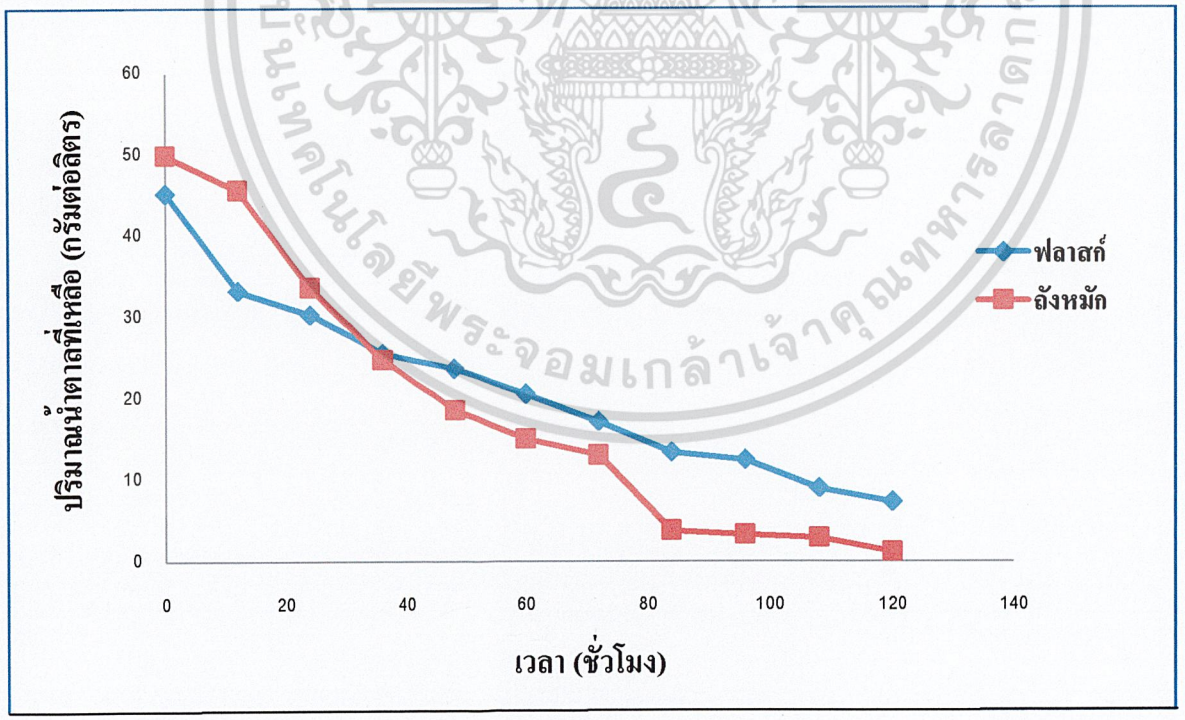
สภาวะ	ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ(ร้อยละ)	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)
ฟลาสก์	84	29.69^{a}	31.36^{b}	0.99^{b}	0.37^{b}	1.33×10^{8b}
ถังหมัก	96	6.69^{b}	59.84^{a}	1.27^{a}	0.62^{a}	7.60×10^{8a}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าที่มีตัวอักษรที่เหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($P<0.01$) และตัวอักษรที่ไม่เหมือนกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($P<0.01$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

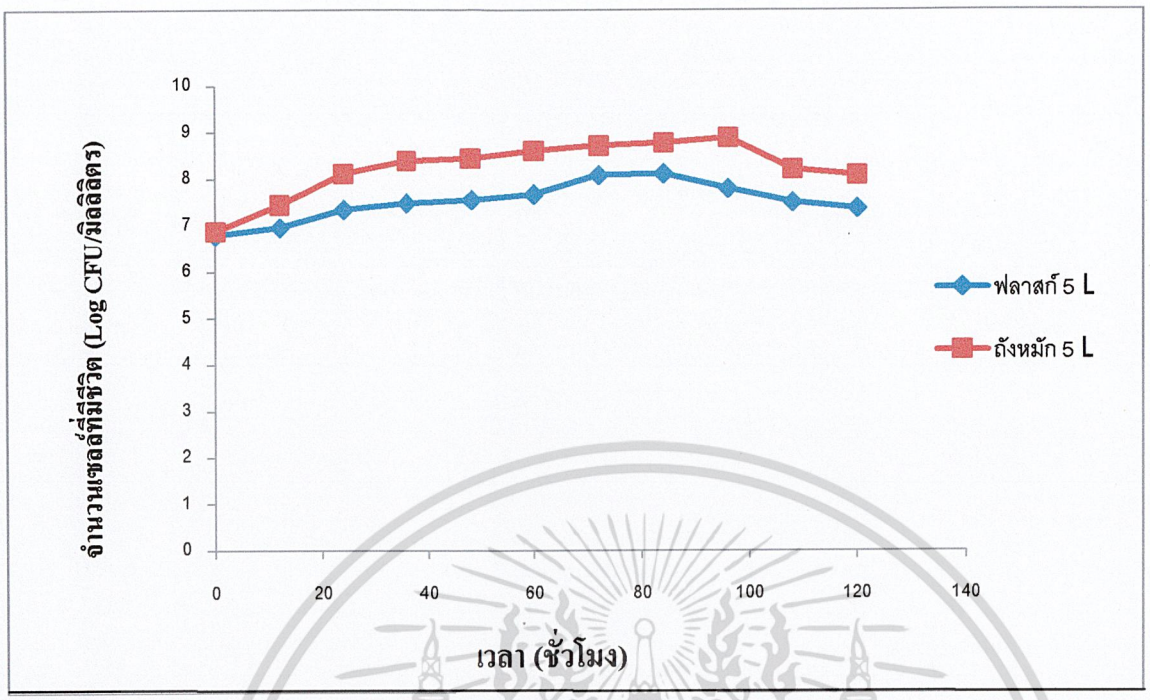


รูปที่ 4.4.1 แสดงความเข้มข้นกรดแลกติกที่เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ผลิตได้ในฟลาสก์และถังหมัก



รูปที่ 4..4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการใช้ของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในฟลาสก์และถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4.3 แสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ในฟลาสก์และถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลวิจัย

จากการศึกษาการประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนราคาถูกเพื่อผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

การศึกษายีสต์ 4 สายพันธุ์ที่ผลิตปริมาณโปรตีนได้สูงสุดและเปรียบเทียบระหว่างอาหารสังเคราะห์และอาหารดัดแปลงเพื่อนำมาใช้ผลิตสารสกัดจากยีสต์ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Candida utilis* TISTR 5001 ที่เลี้ยงในอาหารดัดแปลงที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดคือ ร้อยละ 47.79

การศึกษาปริมาณของสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารดัดแปลง พบว่า อาหารดัดแปลงที่มีปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร มีความเข้มข้นของกรดแลกติกและค่าผลได้สูงที่สุด คือ 45.89 กรัมต่อลิตรและ1.20 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ

การศึกษาการเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก พบว่า อาหารที่มีกลูโคสและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน มีความเข้มข้นของกรดแลกติกไม่แตกต่างกัน คือ 45.89, 45.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่าผลได้คือ 1.20, 1.79 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าในอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าผลได้สูงกว่าและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งการนำกากน้ำตาลซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นแหล่งคาร์บอนยังจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตกรดแลกติกได้ ดังนั้นจึงนำอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมาทำการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมัก 5 ลิตรเพื่อเปรียบเทียบกับฟลาสก์ 5 ลิตร

การศึกษาศักยภาพของการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตรเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า อาหารที่ทำการหมักในฟลาสก์สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 31.36 กรัมต่อลิตรและในถังหมักสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 59.84 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบผลได้ของการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์กับถังหมัก พบว่า ในฟลาสก์และถังหมักมีผลได้เท่ากับ 0.99, 1.27 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ โดยจะเห็นได้ว่าการผลิตกรดแลกติกในถังหมักนั้นจะได้ความเข้มข้นของกรดแลกติกและผลได้สูงกว่าการผลิตในฟลาสก์ อาจเป็นผลมาจากในถังหมักมีการรักษาอัตราการกวนและค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.5 ตลอดการหมัก จึงทำให้มีอัตราการผลิตแลกติกที่ดีกว่าในฟลาสก์ที่มีสภาวะตั้งนิ่ง ส่วนระยะเวลาที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดนั้นในฟลาสก์จะอยู่ที่ชั่วโมงที่ 84 ส่วนถังหมักอยู่ที่ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการทำการทดลองโดยใช้วิเคราะห์ทางสถิติแบบ CRD เพื่อให้เกิดความถูกต้องและความแม่นยำมากยิ่งขึ้น ควรที่จะควบคุมความแปรปรวนของการทดลองให้มีทิศทางเดียว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกวลิน รัตนตรัสกุลและคณะ. 2550. การผลิตกรดแลกติกโดยใช้กากน้ำตาลเป็นสับเสรทโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. ปริญญานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2534. จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม. ภาคชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล. 2545. การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากแป้งและกากน้ำตาล. ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ พระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

วิไลลักษณ์ สิทธิ์อมรพรและนายสุรพงษ์ ธรรมโสภินท์กุล. 2551. การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155. ปริญญานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ประมุข ภระกูลสุขสถิต และ จุฑารัตน์ เฉลิมโภชน์. 2549. ผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลและน้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อนต่อการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* PD 110. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 44. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

สราลี รัตนพันธุ์จักร์และคณะ. 2552. การผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. ปริญญานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุนทร กาญจนทวี. 2548. การผลิตกรดแลคติคจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* เสริมด้วยสารสกัดยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์.สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุธิดา อยู่สำราญ, ศวรรณี เหลืองสุนทรชัย, สาวิตรี วทัญญูไพศาล และ จันทรพร ผลากรกุล. 2547. การศึกษาจลนศาสตร์ของการหมักสร้างกรดแลกติกจากกากน้ำตาลโดยสายพันธุ์ท้องถิ่น *Lactobacillus mali* N 1962. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีที่ 4 ฉบับที่ 4.

สุธยา บุญถนอมและคณะ. 2537. ชนิดและปริมาณสารเคมีที่ให้ความเป็นกรดที่มีต่อเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นสำหรับใช้ในการผลิตแหนม. วารสารเกษตร. 10(3), 267-280.

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2549. ยีสต์ คุณประโยชน์ในอุตสาหกรรมใกรุงเทพฯ:สเปเชียลตี้ไบโอเทค.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

อำนาจ เจรีรัตน์, วิชัย ตุรงค์พัน, สุรชัย แซ่เล้า, ธีรวิทย์ ทับทอง และ สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. 2537. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียอลกติกเพื่อใช้ในการปรับปรุงการทำ Silage. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. สำนักหอสมุดมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Altaf, B. 2007. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid. In Osmania University. India, 498-503.

Angel Yeast. 2010. Culture medium yeast extract, 31-42.

Benninga, H. 1990. A history of lactic acid making : A chapter in the history of biotechnology. Kluwer Academic publishers. The Natherlands, 417-451.

Biswas, S.R., Ray, P., Jhonso, M.C. and Ray, B. 1995. Influence of growth condition on production of bacteriocin, Pediocin AcH, by Pediococcus acidilactici H. Applied and Environmental Microbiology. 57, 1265-1267.

Danner, H., Neureiter, M., Madzingaido, L., Gartner, M. and Braun, R. 1998. *Bacillus stearothermophilus* for thermophilic production of L- lactic acid. Applied Biochemistry and Biotechnology. 70-72, 895-903.

Datta, R., Tsai, S.P., Bonsigor, P., Moon, S. and Frank, J. 1995. Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. FEMS Microbiology Review. 16, 221-231.

Dubois, M., Gill, K.A., Hamilton, J.K., Rebersand, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. Analytical Chemistry. 28, 350-356.

Dunn, R.L., Strobel, J.D., Cowsar, D.R. and Tice, T.R. 1988. Preparelation and evalution of lactide/glucolide copolymers for drug delivery. Polymers in medicine III, 149-159.

Focus Technology. 2010. Yeast extract powder (biological culture medium) Retrieved November 10, China

Hay , J.D. 1993. Novel yeast products from fermentation processes. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 58, 203-205.

Hill. 1979. Process for the production of a yeast autolysate. United States Patent. 64(352), 19-23.

Hofvendahl, K. and Hahn-Hägerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and Microbial Technology. 26, 87-107.

Holten, C.H. 1971. Lactic acid properties and chemistry of lactic acid and derivatives. Verlag Chemie, Germany.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Idris and Suzuna. 2006. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, intial pHand temperatre on lactic acid productin from pineapple waste using immobilized *L. delbrueckii*. Process Biochemistry. 41, 1117-1123.

John, Nampoothiri and Pandey. 2006. Solid state fermentation for L – lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. Process Biochemistry. 41, 759-763.

Lee, B.-K. and Kim, J.K. 2001. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. Aquacultural Engineering. 25, 111-124.

Mason, N., Thies, C. and Cicero, T.J. 1976. J.Pharm. Sci. 65, 847.

Nagodawithana, T. 1998. Production of flavours. Nutritional requirement of commercially important microorganisms. Esteekay associates. Milwaukee. 12, 302-303.

Narayanan, N., Roychoudhury, P.K., Srivastava, A. 2004. L(+) latic acid fermentation and its product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology. 7(2), 167-179.

Ohkouchi, Y.J., Yun, J.S., Han, S.H., Jung, S., Ryu, H.W. 2005. Lactic acid fermentation from agriculture resources as cheap raw materials. Bioresource Technology. 96, 1492-1498.

Pailin Panvichit. 2005. Application of composite PDMS/PVDF membrane in perstraction system of ethanol fermentation in fed-batch process from cane molasses. Suranaree University of TechnologySchool of Biotechnology.

Qureol, A. and Fleet, G. 2006. Yeast in food and beverages. The Yeast Handbook. Springer-Verlag Verlin Heldelberg, Germany.

Rajoka, M.I., Khan, S.H, Jabar, M.A., Awan, M.S. and Hashmi, A.S. 2006. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishing with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. Bioresource Technology. 97, 1934-1941.

Roukas, T., Lazaridou, A. and Biliaderis, C.G. 2002. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. Enzyme and Microbial Technology. 31(1-2), 122-132.

Ruter, P. 1975. Molases utilixation. Food and Agricultural Organization of the United Nation, Rome.

Schleifer, K.H. and Ludiwig, W. 1995. Phylogenic relationshipof lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria. 2, 7-18.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Smith, S.M. 1991. D-lactic acid production as a monitor effectiveness of antimicrobial agent. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. 35, 237.

Tanaka, T., Hoshina, M., Tanabe, S., Sakai, K. Ohtsubo, S. and Taniguchi, M. 2006. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. Bioresource Technology. 97, 211-217.

Tejayadi, S. and Cheryan, M. 1995. Lactic acid from cheese whey permeate Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. Applied Microbiology and Biotechnology. 43, 242-248.

Van, N. and J.H. 1981. Hydroxy carboxylic acid. Kirk Othmer Encyclopidia of chemical technology. Third edition. New York. 13, 80-103.

Yun, J.-S., Wee, Y.-J. and Ryu, H.-W. 2009. Production of optically pure L(+)-lactic acid from variouscarbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. Enzyme and Microbial Technology. 43, 416-423.

[Online].Avaible : www2.siit.tu.ac.th/pakorn/articles/A277p2x2.jpg (10/6/2553)

[Online].Avaible : http://i.ddimg.com/img/mol/DB04398.mol.jpg (10/6/2553)

[Online].Avaible : http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.htm (15/10/2553)

[Online].Avaible : http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.html (15/10/2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (meat extract)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัมต่อลิตร
Tween – 80	1	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa)	5	กรัมต่อลิตร
ไตรแอมโมเนียมซิเตรต (CH_3COONH_3)	2	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7 H_2O$)	0.2	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.05	กรัมต่อลิตร

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมด แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (meat extract)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	20	กรัมต่อลิตร
Tween – 80	1	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa)	5	กรัมต่อลิตร
ไตรแอมโมเนียมซิเตรต (CH_3COONH_3)	2	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7 H_2O$)	0.2	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.05	กรัมต่อลิตร
วุ้น (agar)	15	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมด แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dobois และคณะ,1956)

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)

2. ฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดย ชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 มิลลิลิตร

3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1000 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	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

วิธีการ

1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอลร้อยละ 5 ลงไป 1 มิลลิลิตร

2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป 5 มิลลิลิตรอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆปล่อยลงที่ข้างหลอด

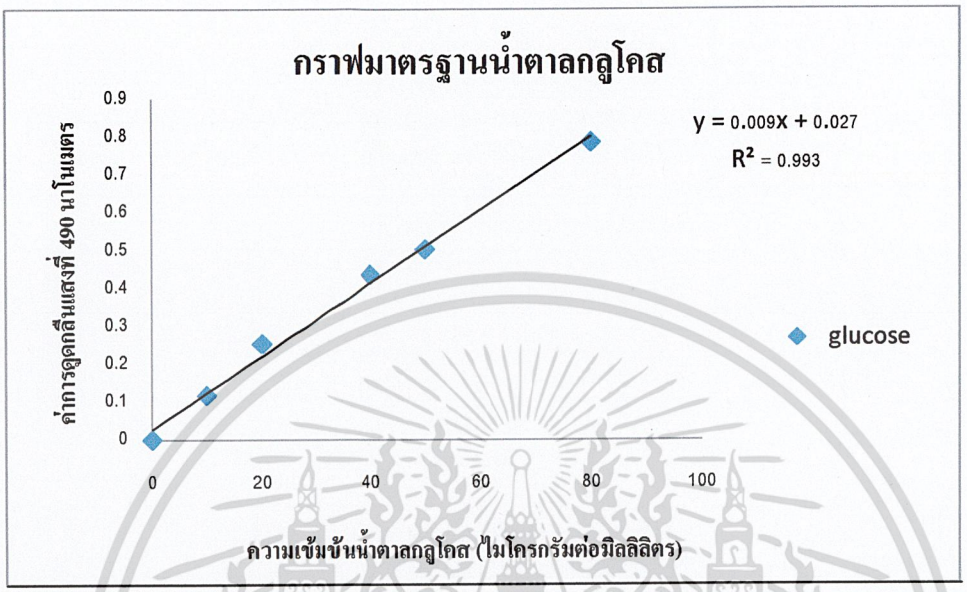
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างหรือคำนวณได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 – 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

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

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Digestion unit
2. Distillation unit
3. Titration unit
4. Boiling chips
5. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4 93-98%) reagent grade
6. กรดบอริก (Boric acid) เข้มข้น ร้อยละ 2
7. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ร้อยละ 30
9. Mix indicator
10. คะตะลิสต์ผสม (catalyst mixture) ประกอบด้วย โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำร้อยละ 96 คอปเปอร์ซัลเฟต ร้อยละ 3.5 และเซเลเนียมไดออกไซด์ ร้อยละ 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียม Mix indicator

1. เตรียม โบรโมครีซอล กรีน (Bromocresol green) ร้อยละ 0.1 ในแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 และ เมทิล เรด (Methyl red) ร้อยละ 0.1 ในแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95

2. ผสม 10 มิลลิลิตร โบรโมครีซอล กรีน เมทิล เรด (Bromocresol green Methyl red) กับ 2 มิลลิลิตร เมทิลเรด (Methyl red)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 5 กรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ใส่ลงใน digestion tube

2. เติมคะตะลิสต์ ลงไป 2 กรัม เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 25 มิลลิลิตร และ boiling chips

3. นำ digestion tube มาใส่ใน digest unit ย่อยสลายโปรตีนจนได้สารละลายสีฟ้า

4. รอให้สารละลายสีฟ้าเย็น และหมดควันของไอกรดก่อน เติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร

5. ปิเปตกรดบอริก 20-25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร หยด mix indicator 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปวางใต้เครื่องกลั่นโดยให้ปลายของคอนเดนเซอร์ (condenser) จุ่มในสารละลาย

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

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

8. ทำแบลงค์ (ตั้งแต่ข้อ 1-8) โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

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

เปอร์เซ็นต์โปรตีน = (เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน)*6.25

เมื่อ A = มิลลิลิตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับแบลงค์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C = ความเข้มข้น (N) ของกรดไฮโดรคลอริก

D = 14

E = น้ำหนักของตัวอย่าง

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

วิธีการเตรียมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจาง

2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างแต่ละความเจือจางที่เหมาะสมใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วจานละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้ 3 ซ้ำ ในแต่ละระดับความเจือจาง

3. นำอาหารแข็ง MRS ไปหลอมให้ละลายแล้วทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร

4. เขย่าจานโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

5. นับโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีรวมทั้ง 3 เพลท แล้วหาค่าเฉลี่ยรายงานจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร โดยคูณค่าเฉลี่ยนั้นด้วยระดับความเจือจางที่ตรวจนับ

4. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC

4.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

คอลัมน์ : Inertsil C8-3

เฟสเคลื่อนที่ : กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์

อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ : 20 ไมโครลิตร

เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง : 30 นาที

เครื่องตรวจสอบ : เครื่อง UV visible ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ : ตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้มาจากส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงจากตัวอย่างที่เก็บเพื่อทำการวิเคราะห์ทุกชั่วโมง กรองส่วนใสผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนการวิเคราะห์กรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC

4.2 ขั้นตอนและวิธีการทำ

4.2.1 การเตรียมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์

4.2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแลกติก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแลกติกความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80, 100 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายมาตรฐานไปวัดปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาเขียนกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดแลกติกโดยคำนวณความเข้มข้นของกรดแลกติกเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร

4.3 ขั้นตอนการใช้เครื่อง HPLC

4.3.1 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

1. เปิดทุกยูนิตของเครื่อง HPLC
2. ยก Sinker ใส่ในขวดของเฟสเคลื่อนที่
3. เปิดวาล์ว Drain ของปั๊มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั๊ม
4. ให้สังเกตว่าในสายยางของ Sinker มีฟองอากาศอยู่หรือไม่ ถ้ายังมีอยู่ให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
5. เมื่อไม่มีฟองอากาศในสายยางของ Sinker แล้ว ให้รอจนกว่าปั๊มจะหยุดทำงานหรือกด Purge เพื่อให้ปั๊มหยุดทำงาน
6. ปิดวาล์ว Drainของปั๊ม
7. ตั้งค่าอัตราการไหล ค่าความดันสูงสุดและค่าความดันต่ำสุดที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับปั๊ม (ค่าความดันสูงสุดคือความดันที่คอลัมน์สามารถรับได้สูงสุด)
8. ตั้งพารามิเตอร์ให้กับเครื่องตรวจสอบ
9. สั่งปั๊มทำงานตามสภาวะที่ใช้วิเคราะห์

4.3.2 ขั้นตอนการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

1. ปิดปั๊ม HPLC
2. เทเฟสเคลื่อนที่ใหม่ลงในบีกเกอร์
3. เปิดวาล์ว Drain ของปั๊มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั๊ม
4. ยก Sinker ออกจากเฟสเคลื่อนที่เก่า แล้วจุ่มในบีกเกอร์ที่มีเฟสเคลื่อนที่ใหม่อยู่
5. รอจนปั๊มดูดเฟสเคลื่อนที่ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20-30 มิลลิลิตร
6. ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของ Sinker ด้วยกระดาษทิชชู่ที่สะอาดแล้วนำ Sinker จุ่มลงในเฟสเคลื่อนที่ใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ในระหว่างขั้นตอนที่ 1-6 ถ้าปั๊มหยุดทำงาน ให้กดปุ่ม Purge อีกครั้ง

8. ให้สังเกตว่าในสายยางของ Sinker มีฟองอากาศอยู่หรือไม่ ถ้ายังมีอยู่ให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด

9. เมื่อไม่มีฟองอากาศในสายยางของ Sinker แล้ว ให้รอจนกว่าปั๊มจะหยุดทำงานหรือกด Purge เพื่อให้ปั๊มหยุดทำงาน

10. ปิดวาล์ว Drainของปั๊มแล้วสั่งปั๊มทำงานตามสภาวะที่ใช้วิเคราะห์

4.3.3 ขั้นตอนการ Inject ตัวอย่าง

1. ตรวจดูสถานะของเครื่องแสดงผลให้อยู่ในสถานะ Ready

2. ตรวจดูให้แน่ใจว่าเครื่องตรวจสอบอยู่ในสถานะ Ready

3. รอจน Baseline ค่อนข้างนิ่ง

4. ถ้า Baseline นิ่งสูงกว่าศูนย์เล็กน้อยสามารถสั่งศูนย์อัตโนมัติโดยการกดปุ่ม Zero

5. ทำการฉีดตัวอย่าง

4.3.4 ตัวอย่างการฉีด HPLC

1. ล้างเข็มฉีดตัวอย่างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง

2. ล้างเข็มฉีดตัวอย่างด้วยตัวอย่างที่ต้องการจะฉีด 3 ครั้งแล้วดูดตัวอย่างโดยไม่ให้มีฟองอากาศ

3. แทงเข็มเข้าไปใน inject ให้สุดโดย injector ต้องอยู่ในตำแหน่ง Load

4. ฉีดตัวอย่างเข้าไปใน Sample loop ของ injector (ถ้าต้องการ fill sample ให้เต็ม loop ต้องฉีดตัวอย่างมากกว่าปริมาตรของ loop ประมาณ 5 เท่า)

5. เมื่อ HPLC system พร้อม ให้บิด injector มาที่ตำแหน่ง inject (กรณีไม่มี AUTO START ให้กดปุ่ม START ที่ C-R7

6. รอประมาณ 5-10 วินาที และดึงเข็มฉีดตัวอย่างออกจาก injector

7. ล้าง injector ด้วยน้ำกลั่น 5-10 มิลลิลิตร

4.4 ขั้นตอนการปิดเครื่อง

1. หลังจากฉีดตัวอย่างสุดท้ายเสร็จแล้ว ให้ Run เฟสเคลื่อนที่ต่ออีกประมาณ 30 นาที

2. สั่งปิดปั๊ม

3. ปิดเครื่อง HPLC แล้วยก Sinker ให้พ้นเฟสเคลื่อนที่

4.5 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

1. Run เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที

2. Run เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เก็บคอลัมน์ 30 นาที

3. ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : การเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้งานมาเป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้เก็บคอลัมภ์ ต้องระวังการผสมกันระหว่างเฟสเคลื่อนที่ทั้ง 2 ว่าสามารถผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันได้จึงต้องมีเฟสเคลื่อนที่คั่นกลางอย่างละ 30 นาที

การล้างใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที หรือน้อยกว่า ซึ่งขึ้นกับชนิดของคอลัมภ์

4.6 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)

1. Run เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run เฟสเคลื่อนที่ที่เก็บคอลัมภ์ 1 ชั่วโมง
3. หยุดปั๊มแล้วถอดคอลัมภ์ออกจากระบบ แล้วต่อ Pipe เปล่าแทนที่ และปิดคอลัมน์ด้วย plug ให้แน่น
4. เปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 แล้ว Run เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง
5. ปิดปั๊ม และปิดเครื่อง HPLC ทุกยูนิต
6. ยก Sinker ออกจากขวดเฟสเคลื่อนที่แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

4.7 ขั้นตอนการใช้งาน C-R7A

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

2. กด win 1 จะปรากฏหน้าจอ MENU ของ WIN1 เลือกข้อ 2 ตามด้วย ENTER จะปรากฏเลือก L เพื่อเรียก Analysis File ที่เคยสร้าง File เก็บไว้

E ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูก Load ขึ้นมาใช้งาน

R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่าใน Analysis File ที่ Load ขึ้นมาใช้งานอยู่

A ในกรณีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File กับทุกๆ ครั้งของการฉีด

วิธีการสร้าง Analysis File ใหม่

- เลือก E เพื่อปรากฏหน้าจอ Analysis File
- แก้ไขพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้

WIDTH	5
DRIFT (μV/min)	0
T.DBL (min)	1000

- กด EXIT เพื่อออกจากหน้าจอ จะปรากฏคำถาม

SAVE FILE?•YES•NO

- กด Y จะปรากฏ

Part	1:
File Name	2:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำหนด Drive และชื่อ Analysis File ตามที่ต้องการตรงตำแหน่ง File Name ตามด้วย Enter เช่น

Part	1:
File Name	2: ACID

หลังจากการ Save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN1

3. ตั้งชื่อ File สำหรับ Save ข้อมูลของ Chromatogram เลือกตามข้อ 3 ตามด้วย ENTER จะปรากฏ

Chromatogram Storage Mode [s:set R:reset C:Cancel latest A:auto]

เลือก S เมื่อต้องการที่จะตั้งชื่อ file สำหรับ Save จะปรากฏ

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

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

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

เลือก R เมื่อต้องการยกเลิกการตั้งชื่อข้างต้น

C ยกเลิกการ Save ของโครมาโตแกรมสุดท้าย

A เมื่อต้องการให้เครื่อง Save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

4. เลือกข้อ 1 จากหน้าจอ MENU ของ WIN1 จากนั้นรอจนสังเกตเห็นเส้น BASELINE ค่อนข้างเรียบจากนั้นทำการ Zero สัญญาณจาก Detector โดยกดปุ่ม ZERO สัญญาณจาก Detector จนกว่าจะสามารถ set 0 ที่ Detector ได้

5. ทำการ test slope ของสัญญาณที่ส่งมาโดยกด S ที่เครื่อง C-R7A เครื่องจะใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 10 เท่าของค่า Width ที่ตั้งไว้ใน Analysis File หลังจากการทดสอบ MENU ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ใน Analysis File

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. เมื่อ Base line นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณและให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START

ในกรณีที่เครื่อง C-R7A สามารถเชื่อมต่อ และควบคุมการทำงานของ HPLC จะได้สามารถขอดูค่าต่างๆ ของเครื่อง HPLC ผ่านเครื่อง C-R7A ได้จากหน้า MENU ของ WIN1 โดยเลือกข้อ 6: LC Monitor ตามด้วย ENTER



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การศึกษาหาปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

ตารางภาคผนวกที่ 1.1 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้จากการศึกษาปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารที่มีปริมาณยีสต์ออโตไลเสทที่แตกต่างกัน 3 สูตร โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
MM2	2	41.0850	
MM3	2	41.8500	
MM1	2		45.8850
Sig.		.509	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางภาคผนวกที่ 1.2 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำตาลที่เหลือที่ได้จากการศึกษาปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารที่มีปริมาณยีสต์ออโตไลเสทที่แตกต่างกัน 3 สูตร โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MM1	2	4.3400		
MM3	2		5.3750	
MM2	2			10.8500
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1.3 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณผลได้ที่ได้จากการศึกษาปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารที่มีปริมาณยีสต์ออโตไลเสทที่แตกต่างกัน 3 สูตร โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05
		1
MM2	2	1.0650
MM3	2	1.1150
MM1	2	1.2000
Sig.		.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางภาคผนวกที่ 1.4 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการผลิตการแลกติกที่ได้จากการศึกษาปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารที่มีปริมาณยีสต์ออโตไลเสทที่แตกต่างกัน 3 สูตร โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MM3	2	.3500		
MM1	2		.3850	
MM2	2			.4250
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1.5 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าความเป็นกรด – ด่างที่ได้จากการศึกษาปริมาณสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารที่มีปริมาณยีสต์ออโตไลเสทที่แตกต่างกัน 3 สูตร โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
MM1	2	3.8350	
MM3	2	3.8750	
MM2	2		3.9350
Sig.		.110	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

2. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

ตารางภาคผนวกที่ 2.1 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 4 สูตร โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MM5	2	28.9250		
SM	2		37.4500	
MM4	2			45.7150
MM1	2			45.8850
Sig.		1.000	1.000	.845

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2.2 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำตาลที่เหลือที่ได้จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 4 สูตร โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MM5	2	3.9750		
MM1	2	4.3400		
SM	2		20.4400	
MM4	2			38.6700
Sig.		.781	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางภาคผนวกที่ 2.3 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณผลได้ที่ได้จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 4 สูตร โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
MM5	2	.2400			
MM1	2		.3850		
SM	2			.4450	
MM4	2				.4750
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2.4 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการผลิตกรดแลกติกที่ได้จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 4 สูตรโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
MM5	2	.2400			
MM1	2		.3850		
SM	2			.4450	
MM4	2				.4750
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางภาคผนวกที่ 2.5 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าความเป็นกรด – ด่างที่ได้จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 4 สูตรโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Duncan[a]

trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
MM1	2	3.8350	
MM4	2		4.2700
SM	2		4.3200
MM5	2		4.3350
Sig.		1.000	.097

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้