

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยเชื้อ

Lactobacillus delbrueckii ATCC 33409

PRODUCTION OF LACTIC ACID FROM AGRICULTURAL
RESIDUES BY *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409



T117176



เลขที่ 117176
เลขทะเบียน 117176
วันเดือนปี 19 ก.ค. 2554

๖.....12342039.....
๗.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้นานใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงปีการศึกษา 2553 อิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**PRODUCTION OF LACTIC ACID FROM AGRICULTURAL
RESIDUES BY *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409**



**NITCHAPAT CHUENCHIT
NOPPHAMAS PHANUCHOTSATHIANCHAI
BENJAPORN KUNAKONVICHAYA**

**A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE**

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ACADEMIC YEAR 2010
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยเชื้อ

Lactobacillus delbrueckii ATCC 33409

Production of Lactic acid from Agricultural Residues by

Lactobacillus delbrueckii ATCC 33409

ชื่อนักศึกษา

นางสาวณิชชาภัทร ชื่นจิตร

นางสาวนพมาศ ภาณุโชติเสถียรชัย

นางสาวเบญจพร คุณากรวิชญ

ปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา

รศ.สุขใจ ชูจันทร์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา
จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2553

	คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ. ถินจง	สุขล้ำภู	ค.พ.จ.จ. สุริยพงษ์
ดร.สุทธจิต	ศรีวัชรกุล	สุทนต์ ศรีวัชรกุล
รศ. สุขใจ	ชูจันทร์	สุขใจ ชูจันทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ของคณะวิทยาศาสตร์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง การทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยเชื้อ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 33409
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณิชาภัทร ชื่นจิตร
	นางสาวนพมาศ ภาณุ โชติเสถียรชัย
	นางสาวเบญจพร คุณากรวิษญ
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 พบว่า แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกคือ กากน้ำตาล และ ยีสต์สกัด ตามลำดับ ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกประกอบด้วย กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร แกลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตร แหล่งแร่ธาตุซึ่งประกอบด้วยโคโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 และควบคุมค่าพีเอชโดยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 36.37 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 120 โดยมีผลได้ของการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.61 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดโดยใช้ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชที่ 6.5 พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 43.16 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 โดยมีผลได้ของการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.60 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.45 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

คำสำคัญ : กรดแลกติก, กากน้ำตาล, Yeast Autolysate, *Lactobacillus delbrueckii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Production of Lactic acid from Agricultural Residues by <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 33409
Students	Miss Nitchapat Chuenchit Miss Nopphamas Phanuchotsathianchai Miss Benjaporn Kunakonvichaya
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2010
Advisor	Assoc.Prof. Sukjai Choojun

ABSTRACT

Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 was studied. The optimum carbon source and nitrogen source was molasses and yeast extract, respectively. Thus, the optimal medium for lactic acid production was composed of molasses solution (40 g/l sugar concentration), 10 g/l yeast extract, 20 g/l CaCO₃ and mineral salt which contained K₂HPO₄, MnSO₄ and MgSO₄ (0.25, 0.03, 0.10 g/l, respectively). Lactic acid production in 2 liters flask at 37 °C, initial pH 6.5 and controlled pH by added 2 % CaCO₃. In flask, maximum lactic acid concentration was 36.37g/l at 120 hours, 1.61 g/g yield and 0.30 g/l/h productivity. While fermentation in 2 liters fermentor, maximum lactic acid concentration was 43.16 g/l at 96 hours, 1.60 g/g yield and 0.45 g/l/h productivity when incubated at 37°C, controlled pH 6.5 and agitation rate at 100 rpm.

Keywords : lactic acid, molasses, Yeast Autolysate, *Lactobacillus delbrueckii*

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต โดยสามารถสำเร็จได้ด้วยดี ด้วยความร่วมมือและการให้ความช่วยเหลือจาก รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ผศ. ถินจง สุขลำภู ประธานกรรมการ และ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแนะแนวทางการปฏิบัติงาน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการทำให้โครงการ มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำสั่งสอนตลอดจน เป็นที่ปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและ อำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ โรงงานน้ำตาล จังหวัดกาญจนบุรี สำหรับความอนุเคราะห์กากน้ำตาล เข้มข้นที่นำมาใช้ในการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมการศึกษา ตลอดจนการทำโครงการพิเศษนี้ และคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาตรีโทและเอกทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือ และคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา ตลอดจนผู้ที่มีได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงการ พิเศษฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

หากโครงการพิเศษฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่องคณะผู้จัดทำขออภัยไว้ทั้งหมด ส่วน คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากโครงการพิเศษฉบับนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ณิชาภัทร	ชินจิตร
นพมาศ	ภาณุ โชติเสถียรชัย
เบญจพร	คุณากรวิชญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	X
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ประวัติความเป็นมาของกรดแลกติก	3
2.2 คุณสมบัติของกรดแลกติก	3
2.2.1 คุณสมบัติทางเคมี	3
2.2.2 คุณสมบัติทางกายภาพ	3
2.3 กระบวนการผลิตกรดแลกติก	4
2.3.1 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี	4
2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางชีวภาพ	5
2.4 แบคทีเรียผลิตกรดแลกติก	6
2.4.1 แบคทีเรียผลิตกรดแลกติก	6
2.4.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา	8
2.5 การหมักกรดแลกติก	10
2.5.1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนต์เตตีฟ	10
2.5.2 การหมักแบบเฮเทอโอฟอร์เมนต์เตตีฟ	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก	13
2.6.1 แหล่งคาร์บอน	13
2.6.2 แหล่งไนโตรเจน	14
2.6.3 แหล่งแร่ธาตุ	18
2.6.4 อุณหภูมิ	19
2.6.5 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช)	19
2.6.6 การให้อากาศ	20
2.7 วัตถุประสงค์ปรากฏที่ใช้ในการทดลอง	20
2.7.1 กากน้ำตาล	20
2.8 การใช้ประโยชน์จากกรดแลกติก	23
2.8.1 การใช้ประโยชน์ด้านเภสัชกรรม	23
2.8.2 การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร	24
2.8.3 การใช้ประโยชน์ในเครื่องสำอาง	25
2.8.4 การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมไบโอพลาสติก	25
2.9 การผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม	29
2.9.1 วัตถุประสงค์	29
2.9.2 กระบวนการหมัก	29
2.9.3 ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและการทำให้บริสุทธิ์	30
2.9.4 การประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์	31
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	33
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	33
3.2 สารเคมี	34
3.3 วัตถุประสงค์	34
3.3.1 การเตรียมวัตถุดิบ	35
3.3.2 การเก็บวัตถุดิบ	35
3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ	35
3.4.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น	35
3.4.3 การเก็บรักษาเชื้อ	36
3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	36
3.5.1 อาหาร Pre-culture	36
3.5.2 อาหาร Yeast Malt medium (YM)	37
3.5.3 อาหาร Fermentation medium (FM)	37
3.5.4 อาหาร MRS	37
3.5.5 อาหารสังเคราะห์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ2 (SM)	38
3.5.6 อาหารชุดตัดแปลงที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ2	38
3.6 ศึกษาการผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์โดยใช้ยีสต์ 4 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนสูงสุด โดยเทคนิค Autolysis	39
3.7 ศึกษาการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลกติกในอาหารสังเคราะห์	40
3.8 ศึกษาปริมาณยีสต์ออกโตไลสที่ที่เหมาะสม เพื่อผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 33409	40
3.9 ศึกษาและเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก	40
3.10 ศึกษาศักยภาพของการผลิตกรดแลกติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร	41
3.10.1 การผลิตกรดแลกติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร	41
3.10.2 การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร	41
3.11 การวิเคราะห์ผล	41
3.11.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์	41
3.11.2 การวัดปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	42
3.11.3 การวัดปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	42
3.11.4 การวัดค่าความเป็นกรดต่าง (พีเอช)	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.11.5 การหาปริมาณผลได้ (%Yield) (กรัมกรดแลกติกต่อกรัมน้ำตาล ที่ใช้ไป) และอัตราการผลิตต่อชั่วโมง (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	42
3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ	42
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	43
4.1 ผลการศึกษาการผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์โดยใช้ยีสต์ 4 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกลายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนสูงสุด โดยเทคนิค Autolysis	43
4.2 ผลการศึกษาศึกษาปริมาณยีสต์ต่อโตนไลเอสที่เหมาะสม เพื่อผลิตกรดแลกติก โดยใช้ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 33409	48
4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก	51
4.4 ผลการศึกษาศึกษาสภาพของการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร	55
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	59
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก ก	66
ภาคผนวก ข	70
ภาคผนวก ค	84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก	4
2.2 การจัดจำแนกทางวิทยาศาสตร์ของ <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	9
2.3 ส่วนประกอบของ blackstrap molasses	21
2.4 แสดงส่วนประกอบโดยประมาณของ highest molasses	22
2.5 เกลือแลกเตดที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรม	23
2.6 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่มีอยู่ในตลาด	27
2.7 ระดับคุณภาพทางการค้า (commercial grade) ของกรดแลกติกและการนำไปใช้ประโยชน์	32
4.1 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาลและการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ <i>Candida utilis</i> TISTR 5001	43
4.2 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาลและการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ <i>Candida utilis</i> TISTR 5001	44
4.3 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาลและการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ <i>Candida utilis</i> TISTR 5046	44
4.4 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาลและการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ <i>Candida utilis</i> TISTR 5046	45
4.5 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาลและการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ Baker's Yeast	45
4.6 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาลและการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ Baker's Yeast	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.7	46
4.8	47
4.9	47
4.10	49
4.11	50
4.12	52
4.13	55
4.14	56

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

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

4.9 แสดงการเปรียบเทียบผลการศึกษาการผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 4 สายพันธุ์ ในอาหาร FM และ YM เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนสูงสุดโดยเทคนิค Autolysis

4.10 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นกรดแลกติก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดคัดแปลง 3 สูตร เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.11 แสดงการเปรียบเทียบผลได้ และอัตราการผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดคัดแปลง 3 สูตร เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.12 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นกรดแลกติก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดคัดแปลง 2 สูตร และอาหารสังเคราะห์

4.13 แสดงการเปรียบเทียบผลได้ และอัตราการผลิต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตร และอาหารสังเคราะห์

4.14 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณของกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ผลได้ อัตราการผลิต และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 โดยใช้วิธี T-test

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	3
2.2	9
2.3	11
2.4	12
2.5	25
2.6	26
2.7	31
4.1	48
4.2	49
3	50
4.3	52
4.4	53
4.5	57
4.6	57
4.7	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีการนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในด้านเภสัชกรรม อาหาร อุตสาหกรรมเคมี และเครื่องสำอาง โดยนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความเปรี้ยว (acidulant) สารกันบูดในอาหาร (preservative) และเป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) เช่น Poly - (Lactic Acid) หรือ PLA (Datta และคณะ, 1995) โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารนั้นกรดแลกติกถือได้ว่าเป็นมีความสำคัญอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นตัวช่วยเพิ่มกลิ่นและรสของอาหาร ช่วยควบคุมความเป็นกรดต่าง ยืดอายุการเก็บอาหารโดยช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และการงอกของสปอร์ ใช้เสริมประสิทธิภาพของสารป้องกันการหืน และช่วยปรับปรุงลักษณะของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เป็นต้น (ศิวาพร, 2546)

กรดแลกติกสามารถผลิตได้โดยใช้กระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ โดยการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการผลิตทางเคมีนั้นจะให้กรดแลกติกที่อยู่ในรูปผสม (DL-lactic acid) ทำให้มีความยุ่งยากในการทำให้บริสุทธิ์ และเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่การผลิตทางชีวภาพจะให้กรดแลกติกที่อยู่ในรูป D - lactic acid หรือ L - lactic acid โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิต (Altaf และคณะ, 2005) ซึ่งกระบวนการทางชีวภาพเป็นวิธีการผลิตที่นิยมมากกว่า เพราะจุลินทรีย์ชนิดโฮโมแลกติก (homolactic microorganisms) มีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกได้อย่างรวดเร็วและได้กรดแลกติกที่บริสุทธิ์อยู่ในรูปแบบของน้ำเชื่อม (syrup liquid) (Mossel, 1989; Ahmad และ Marth, 1989; Prescott และคณะ, 2008) นอกจากนี้การผลิตทางชีวภาพยังสามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่น เวย์ กากน้ำตาล แป้ง น้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีท และวัตถุดิบอื่นๆ ที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อลดต้นทุนในการผลิตได้

การนำวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรมาใช้ในการผลิตกรดแลกติกเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากการลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและลดต้นทุนในการผลิต เพราะมีราคาถูกหรือไม่มีมูลค่า (John และคณะ, 2006) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ กากน้ำตาล มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และนำยีสต์ออกโตไลเซทมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 และเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกระหว่างการผลิตจากแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจนราคาถูกเหล่านี้กับการผลิตโดยใช้อาหารสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษากระบวนการผลิตยีสต์ออโตไลสจากเชื้อยีสต์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409
2. เพื่อศึกษาปริมาณของสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสม เพื่อผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409
3. เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากเซลล์ยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409
4. เพื่อศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษานำเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 มาผลิตกรดแลกติกโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้สารสกัดจากเซลล์ยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูก ซึ่งจะต้องศึกษาชนิดของเซลล์ยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนสูง รวมทั้งศึกษาปริมาณของสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับการผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ ปริมาณกรดแลกติก ค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปก่อนและหลังการหมัก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต และลดปัญหาสิ่งแวดล้อม
2. ทราบถึงศักยภาพของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 เพื่อผลิตกรดแลกติก
3. สามารถนำมาเป็นแนวทางในการศึกษาและประยุกต์ใช้สำหรับการขยายขนาด การผลิตไปสู่ระดับอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตกรดแลกติกเชิงพาณิชย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

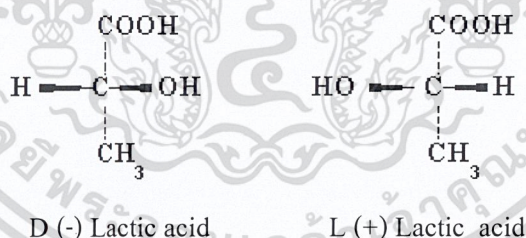
2.1 ประวัติความเป็นมาของกรดแลกติก

กรดแลกติกหรือกรดนมได้มีการค้นพบครั้งแรก โดย Scheele นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดน ในปี ค.ศ. 1780 ในนมเปรี้ยว และได้ตั้งชื่อว่า Mjolkksyra ซึ่งเป็นกรดชนิดแรกๆ ที่มีการนำมาใช้ในอาหาร พบตามธรรมชาติและนมเปรี้ยว กะหล่ำปลี ผักดองชนิดต่างๆ เบียร์และเนยแข็ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในเลือด และกล้ามเนื้อของสัตว์ด้วย (Gardner. 1972) ต่อมาในปี ค.ศ. 1881 ได้มีการผลิตกรดแลกติกในทางการค้าครั้งแรกที่เมือง Littleton รัฐ Massachusetts และในปี ค.ศ. 1980 สหรัฐอเมริกาและยุโรปผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมมากถึง 40,000 ตัน โดยการหมักแบบกะ (batch fermentation) และการสังเคราะห์ทางเคมี เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมอาหาร (Wee และคณะ, 2004)

2.2 คุณสมบัติของกรดแลกติก

2.2.1 คุณสมบัติทางเคมี

กรดแลกติกมีชื่อทางเคมีว่า 2 - hydroxypropanoic acid หรือ 2 - hydroxypropionic acid มีสูตรโมเลกุล คือ $C_3H_6O_3$ สูตรโครงสร้างอยู่ในรูป 2 ไอโซเมอร์ คือ D (-) Lactic และ L (+) Lactic ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของกรดแลกติก

ที่มา : www.lactospore.com/back.htm สืบค้นข้อมูลวันที่ 15 ตุลาคม 2553

2.2.2 คุณสมบัติทางกายภาพ

คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติกแสดงในตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

คุณสมบัติทางกายภาพ	กรดแลกติก
น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)	90.08
จุดหลอมเหลว (Melting point)	16.8 องศาเซลเซียส
จุดเดือด (Boiling point)	82 องศาเซลเซียส ที่ 0.5 มิลลิเมตรปรอท (mm.Hg) 122 องศาเซลเซียส ที่ 14 มิลลิเมตรปรอท (mm.Hg)
ค่าคงที่ของการแตกตัว (K_a ที่ 25 องศาเซลเซียส)	1.37×10^{-4}
ค่าความร้อนของการเผาไหม้ (ΔH_c)	1.361 กิโลจูลต่อโมล (KJ/mol)
ค่าความร้อนจำเพาะ (C_p ที่ 20 องศาเซลเซียส)	190 จูลต่อโมลต่อองศาเซลเซียส (J/mol/°C)

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

2.3 กระบวนการผลิตกรดแลกติก (Narayanan และคณะ , 2004)

การผลิตกรดแลกติกนั้นสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือวิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ

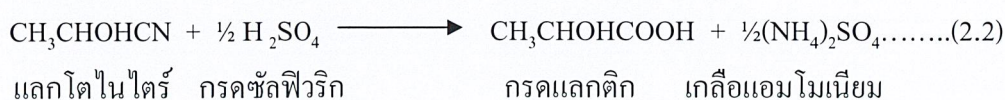
2.3.1 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี

การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี แบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 นำไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) ทำปฏิกิริยากับอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ได้แลคโตไนไตร์ (lactonitrile) ทำปฏิกิริยาที่ความดันบรรยากาศ ดังสมการที่ 2.1



ขั้นตอนที่ 2 นำแลคโตไนไตร์ มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) หรือกรดซัลฟิวริก (sulphuric acid) จะได้กรดแลกติก และเกลือแอมโมเนียม (ammonium salt) ซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง ดังสมการที่ 2.2



ขั้นตอนที่ 3 นำแลคติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ คือเมทิลแลคเตต (methyl lactate) นำเมทิลแลคเตตมากลั่นและย่อยจะได้กรดแลกติก ส่วนเมทานอลใช้

2.4 แบคทีเรียผลิตกรดแลกติก (Lactic Acid Bacteria ; LAB)

2.4.1 แบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

แบคทีเรียผลิตกรดแลกติก จัดอยู่ในแฟมิลีแลคโตบาซิลลาเซีย (Latobacillacea) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ไม่มีไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีออกซิเจน (aerotolerant) ทนต่อความเป็นกรด มีทั้งลักษณะรูปร่างกลมหรือท่อน (Salminen, 1998) ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน เช่น วิตามินต่างๆ กรดอะมิโน และไพริมิดีน สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในการหมักคาร์โบไฮเดรตได้พลังงานจากน้ำตาล อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2 - 53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30 - 40 องศาเซลเซียส ส่วนพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.58 - 6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่พีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (Salminen และ Wright, 1993)

การจัดสกุลต่างๆ เข้าสู่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกพิจารณาจากรูปร่างลักษณะ การหมักน้ำตาลกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ลักษณะกรดแลกติกที่สร้างความสามารถในการเจริญในบริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง การทนต่อความเป็นกรดและด่าง (Salminen และคณะ, 2004) ปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกออกได้เป็น 12 สกุล ได้แก่ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* ดังนี้

1. *Aerococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *Aerococcus viridans* และ *A. viridans* ทำให้กึ่งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในมนุษย์ (Stiles และ Holzapel, 1997)

2. *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือท่อนเรียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 0.7 ไมโครเมตร และยาว 1.1 - 3.0 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการจัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลกติกชนิด L (+) คาร์บอนไดออกไซด์ แอซีเทต และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส มีทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium piscicola*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. funditum* และ *C. alterfunditum* มีจีโนมของเชื้อในกลุ่มที่มี G + C เป็นองค์ประกอบประมาณ 31.6 - 37.2 เปอร์เซ็นต์

3. *Enterococcus* เซลล์มีรูปร่างวงรี จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้น ๆ จะผลิตกรดแลกติก ชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญสามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้ และบางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรค ปัจจุบันประกอบด้วย 5 ชนิด ได้แก่ *Enterococcus*

8. *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.36 - 1.43 ไมโครเมตร แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่สองในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์สี่เซลล์ติดกัน ในสภาวะไร้อากาศผลิตกรดแลกติกชนิด D และ L (+) จากการหมักกลูโคส บางชนิดทำให้เบียร์และไวน์เสีย ปัจจุบันประกอบด้วย 6 ชนิด ได้แก่ *Pediococcus acidilactici*, *P. damonosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* มีจีโนมของเชื้อในกลุ่มที่มี G + C เป็นองค์ประกอบประมาณ 34 - 44 เปอร์เซ็นต์

9. *Streptococcus* สกุลนี้มีรูปร่างกลมหรือรูปวงรี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 - 1.2 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญมีหลายชนิดเป็นปรสิตในคนและบางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญที่อุณหภูมิ 20 - 41 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 39 ชนิด มีจีโนมของเชื้อในกลุ่มที่มี G + C เป็นองค์ประกอบประมาณ 34 - 36 เปอร์เซ็นต์ (Hardie และ Whiley, 1995)

10. *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือนสกุล *Pediococcus* เนื่องจากเดิมคือ *Pediococcus halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม

11. *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียแลกติกที่เคลื่อนที่ได้ (ไม่ทุกสายพันธุ์) ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *Vagococcus flauvalis* ซึ่งเดิมอยู่ใน *streptococci* และ *V. samoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles และ Holzapfel, 1997)

12. *Weissella* รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลมซึ่งมีลักษณะคล้าย *Leuconostoc* ซึ่งเดิมอยู่ใน *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ประกอบด้วย 7 ชนิด ได้แก่ *Leuconostoc paramesenteroides* (*Weissella paramesenteroides*), *Lb. confuses* (*Weissella confuses*), *Lb. halotolerans* (*Weissella halotolerans*), *Lb. kandleri* (*Weissella kandleri*), *Lb. minor* (*Weissella minor*), *Lb. viridescens* (*Weissella viridescens*) และชนิดใหม่ที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica* (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.4.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้คือ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 สามารถจัดจำแนกทางวิทยาศาสตร์ (scientific classification) ได้ดังตารางที่ 2.2

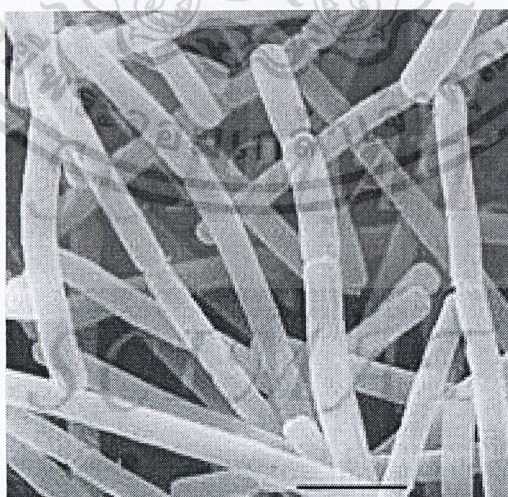
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 การจัดจำแนกทางวิทยาศาสตร์ของ *Lactobacillus delbrueckii*

Domain	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Class	<i>Bacilli</i>
Order	<i>Lactobacillales</i>
Family	<i>Lactobacillaceae</i>
Genus	<i>Lactobacillus</i>
Species	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>

ที่มา : Balows และคณะ (1991)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือ *Lactobacillus delbrueckii* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และจัดอยู่ในพวกแฟคัลเตทีฟ แอนแอโรบ (facultative anaerobe) ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างเป็นแท่ง โดยเซลล์มีขนาดประมาณ $0.5 - 0.8 \times 2.0 - 9.0$ ไมครอน *L. delbrueckii* เป็นแบคทีเรียที่ทนกรดสามารถผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลเฮกโซสได้ในรูปของ D-lactic acid โดยผ่านวิถีของเอมเดน - เมเยอร์ฮอฟ (Embden-Meyerhof pathway) (Salminen, 2004) ซึ่งมีการพบว่าเชื้อ *L. delbrueckii* มีสายพันธุ์ย่อย 3 สายพันธุ์ คือ *L. delbrueckii* subsp. *Delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, และ *L. delbrueckii* subsp. *Lactis* ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *L. delbrueckii* สามารถเจริญเติบโตภายใต้สภาวะในการหมักที่ใช้อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสได้ (Hui และ Khachatourians, 1995)



รูปที่ 2.2 ลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii*

ที่มา : http://www.magma.ca/~pavel/science/L_bulgaricus.htm สืบค้นข้อมูลวันที่ 15 ตุลาคม 2553
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การหมักกรดแลกติก (Lactic Acid Fermentation)

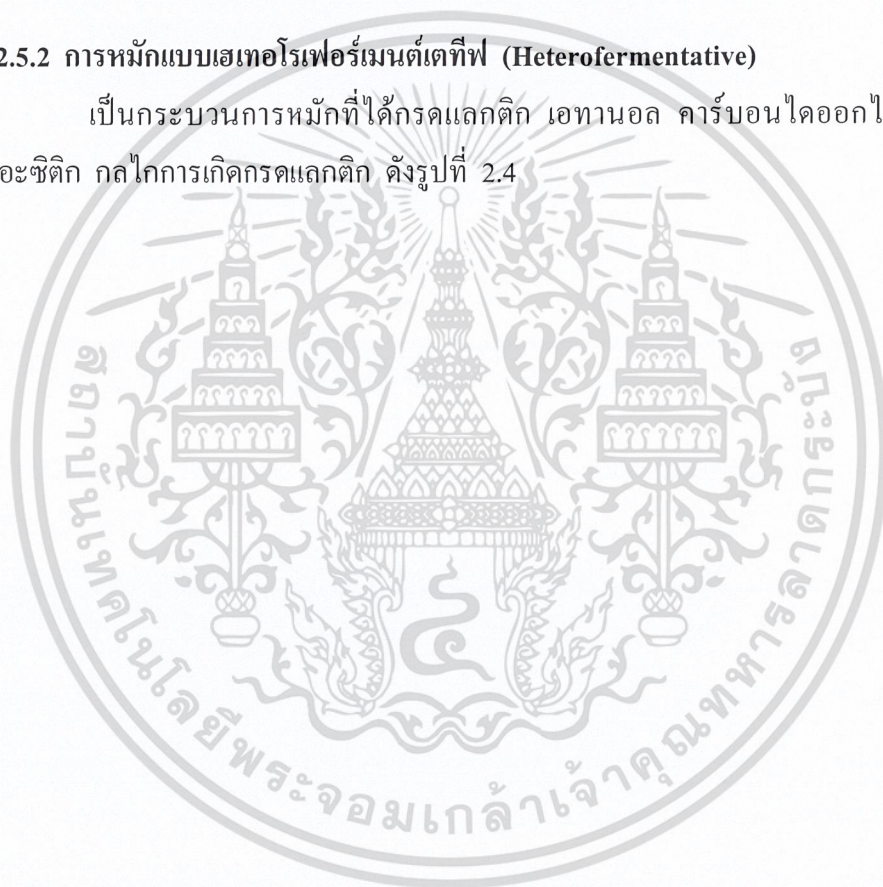
กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมักกลูโคสของแบคทีเรียพวกที่สร้างกรดแลกติก กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสมี 2 แบบ คือ

2.5.1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนต์เตทีฟ (Homofermentative)

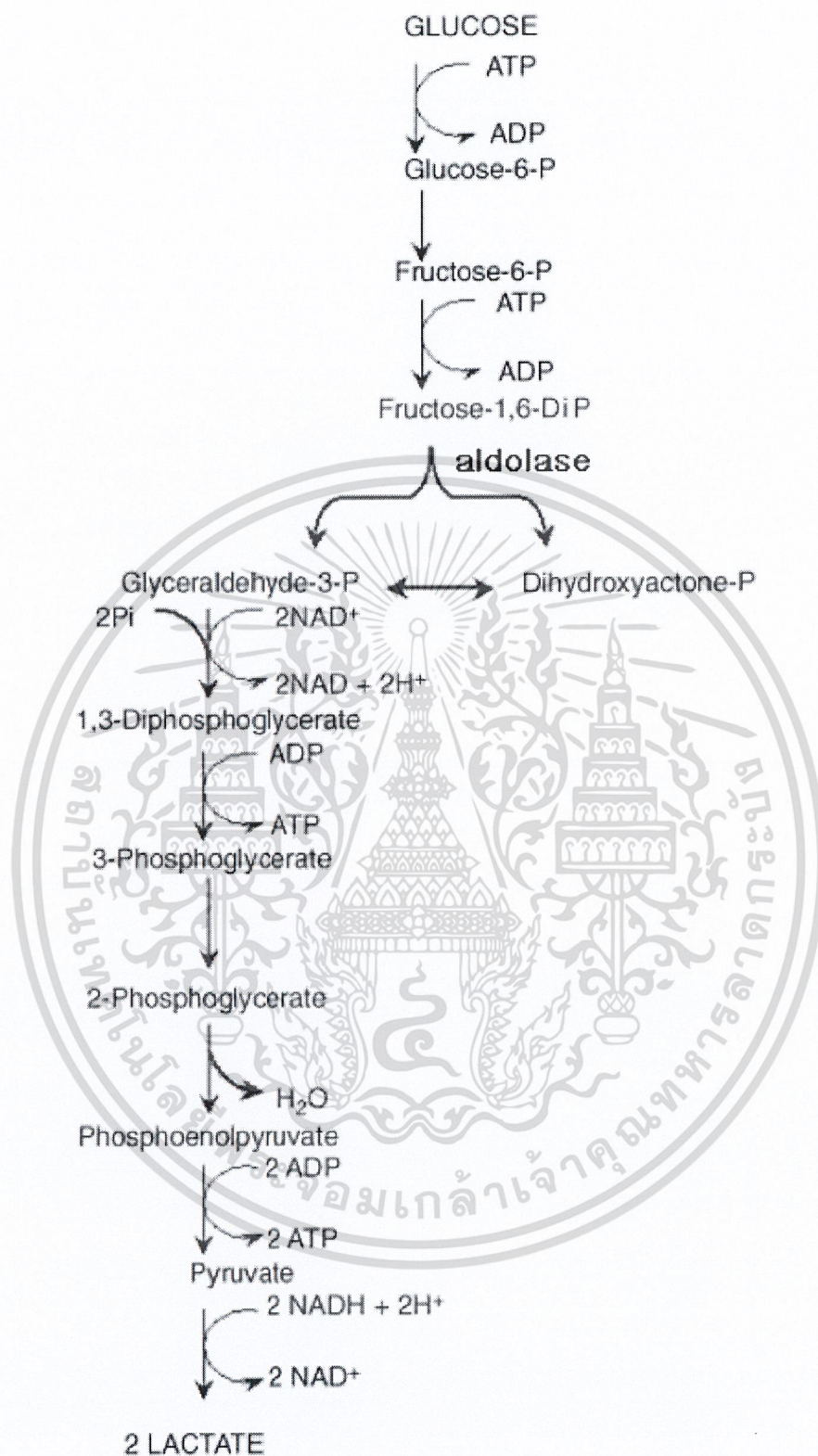
เป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ โดยกลไกการเกิดกรดแลกติก คือการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) โดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (Embden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway) หรือ EMP pathway แล้วเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแลกติก ดังรูปที่ 2.3

2.5.2 การหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนต์เตทีฟ (Heterofermentative)

เป็นกระบวนการหมักที่ได้กรดแลกติก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) หรือกรดอะซิติก กลไกการเกิดกรดแลกติก ดังรูปที่ 2.4



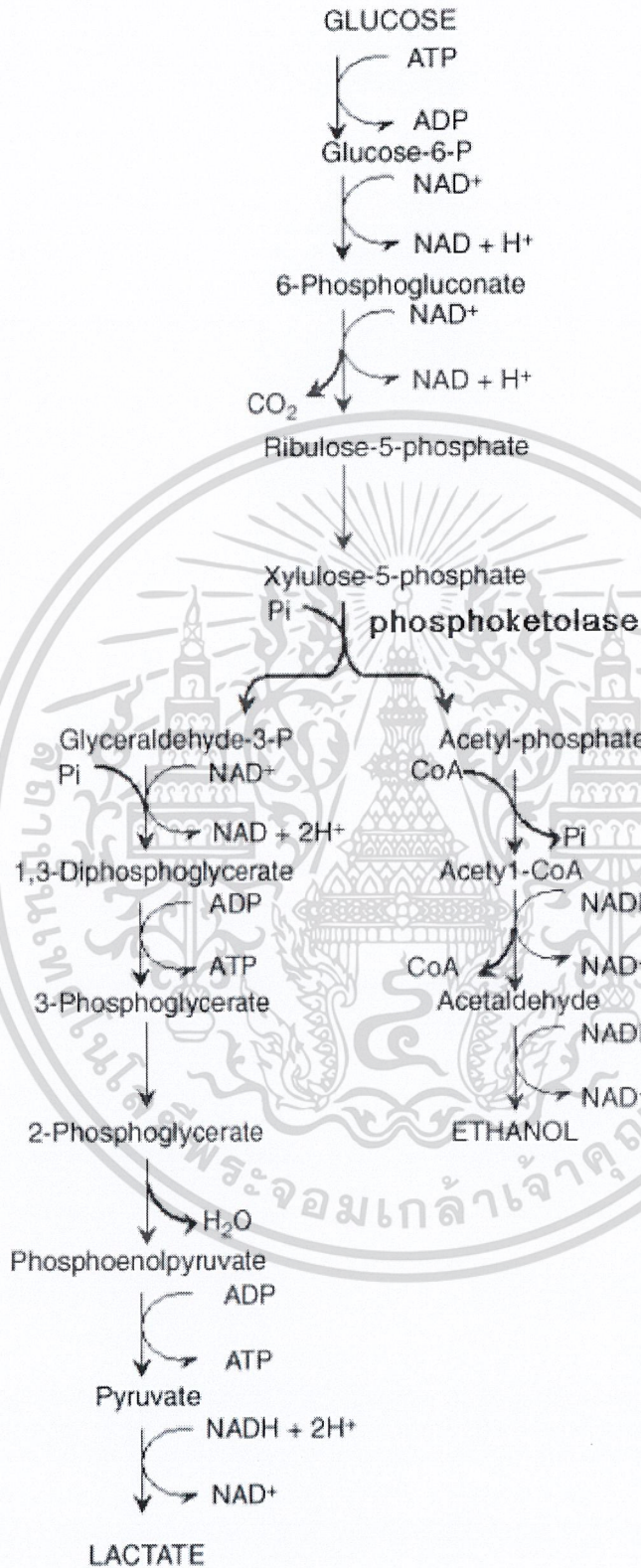
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 กระบวนการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (Homofermentative)

ที่มา : http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.html สืบค้นข้อมูลวันที่ 23 มีนาคม 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 กระบวนการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนต์เตทีฟ (Heterofermentative)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ที่มา : http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.html สืบค้นข้อมูลวันที่ 23 มีนาคม 2554
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ต่อไปนี้

2.6.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเป็นการลดต้นทุนในการผลิต และเป็นการใช้วัสดุเหลือทิ้งให้เกิดประโยชน์ ซึ่งมีหลากหลายชนิด ดังนี้

2.6.1.1 หางนม (whey) หรือเวย์เป็นแหล่งสับสเตรทที่นิยมใช้ในการผลิตกรดแลกติก เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็ง โดยทั่วไปใช้เป็นแหล่งอาหารสัตว์ สามารถย่อยสลายได้ทั้งโคสและกาแลกโตส จะต้องเติมสารอาหาร เช่น ยีสต์สกัด เปปโตน แป้งถั่ว นมผง หรือน้ำแช่ข้าวโพด เป็นต้น สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ผลิตกรดแลกติกจากเวย์ เช่น *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus*, *L. helveticus* และ *L. casei*

2.6.1.2 กากน้ำตาล (molass) เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำตาล ใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอทานอล เซลลิวโลส และกรดแลกติก น้ำตาลที่พบคือ ซูโครสที่มีความเข้มข้นสูง อาจทำให้สารละลายมีความหนืดสูง สายพันธุ์แบคทีเรียที่นิยมใช้ผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาลคือ *L. delbrueckii*

2.6.1.3 แป้ง (starch) เป็นสับสเตรทที่นิยมใช้ผลิตกรดแลกติก ได้จากธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด มันฝรั่ง ข้าว ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เลย์ แบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ เช่น *L. fermentum*, *L. amylophilus* บางครั้งอาจเติมเอนไซม์อะไมเลสลงไปเพื่อย่อยแป้งก่อน จากนั้นจึงเกิดการหมักโดยแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติก เช่น *L. casei*, *L. delbrueckii* และ *L. Lactis* เป็นต้น

2.6.1.4 ลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) แหล่งของลิกโนเซลลูโลส เช่น เศษกระดาษเหลือทิ้ง (waste paper) เศษไม้ (plant material) และไม้ เป็นต้น โดยลิกโนเซลลูโลสจะประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส กาแลกโตส แมนโนส และเพนโตส (น้ำตาลไซโลสและอะราบินโนส) ซึ่งจำเป็นต้องย่อยสลายก่อนเพื่อให้เกิดการหมัก (Hofvendahl และ Hagerdal, 2000)

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส แลคโตส กาแลกโตส ไซโลส มอลโตส ที่สามารถให้ปริมาณกรดที่สูงโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด

Takana และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกในรูป D - form จากรำข้าวซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้สูงถึง 9.2 กิโลกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wee และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ปริมาณต่าง ๆ ได้แก่ 50, 75, 100 และ 125 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ปริมาณน้ำตาล 125 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกจะใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนแหล่งของไนโตรเจนจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ โดยชนิดและความเข้มข้นของธาตุอาหารที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ซึ่งจะต้องปรับสภาวะให้เหมาะสมถึงจะได้ผลผลิตสูงขึ้น (สมใจ, 2544) แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญคือ ยีสต์สกัด

ยีสต์ออโตไลเซส (autolysate yeast) (ธีรวิฑู, 2544)

“ยีสต์” ตามคำดั้งเดิมของหลายๆ ภาษามีความหมายสัมพันธ์กับความสามารถในการหมัก เนื่องจากลักษณะที่มีฟองปูดขึ้น เพราะการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ยีสต์เป็นราที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยวๆ มีรูปร่างหลายแบบ คือ กลม รี ไข่ สามเหลี่ยม กระบอก เป็นเส้นสาย ฯลฯ เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศส่วนใหญ่โดยการแตกหน่อ (budding) มีน้อยชนิดที่เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์แบบฟิชชัน (fission) ยีสต์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้น การแพร่กระจายของยีสต์ในธรรมชาติอาจเกิดจากการลอยในอากาศ มีสัตว์เป็นพาหะ และกิจกรรมของมนุษย์ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้เริ่มจากการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งเรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 7000 ปีก่อนคริสต์ศักราช ต่อมามีการใช้ยีสต์ในการผลิตไวน์เมื่อ 3500 ปีก่อนคริสต์ศักราช และเมื่อ 2000 ปีก่อนคริสต์ศักราช มีรายงานว่าขนมปังที่ใช้ยีสต์ขึ้นฟูกว่าที่ไม่ใช่ออย่างชัดเจน จากนั้นไม่นานเทคโนโลยีการผลิตอาหารที่มียีสต์เป็นองค์ประกอบก็ได้แพร่หลายไปทั่วทุกมุมโลกจนถึงทุกวันนี้

ผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมที่ใช้ยีสต์ในการผลิตมาเป็นเวลานานแล้วนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ ดังนี้

- ผลิตภัณฑ์เครื่องคั้นแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี
- ผลิตภัณฑ์จากการหมัก เช่น เอทานอล และกลีเซอรอล
- ผลิตภัณฑ์ในรูปของเซลล์ยีสต์ เช่น ยีสต์ขนมปัง ยีสต์อาหารคน และยีสต์อาหารสัตว์
- ผลิตภัณฑ์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ เช่น วิตามิน (วิตามินบี อี) เอนไซม์ (อินเวอร์เทส แลกเทส ไลเปส และอาร์เอนเอ)

ปัจจุบันยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมที่มีการผลิตในปริมาณมากมีอยู่ 4 ชนิด คือ เบียร์ ไวน์ โปรตีนเซลล์เดี่ยว และยีสต์ขนมปัง นอกจากนี้ยังมีการใช้ยีสต์ผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิดไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีศักยภาพในอุตสาหกรรม ได้แก่ ลิปิด สารให้ความหวาน (ไซลิทอล) สารให้สีคาโรทีนอยด์ (บีตา-คาโรทีนอยด์และแอสตาแซนทิน) พอลิแซ็กคาไรด์ (พอสโไฟแมนแนน) กรดอะมิโน (แอล-ฟีนิลอะลานีน) และสารให้รสชาติ รวมทั้งสารต่างๆ สำหรับรักษาและดูแลสุขภาพ เช่น ยารักษาโรค วัคซีน ฮอร์โมน และโปรไบโอติก

การใช้ประโยชน์จากสารต่างๆ ที่ได้จากเซลล์ยีสต์มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมีความนิยมมากยิ่งขึ้น นอกเหนือจากการใช้ประโยชน์จากยีสต์เพียงแค่อีกกรรมในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น หลายคนคงจะนึกไม่ถึงว่ายีสต์ที่เรานำมาใช้ทำขนมปังหรือใช้ในการหมักเหล้า ไวน์ เบียร์ จะเป็นแหล่งสะสมสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงหลายชนิด เช่น โปรตีน วิตามิน และสารอาหารอื่นที่มีประโยชน์อีกมากมาย จึงมีการนำเซลล์ยีสต์มาใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น ทำอาหารสัตว์ อาหารเสริมสุขภาพ รวมทั้งการนำมาใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหาร ซึ่งมีใช้กันมานานแล้วในต่างประเทศ ยีสต์มีโปรตีนอยู่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นโปรตีนสมบูรณ์แบบที่มีอะมิโนแอซิดเกือบทุกชนิดในปริมาณที่สมดุลกัน มีวิตามินบีปริมาณมากอย่างไม่น่าเชื่อมีแร่ธาตุที่ร่างกายปริมาณน้อย เช่น ซีเลเนียม (selenium) โครเมียม (chromium) และอื่นๆ อีกมากมาย

ยีสต์มีโปรตีนซึ่งมีมากกว่าเนื้อสัตว์ที่มีน้ำหนักเท่าๆกัน ยีสต์มีวิตามินบีทุกชนิดคือ วิตามินบี 1 (thiamine) วิตามินบี 2 (riboflavin) วิตามินบี 3 (niacin) วิตามินบี 6 แพนโทธีนเนท (panthothendte) ฟอเลท (folate) โคลีน (choline) อินนอสซิทอล (Inorcital) และแม้กระทั่งวิตามินบี 12 เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสาลีซึ่งเป็นอาหารที่ให้วิตามินบีสูงอีกชนิดหนึ่งนั้น ยีสต์มีวิตามินบี 1 มากกว่าถึง 10 เท่า วิตามินบี 2 มากกว่า 8 เท่า และมีไนอาซินหรือบี 3 มากกว่า 10 เท่า ซึ่งทุกส่วนของร่างกาย เช่น โลหิต ข้อต่อต่างๆ ผิวหนัง กล้ามเนื้อ ประสาท ล้วนแต่ต้องการวิตามินบีทั้งสิ้น

นอกจากนี้ยีสต์ยังมีสารที่เรียกว่าโครเมียมอยู่ด้วย โครเมียมเป็นตัวประกอบที่สำคัญของสารอาหารที่เพิ่งค้นพบใหม่ ช่วยให้พลังงานในร่างกายคงที่อยู่เสมอ ไม่ทำให้รู้สึกเป็นลมหน้ามืด (เพราะขาดน้ำตาลในเลือด) หรือเกิดอาการหมดสติ แต่ยีสต์ซึ่งมีธาตุโครเมียมอยู่ด้วยจะช่วยปรับระดับน้ำตาลในเลือดได้ นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันไม่ให้คนเป็นโรคเบาหวานหรือช่วยรักษาคนเป็นโรคเบาหวานได้ ซึ่งมีผลการศึกษามากมาย เช่น

นักวิจัยได้ให้ยีสต์แก่คนเป็นโรคเบาหวาน 5 คน รับประทาน คนพวกนี้ต้องรับประทานยาลดระดับน้ำตาลในเลือดเป็นประจำ หลังจากที่รับประทานยีสต์แล้ว ทุกคนรับประทานยาลดระดับน้ำตาลในเลือดน้อยลง

คนสูงอายุ 12 คน มีความผิดปกติเกี่ยวกับระดับน้ำตาลในเลือด คือ เมื่อรับประทานน้ำตาลมากระดับน้ำตาลในเลือดจะสูงขึ้นมาก เมื่อคนพวกนี้รับประทานอาหารเสริมจากยีสต์ 6 คน หายเป็นปกติภายในเวลา 2 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต หากมีผู้พบเห็นเอกสารนี้โดยไม่ได้รับอนุญาต กรุณาแจ้งไปยังเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อให้หญิงชายวัย 20 - 25 รับประทานอาหารเสริมจากยีสต์ที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบทำให้การเผาผลาญน้ำตาลในเลือดมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

การที่ได้แร่ธาตุโครเมียมในอาหารที่รับประทานอย่างเพียงพอ นั้น อาจช่วยป้องกันโรคหัวใจได้อีกด้วย เพราะโครเมียมจะลดไขมันในเลือดที่จะไปอุดตัน และทำให้หัวใจหยุดเต้นได้ นักวิจัยยังพบว่าเมื่อเติมยีสต์ลงไป ในอาหารที่มีไขมันสูงให้หนูกิน ทำให้ระดับไขมันในเลือดของหนูลดลง เมื่อให้สตรีที่มีอาการโรคเบาหวาน 12 คนและสตรีที่มีสุขภาพดีอีก 15 คน รับประทานอาหารเสริมจากยีสต์เป็นเวลา 3 เดือน ทำให้ระดับไขมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด

ธาตุซีเลเนียม (Selenium; Se) มีอยู่มากในยีสต์ นักวิจัยพบว่าซีเลเนียมสามารถป้องกันมะเร็งได้ถึง 10 ชนิด รวมทั้งชนิดที่เป็นกันอย่างแพร่หลาย คือ มะเร็งเต้านม ปอด และลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุอื่นๆ ในยีสต์อีก เช่น เหล็ก แคลเซียม และโพแทสเซียม เซลล์ของยีสต์ยังมีสารบางชนิดที่สำคัญและนำมาใช้ประโยชน์ได้ในวงการอาหาร ซึ่งเมื่อมีการสกัดออกมาจากเซลล์ยีสต์และผ่านกระบวนการย่อยสลายที่สภาวะเหมาะสม จะได้เป็นผลิตภัณฑ์ปรุงแต่งกลิ่นรส ซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ โพลีเปปไทด์ โปรตีน ไกลโคเจน น้ำตาล วิตามิน ทรีฮาโลส กลีเซอรอล และสารให้กลิ่นรส กลิ่นรสของสารที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ ไม่ใช่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ไหนก็จะนำมาใช้ได้หมด สายพันธุ์ยีสต์ที่จะให้สารปรุงแต่งกลิ่นรสที่ดีมีคุณภาพ ได้แก่ ยีสต์ที่ใช้ทำขนมปังและใช้หมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ ส่วนสายพันธุ์อื่น เช่น ยีสต์ที่นิยมใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

การเกิดขึ้นของสารให้กลิ่นรสต่างๆเหล่านี้เป็นเรื่องที่มีความละเอียดซับซ้อนมาก บางอย่างก็ยากแก่การเข้าใจ อย่างไรก็ตามพอสรุปได้ว่าในผลิตภัณฑ์ยีสต์สกัดที่ใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหารจะประกอบด้วยสารที่ให้รสชาติที่เป็นอนินทรีย์ เช่น โซเดียม แมกนีเซียม คลอไรด์ ฟอสเฟต และซัลเฟต และสารอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะมิโน เปปไทด์ และพวกนิวคลีโอไทด์ต่างๆ สารที่ให้กลิ่น ได้แก่พวกกรดอินทรีย์ที่ระเหยง่ายต่างๆ เอสเทอร์ (ester) สารประกอบพวกฟีนอล (phenolic compound) ไพราซีน ไฮดรอกซิล (hydroxyl) คาร์บอนิล (carbonyl) และพวกเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic) ต่างๆ

ส่วนสารสีคาโรทีนอยด์พบว่า ณ ปัจจุบันการใช้ยีสต์ในการผลิตคาโรทีนอยด์ สะดวกกว่าการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากสามารถใช้สับสเตรทราคาถูก มีอัตราการเจริญสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง บีตา - คาโรทีนอยด์ ซึ่งเป็นรงควัตถุที่สำคัญ เนื่องจากมนุษย์และสัตว์ไม่สามารถสร้างได้เองต้องรับมาจากภายนอกเท่านั้น บีตา - คาโรทีนอยด์ มีประโยชน์ในการต่อต้านมะเร็งหลายชนิดและโรคอื่นๆ เนื่องจากเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ สารสำหรับสร้างวิตามินเอ ใช้เป็นสีธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสกัดสารจากเซลล์ยีสต์ สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. การสกัดหรือย่อยเซลล์ยีสต์ด้วยกรดแก่ (hydrolysis) ที่นิยมใช้ก็คือ กรดเกลือ (hydrochloric acid) ร่วมกับการใช้ความร้อนเพื่อย่อยผนังเซลล์ และสารโมเลกุลใหญ่ในเซลล์ยีสต์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก ให้เป็นสารโมเลกุลเล็กที่ละลายน้ำได้ โดยนำเซลล์ยีสต์สดหรือแห้งเติมกรดเกลือลงไป แล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ทำการย่อยจนปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดถูกเปลี่ยนไปเป็นอัลฟาอะมิโนไนโตรเจน (α - amino nitrogen) 50 - 60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำให้เป็นกลางด้วยด่างโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) แล้วกรองเอาตะกอนออก สารละลายที่ได้นำไปทำให้เข้มข้นขึ้น แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ยีสต์ไฮโดรไลเสท (hydrolysate yeast) สามารถเก็บไว้ปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารได้ดี

2. การสกัดด้วยสารเคมี (plasmolysis) เป็นการสกัดส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ยีสต์ด้วยเกลืออนินทรีย์หรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่น เกลือ น้ำตาล แอลกอฮอล์ อีเธอร์ (ether) คลอโรฟอร์ม (chloroform) และอะซิเตทอีเธอร์ (acetate ether) ที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งที่ภาวะนี้จะทำให้ยีสต์สูญเสียน้ำในเซลล์มากขึ้น ทำให้ผนังเซลล์ชั้นในแยกตัวออกจากผนังเซลล์ชั้นนอกและแตกออก สารอาหารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์จะไหลออกมา แล้วจึงแยกเอากากออกทำสารละลายที่ได้ให้เข้มข้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ยีสต์พลาสโมไลเสท (plasmolysate yeast) ซึ่งมักจะมีปริมาณเกลืออยู่สูง ทำให้มีขีดจำกัดในการใช้กับอาหาร

3. การสกัดด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์ยีสต์ (autolysis) จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า ยีสต์ออโตไลเสท (autolysate yeast) จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพที่ดีกว่า 2 วิธีแรก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีกลิ่นรสใกล้เคียงกับสารสกัดจากเนื้อสัตว์ (meat extract) ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมมากกว่าวิธีอื่น การย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์โดยปกติจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติอยู่แล้วเมื่อเซลล์มีอายุมาก เอนไซม์ในเซลล์จะย่อยสลายผนังเซลล์ และสารต่างๆ ที่มีอยู่ในเซลล์ แต่เป็นการย่อยแบบค่อยเป็นค่อยไป ซึ่งต่างจากวิธีการนี้ที่จะเป็นการเร่งเซลล์ยีสต์ให้เกิดการย่อยตัวเองอย่างรวดเร็ว และเกิดในปริมาณมากด้วยการปรับสภาวะต่างๆ ทำให้สารประกอบเหล่านั้นออกมาภายนอกได้อย่างอิสระ การย่อยสลายเซลล์ยีสต์วิธีนี้ ทำได้โดยนำเซลล์ยีสต์ที่ยังมีชีวิตอยู่มาทำเป็นสารแขวนลอย ปรับค่าพีเอช (pH) เป็น 5.5 แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 - 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 36 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้อัลฟาอะมิโนไนโตรเจน 50 - 60 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้สารละลายเย็นลง แล้วกรองหรือเหวี่ยงแยกเอากากผนังเซลล์ออก ก่อนนำไปพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80 - 90 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยน้ำออกบางส่วน แล้วทำให้แห้ง

ในการย่อยตัวเองของเซลล์ยีสต์ บางครั้งมีการเติมเอนไซม์จากแหล่งอื่นลงไป เพื่อให้ได้ผลผลิตปริมาณมากและคุณภาพของกลิ่นรสดี ใช้เวลาสั้น หรือไม่ก็อาจมีการใช้เทคนิค

ทางกายภาพช่วยให้ผนังเซลล์แตกออก ทำให้เอนไซม์ย่อยสารได้เร็วขึ้น เช่น ใช้ความดัน ความถี่สูง หรือการตีปั่นให้เซลล์แตก และใช้การแช่แข็งสลับกับการละลาย เป็นต้น

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทรีปติซอย ยูเรีย เปปโตน และเคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัม พบว่า ปริมาณกรดแลกติกจะสูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

Ogumbanwo และ Okanlawon (2009) ได้ทำการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก โดยไฮโมแลกติกแบคทีเรียพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของยีสต์สกัดให้ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตสูงที่สุด ตามมาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเคซีน ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลผลิตกรดแลกติกต่ำ เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุด (18.4 ± 0.01 กรัมต่อลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ผลิตกรดแลกติกได้ 0.09 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ในยูเรียที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Plessas และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้หางนมเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้เชื้อผสมของ *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* และ *Lactobacillus helveticus* พบว่าการใช้เชื้อผสมสามารถช่วยเพิ่มการผลิตกรดแลกติกได้

2.6.3 แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างกรดแลกติก ได้แก่ เกลืออนินทรีย์ของธาตุโพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และแมงกานีส เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีโคบอลต์ ทองแดง เหล็ก และสังกะสี โดยทั่วไปมักจะพบแร่ธาตุเหล่านี้เจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการเลี้ยงเชื้อ (สมใจ, 2544)

Nancib และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทรีปติซอย ยูเรีย เปปโตน และเคซีนไฮโดรไลเสท ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัมโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงเมื่อมีการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งและเศษอาหารที่เหลือทิ้งจากโรงงานอาหาร โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* 18011 พบว่า เมื่อเติมแมงกานีสลงไปปริมาณกรดแลกติกจะได้สูงกว่าเมื่อไม่เติมแมงกานีส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Xu และคณะ (2007) ศึกษาผลของแหล่งวิตามิน (บี1, บี2, บี5 และบี6) สำหรับผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401 พบว่าการเติมวิตามินลงไปในการหมักอาหารสำหรับการผลิตกรดนั้นจะมีผลทำให้ปริมาณกรดที่ได้สูงกว่าการหมักโดยไม่มีการเติมวิตามิน

2.6.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิจะขึ้นกับชนิดของเชื้อที่ใช้และสภาวะอื่นๆ ของกระบวนการหมัก แต่โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 30 - 40 องศาเซลเซียส (สมใจ, 2544)

Idris และ Suzuna (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรด โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาอุณหภูมิที่ระดับ 27, 30, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีที่สุด

John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีที่สุด

Takaaki Tanaka และคณะ (2006) ศึกษาการผลิต D (-) lactic acid จากรำข้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมันโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง และเชื้อที่ใช้ในการศึกษาคือ *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* IFO 3202 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.6.5 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช)

การควบคุมพีเอชให้เหมาะสมในการหมัก จะทำให้การสร้างกรดนั้นเป็นไปได้ดีขึ้น โดยทั่วไปพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกอยู่ในช่วง 5 - 6 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ การควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่ละลายน้ำ ถ้าพีเอชลดลง คาร์บอเนตจะสลายตัวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชคงที่ หรืออาจควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการเติมกรดหรือด่าง เช่น กรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์

Idris และ Suzuna (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรดโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 การใช้น้ำตาลจะเร็ว และให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง

John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่สัญญาที่เห็นชอบหรือเห็นการดำเนินการค้า
ไม่หวังผลกำไร หากมีข้อผิดพลาดประการใดขออภัยเป็นอย่างสูง และต้องอภัยถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mussatto และคณะ (2008) ศึกษาอิทธิพลของอาหารเสริม และพีเอชในการผลิตกรดแลกติกจากกากเบียร์แห้ง (brewer's spent grain) โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.0 จะให้ผลผลิตกรดแลกติกปริมาณสูงสุด คือ 35.54 กรัมต่อลิตร

Ogumbanwo และ Okanlawon (2009) ได้ทำการศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก โดยไฮโมแลกติกแบคทีเรียพบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นที่ดีที่สุดของการผลิตกรดแลกติกคือ 5.5 เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณสูงสุด (7.5 ± 0.03 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่ *Lactobacillus casei* ผลิตได้น้อยที่สุด (3.0 ± 0.02 กรัมต่อลิตร)

2.6.6 การให้อากาศ

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

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

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

2.7 วัตถุดิบราคาถูกที่ใช้ในการทดลอง

2.7.1 กากน้ำตาล (สันทัด, 2544)

กากน้ำตาลเป็นของเหลวที่มีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลดำ ที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย เนื่องจากกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยนั้น เริ่มจากการนำอ้อยเข้าหีบได้น้ำอ้อย กรองเอากากออกจากราน้ำอ้อยแล้วเคี้ยว น้ำอ้อยจนได้ผลึกของน้ำตาลทราย ตกตะกอนออกมา แยกผลึกน้ำตาลทรายด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ผลพลอยได้ที่สำคัญจากการผลิตน้ำตาลทรายด้วยวิธีนี้ได้แก่ กากน้ำตาล ชี้ตะกอน (filter cake) และชานอ้อย (bagasses) กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ที่มีคุณค่ามากที่สุด เป็นส่วนของของเหลวที่เหลือหลังจากการแยกเอาผลึกของน้ำตาลออกแล้วมีลักษณะเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้ม องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ตกผลึก ในการผลิตน้ำตาลทรายนั่นจะมีกากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้เกิดขึ้นประมาณร้อยละ 4 ถึง 6 ของปริมาณอ้อยที่ใช้ในการผลิต กากน้ำตาลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
กรรมวิธีการในการผลิตน้ำตาลทราย คือ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากไม่ให้เกิดเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว (plantation white sugar) ซึ่งเราเรียกว่า blackstrap molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 50 - 60 ตารางที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบของ blackstrap molasses

2. กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (refine sugar) ซึ่งเราเรียกว่า refinery molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 48

3. กากน้ำตาลที่ได้จากการทำบางส่วนของน้ำอ้อยแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหย (inverted can juice) ซึ่งเราเรียกว่า invert molasses หรือ highest molasses วิธีนี้เป็นการผลิตกากน้ำตาลโดยตรง ตารางที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบโดยประมาณของ highest molasses

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบของ blackstrap molasses

ส่วนประกอบ	กากน้ำตาลอ้อย (ร้อยละ)
ของแข็งแห้ง	5 - 83
ซูโครส	32 - 45
กลูโคส	5 - 11
ฟรุกโทส	6 - 15
น้ำตาลทั้งหมด (ซูโครส + น้ำตาลรีดิวิซ์)	52 - 65
สารอินทรีย์ที่ไม่ใช่ซูโครส	
- มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ	5
- ไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ	10
เถ้า	7 - 11
ไนโตรเจนทั้งหมด	0.4 - 1.5
ฟิเอช	4.5 - 6

ที่มา : Roehr (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบโดยประมาณของ highest molasses

ส่วนประกอบ	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (ร้อยละ)
ของแข็ง	80 - 85
ซูโครส	15 - 35
น้ำตาลรีดิวิซ์	50 - 65
น้ำตาลอินเวิร์ท	40 - 60
น้ำตาลอินเวิร์ททั้งหมด	75 - 80
สารอินทรีย์ที่ไม่ใช่ซูโครส	4 - 8
เถ้า	2 - 3
โพแทสเซียมออกไซด์ (K_2O)	0.7 - 1.4
แคลเซียมออกไซด์ (CaO)	0.03 - 0.3
แมกนีเซียมออกไซด์ (MgO)	0.01 - 0.03
ไดฟอสฟอรัสเพนตะออกไซด์ (P_2O_5)	0.2 - 0.6
ฟิเชซ	5 - 6

ที่มา : Roehr (1996)

ประโยชน์ที่ได้จากกากน้ำตาลมีมากมาย เนื่องจากในกากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลประมาณร้อยละ 50 - 60 และแร่ธาตุต่าง ๆ ประโยชน์ที่เห็นได้โดยตรง เช่น ใช้เป็นอาหารสัตว์ เนื่องจากกากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ซึ่งเป็นแหล่งอาหารพลังงานที่เหมาะสมและราคาไม่แพง จึงมีการใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์หลายชนิด ใช้เป็นปุ๋ย เพราะในกากน้ำตาลมีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับพืช นอกจากนี้กากน้ำตาลยังใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการหมักหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ สุรา กรดมะนาว กรดน้ำส้ม กรดแลกติก ผงชูรส ยีสต์ขนมปัง และยีสต์อาหารสัตว์ เนื่องจากกากน้ำตาลมีราคาถูกและเหมาะสมกว่า เมื่อเทียบกับวัตถุดิบชนิดอื่น ๆ และมีการนำมาใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ เช่น

Bae และ Shoda (2004) ศึกษาการผลิต Bacterial cellulose จากกากน้ำตาลที่ผ่านการทรีทโดยใช้กรดซัลฟิวริก ทำให้ได้ความเข้มข้นของ Bacterial cellulose สูงถึงร้อยละ 76 ซึ่งมากกว่าการใช้กากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการทรีท

Dumbrepatil และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาลโดยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่สงวนลิขสิทธิ์ในใจประโยชน์ใด ๆ การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กากน้ำตาลความเข้มข้นสูงถึง 190 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 166 กรัมต่อลิตร และมี อัตราการผลิต (productivity) เป็น 4.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

He และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตเออโกสเตอรอล (ergosterol) จากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีการตัดแปลงทางพันธุกรรม พบว่า มีการผลิตเออโกสเตอรอล 52.6 มิลลิกรัมต่อกรัม จากการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร มีระยะเวลาหมัก 30 ชั่วโมง โดยเลี้ยงในระดับฟลาสก์ที่มีการเขย่า

Tokiwa (2007) ศึกษาการผลิต D-lactic acid จากกากน้ำตาล น้ำอ้อย และน้ำจากหัวบีท โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ในสภาวะการหมักแบบกะ (batch) ที่พีเอช 6.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ผลผลิตของกรดแลกติกจากสารตั้งต้นคือกากน้ำตาล น้ำอ้อย และน้ำจากหัวบีท เป็น 107 กรัมต่อลิตร , 120 กรัมต่อลิตร และ 84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการผลิต L - lactic acid จากกากน้ำตาลโดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* ในสภาวะการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อมีสภาวะการหมัก คือมีพีเอชเป็น 7.0 จะผลิตกรดแลกติกได้ 95.7 กรัมต่อลิตร มีผลได้ร้อยละ 94.9 และอัตราการผลิตเป็น 4.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.8 การใช้ประโยชน์จากกรดแลกติก

2.8.1 การใช้ประโยชน์ด้านเภสัชกรรม

แคลเซียมแลคเตตใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมสำหรับผู้ป่วยที่ขาดแคลเซียม โดยอาจเสริมในนม หรือน้ำผลไม้หรืออาหารอื่น หรือจะบริโภคในรูปแคลเซียมแลคเตตเลย โดยอาจเสริมด้วยเฟอร์รัสแลคเตต ซิงค์แลคเตต และแมกนีเซียมแลคเตต (Dailey และคณะ, 2000) ตารางที่ 2.5 แสดงแหล่งของแร่ธาตุที่อยู่ในรูปของเกลือแลคเตต ซึ่งมีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรมเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ

ตารางที่ 2.5 เกลือแลคเตตที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรม

แร่ธาตุ	ใช้รักษาอาการ	ข้อดี
แคลเซียมแลคเตต	- กระดูกเปราะ - ความดันโลหิตสูง - การหดตัวของกล้ามเนื้อ - ฟันผุ - มะเร็งลำไส้	- มีกลิ่นรสเป็นกลาง - มีความสามารถในการละลายสูง - มีประสิทธิภาพในการรักษา - ใช้เวลาในการละลายสั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 (ต่อ) เกลือแลกเตดที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรม

แร่ธาตุ	ใช้รักษาอาการ	ข้อดี
เฟอร์รัสแลกเตด	- โรคลโลหิตจาง - ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง - ลดการเต้นของหัวใจ โดยเฉพาะในทารก	- มีประสิทธิภาพในการรักษา - มีสีอ่อน - มีความคงทน - มีความคงตัว เกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันได้ยาก
แมกนีเซียมแลกเตด	- ความดันโลหิตสูง - อาการเครียด - กล้ามเนื้ออ่อนแรง	- มีกลิ่นรสเป็นกลาง - มีประสิทธิภาพในการรักษา - มีความสามารถในการละลายสูง
แมงกานีสแลกเตด	- การเจริญเติบโตล่าช้า - แพ้กลูโคส	- มีความคงทนดี - มีกลิ่นรสเป็นกลาง
ซิงค์แลกเตด	- การเจริญเติบโตล่าช้า - ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง - ความผิดปกติของผิวหนัง - หายใจไม่สะดวก	- มีกลิ่นรสเป็นกลาง - มีความสามารถในการละลายสูง

ที่มา : www.purac.com/ufc/file2/purac_sites/lovettj/ff7c0790d03d748c0375fc1d764111b6/pu/pharmaceutical.pdf สืบค้นข้อมูลวันที่ 15 ตุลาคม 2553

2.8.2 การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร

มีการประยุกต์ใช้กรดแลกติกในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวาง ซึ่งกรดแลกติกจะทำหน้าที่เป็นสารควบคุมความเป็นกรดต่างหรือใช้เป็นสารกันบูด นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอีกด้วย ตัวอย่างอาหารที่มีการนำกรดแลกติกมาใช้ เช่น

- ใช้เป็นสารควบคุมความเป็นกรดต่างในเครื่องดื่ม เช่น น้ำอัดลมและน้ำผลไม้
- เป็นส่วนผสมของลูกอม และหมากฝรั่ง ให้กลิ่นรสที่เป็นรสของกรดอ่อน
- ใช้ในรูปของไซเตียมหรือโพแทสเซียมแลกเตด ช่วยยืดอายุการเก็บของอาหาร

พวกปลา เนื้อ และสัตว์ปีก (www.purac.com สืบค้นข้อมูลวันที่ 15 ตุลาคม 2553)

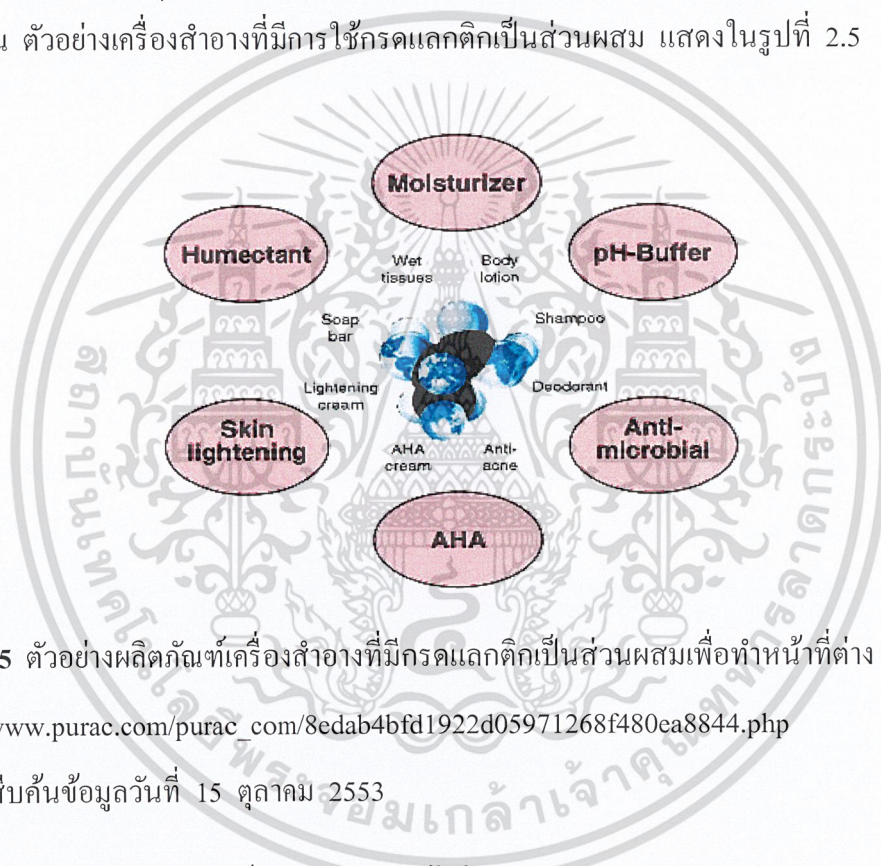
- ใช้แคลเซียมแลกเตดในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพกติน ทำให้ผักและผลไม้มีความคงตัวมากขึ้น ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสีและกลิ่นรสของผักและผลไม้ในระหว่างกระบวนการแปรรูปโดยการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะ

ที่ป็นเป็อนมา (Hansen, 1951) การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เป็นกรดที่พบใน sourdough ทำให้ขนมปังมีกลิ่นรสเฉพาะตัว นอกจากนี้ อนุพันธ์ของกรดแลกติก เช่น แลคทีเลต โมโนและไดกลีเซอไรด์ของกรดไขมัน (lactylated mono - and diglyceride of fatty acid) มีการนิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ โดยเฉพาะแป้งเค้กสำเร็จรูปและเนยขาว เป็นต้น ส่วนแคลเซียมสเตียริล - 2 - แลคทีเลต (calcium stearyl - 2 - lactylate) นิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมปัง (FDA, 1988)

2.8.3 การใช้ประโยชน์ในเครื่องสำอาง

มีการใช้กรดแลกติกเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพื่อใช้เป็นสารให้ความชุ่มชื้น สารควบคุมความเป็นกรดต่าง สารต้านจุลินทรีย์ และสารเพิ่มความกระจ่างใสให้กับผิวพรรณ ตัวอย่างเครื่องสำอางที่มีการใช้กรดแลกติกเป็นส่วนผสม แสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีการใช้กรดแลกติกเป็นส่วนผสมเพื่อทำหน้าที่ต่าง ๆ

ที่มา : www.purac.com/purac_com/8edab4bfd1922d05971268f480ea8844.php

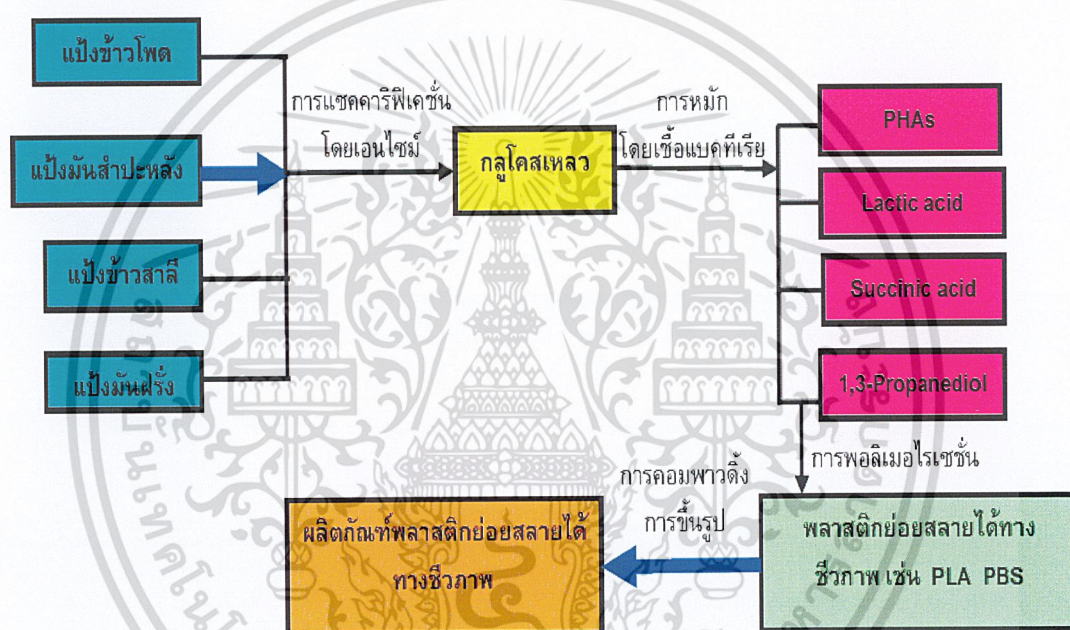
สืบค้นข้อมูลวันที่ 15 ตุลาคม 2553

2.8.4 การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมไบโอพลาสติก

กรดแลกติกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สำหรับเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากวัตถุดิบมวลชีวภาพนั้น ดังแสดงในรูปที่ 2.6 ซึ่งเริ่มจากมันสำปะหลังถูกแปรรูปเป็นแป้งมันสำปะหลัง และนำไปผ่านกระบวนการแซ็กคาริฟิเคชัน (saccharification) โดยเอนไซม์ได้กลูโคสเหลว จากนั้นนำกลูโคสเหลวที่ได้ไปหมักโดยเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราจะได้กรดแลกติก และเมื่อนำกรดแลกติกไปพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) จะได้ PLA ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เอกสารพอลิเมอร์เหล่านี้จะถูกนำไปผ่านกระบวนการคอมพาวด์ดิ้ง (compounding) ไปใส่สารเติมแต่งเพื่อไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับปรุงสมบัติให้ดีขึ้น และนำไปผ่านกระบวนการสุดท้ายคือการขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์รูปร่างต่าง ๆ ตามการใช้งาน

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลายประเภท เช่นเดียวกับพลาสติกจากปิโตรเคมี ผลิตภัณฑ์จากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพส่วนใหญ่ถูกใช้ในงานที่เน้นคุณสมบัติการย่อยสลายได้ เช่น ถุงขยะสำหรับเก็บใบไม้ แผ่นฟิล์มเพื่อการเกษตร กระถางต้นไม้ การใช้งานด้านบรรจุภัณฑ์ (สำนักงานคณะกรรมการ พัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, 2552) ตารางที่ 2.6 แสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ








รูปที่ 2.6 กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกย่อยสลายได้จากวัตถุดิบมวลชีวภาพ

ที่มา : สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ (2552)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่มีอยู่ในตลาด

ผลิตภัณฑ์บรรจุหีบห่อ	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์	 ถุงใส่ขนมปังเพื่อรักษาความสดใหม่ให้นานขึ้น Innova Films®	 ฟิล์มหุ้มให้อากาศผ่านได้และถาดใส่ผัก EB®	 ถุงให้อากาศผ่านได้สำหรับห่อผัก Natura®
	การใช้งาน	แผ่นพอยล์ แผ่นฟิล์ม หรือโฟมที่กึ่งวงตรงกลางสำหรับกันกระแทก ขวด ถาด พลาสติกกันกระแทก ตาข่าย ถุงกระสอบ ถุง		
จุดอ่อน/จุดแข็ง	บรรจุภัณฑ์อาหารที่ปนเปื้อนทางชีวภาพนั้นยากที่จะนำผ่านกระบวนการกลับมาใช้ใหม่ จึงเป็นการใช้งานระยะสั้นเท่านั้น / ไม่ต้องคำนึงถึงปริมาณการทิ้งเนื่องจากสามารถย่อยสลายได้			
ภาชนะใส่อาหารแบบใช้แล้วทิ้ง	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์	 ถ้วยสำหรับใส่อาหาร NatureWorks®	 ถ้วยย่อยสลายได้ที่งานประชุมเยาวชนผู้บังคับบัญชาพลโลก ปี ค.ศ. 2005 เมืองโคโลญ Novamont®	
	การใช้งาน	ช้อน มีด ส้อมที่ใช้ครั้งเดียวทิ้งสามารถถูกย่อยเป็นปุ๋ยได้หลังจากใช้แล้ว Pacovis®	ถ้วยที่ทำจากแป้งที่ผ่านการเคลือบสำหรับใส่เครื่องดื่มร้อนและเย็น Huhtamaki®	
จุดอ่อน/จุดแข็ง	การพัฒนาสมบัติทางกายภาพและทางกลให้มีความคงทนและใช้งานได้ดีในเงื่อนไขที่จำเป็น / เป็นสินค้าที่มีปริมาณการใช้มาก และมีตลาดรองรับมาก			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่มีอยู่ในตลาด

เส้นใยและสิ่งทอ	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์	 เส้นใยสำหรับทอผ้า	 เส้นใยดูดซับ NoDax®	
	การใช้งาน	เสื้อผ้า เส้นใย		
	จุดอ่อน/จุดแข็ง	ความหลากหลายในประเภทและรูปแบบผลิตภัณฑ์ / สมบัติการแพร่ผ่านของก๊าซและความเงางาม		
การเพาะปลูก การทำสวนไม้ดอก พืชผล พืชไร่	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์	 ถาดสำหรับเก็บและขนส่งดอกไม้ย่อยสลายได้ NNZ®	 กระถางใส่ต้นไม้ย่อยสลายได้หลังการใช้งาน Novamont®	 ฟิล์มคลุมดินไถกลับได้หลังจากใช้แล้ว Novamont®
	การใช้งาน	กระถางต้นไม้ ถังกระสอบใส่ถ่าน แผ่นฟิล์มคลุมดิน ฟิล์มสำหรับผูก ถังใส่ปุ๋ยหรือเมล็ดพันธุ์พืช		
	จุดอ่อน/จุดแข็ง	ข้อจำกัดด้านราคาของสินค้าจำพวกนี้ / การลดต้นทุนและหมดความยุ่งยากด้านการเก็บขยะหลังการใช้ สามารถใช้งานพร้อมการฝังกลบได้เลย		
การใช้งานทางการแพทย์	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์	 ด้ายเย็บแผล Gunze®	 วัสดุจับยึดกระดูก Gunze®	
	ตัวอย่างการนำไปใช้	ด้ายเย็บแผล การจับยึดกระดูก การผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะ ถังมืออนามัย วัสดุใช้กับปาก		
	จุดอ่อน/จุดแข็ง	สมบัติทางกายภาพและทางกล / สมบัติพื้นฐานที่ดีทางชีวภาพ		
ชิ้นส่วนอุปกรณ์ไฟฟ้า	ตัวอย่างการนำไปใช้	 วอล์กแมน Sony	 แผ่นดีวีดี Sony	 ชิ้นส่วน notebook Sanyo โดยวัสดุ NatureWorks®
	ตัวอย่างการนำไปใช้	หน้ากากหุ้มเครื่องซีดี แผ่นดีวีดี ชิ้นส่วนคอมพิวเตอร์ และเครื่องเล่นดีวีดี การ์ดบัตร		
	จุดอ่อน/จุดแข็ง	สามารถย่อยสลายได้หลังจากหมดอายุการใช้งาน เป็นการช่วยลดปริมาณขยะ		

ที่มา : สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ (2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 การผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม (Roehr, 1996)

การผลิตกรดแลกติกในทางการค้าเริ่มขึ้นเมื่อปี 1881 โดยบริษัท AVERY ในเมือง Littleton ประเทศสหรัฐอเมริกา จุดประสงค์เพื่อผลิตแคลเซียมแลคเตตสำหรับใช้เป็นผงฟูแทนทาร์เทรตที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ ถึงแม้ว่าจะไม่ประสบความสำเร็จมากนัก แต่นี่ก็เป็นอุตสาหกรรมแรกที่มีการผลิตโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ในปี 1895 มีโรงงานที่ประสบความสำเร็จในการผลิตกรดแลกติก ซึ่งก่อตั้งโดย A. Boehringer ในเมือง Ingelheim ประเทศเยอรมนี

2.9.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกต้องมีความเหมาะสม และควรจะมีควมบริสุทธิ์เพื่อที่จะได้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ วัตถุดิบที่นิยมใช้กันมากได้แก่ โมโน- และได-แซ็กคาไรด์ เช่น

- กลูโคส และกลูโคสไซรัป สามารถเตรียมได้จากกระบวนการย่อยแป้ง โดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส
- มอลโทส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง โดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและบีตา-อะไมเลสจากมอลต์และแหล่งอื่น ๆ
- กากน้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีทซึ่งเป็นแหล่งของน้ำตาลซูโครส
- หางนมซึ่งมีน้ำตาลแลคโทสเป็นส่วนประกอบ

2.9.2 กระบวนการหมัก

ในที่นี้จะกล่าวถึงกระบวนการหมักแคลเซียมแลคเตต กระบวนการพื้นฐานในการผลิตกรดแลกติกแสดงในรูปที่ 2.7 ในขั้นตอนการหมักใช้น้ำตาลที่เป็นวัตถุดิบ (กลูโคส,ซูโครส) 120 - 180 กรัมต่อลิตร เติมแหล่งไนโตรเจนซึ่งอาจจะเป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต น้ำแซ่ข้าวโพด ยีสต์สกัด เปปโตน มอลต์ เป็นต้น ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดจะอยู่ระหว่าง 1 - 10 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีการเติมส่วนประกอบที่เป็นแร่ธาตุ เช่น ฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต และไอออนซัลเฟต ทำการหมักในถังหมักขนาดมากกว่า 100 ลิตร สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการใช้ถังหมักคือวัสดุที่ใช้ทำถังหมักจะต้องทนต่อการกัดกร่อนเพราะกรดแลกติกเป็นกรดที่มีการกัดกร่อนสูง

วัสดุที่นิยมใช้คือ คอนกรีต และสแตนเลส ทำการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่ฆ่าเชื้อแล้วตอนเริ่มการหมัก หรือเติมเพิ่มในระหว่างการหมักก็ได้ เพื่อให้มีกรดแลกติกอิสระอยู่ในถังหมักน้อยที่สุด พีเอชควรอยู่ระหว่าง 5.5 - 6 เติมหัวเชื้อเริ่มต้นประมาณร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิมากกว่า 50 องศาเซลเซียสสำหรับ *Lactobacillus delbrueckii* ซึ่งสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงเพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคทีเรียที่ผลิตกรดบิวทิริก

ไม่ว่า กระบวนการหมักจะเสร็จสิ้นในเวลา 2 - 6 วัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ นำไปใช้

2.9.3 ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและการทำให้บริสุทธิ์

การเก็บเกี่ยวและการทำให้แคลเซียมแลคเตตบริสุทธิ์จะใช้ขั้นตอนของ Rauch และคณะ (1960) ซึ่งในการทำให้บริสุทธิ์จะขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ ถ้าใช้น้ำตาลที่บริสุทธิ์ (น้ำตาลเด็กซ์โทรส ที่ได้จากผักกาดหรืออ้อย) จะใช้ความร้อนในการทำให้แคลเซียมแลคเตตละลายทั้งหมด จากนั้นนำมาพรีท (treat) กับ stoichiometric ที่มีกรดซัลฟิวริกร้อยละ 78 ซึ่งผลที่ได้จากการแยกคือ แคลเซียมซัลเฟต (ยิปซัม) กำจัดยิปซัมออกโดยการกรองด้วยถ่านกัมมันต์ นอกจากนี้ความไม่บริสุทธิ์อาจเกิดจากไอออนของโลหะที่มีมากโดยจะแยกออกได้โดยนำไปพรีทกับเฮกซะไซยาโนเฟอไรต์ (hexacyanoferrate) นอกจากนี้การทำให้บริสุทธิ์อาจจะใช้วิธีการแลกเปลี่ยนไอออนโดยการนำไปพรีทกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) หรือโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (potassium permanganate) ซึ่งจะทำให้ได้กรดแลคติกที่มีความบริสุทธิ์และมีความเข้มข้นถึงร้อยละ 80

การหมักจากวัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำจะทำให้ขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์มีต้นทุนมากขึ้น ส่วนใหญ่แล้วก่อนการทำให้บริสุทธิ์จะทำการกรองแคลเซียมแลคเตตกับกรด ซึ่งจะทำให้แคลเซียมแลคเตตเกิดการตกผลึกลงมา และการทำให้สลายตัวจะใช้กรดซัลฟิวริกกับการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน

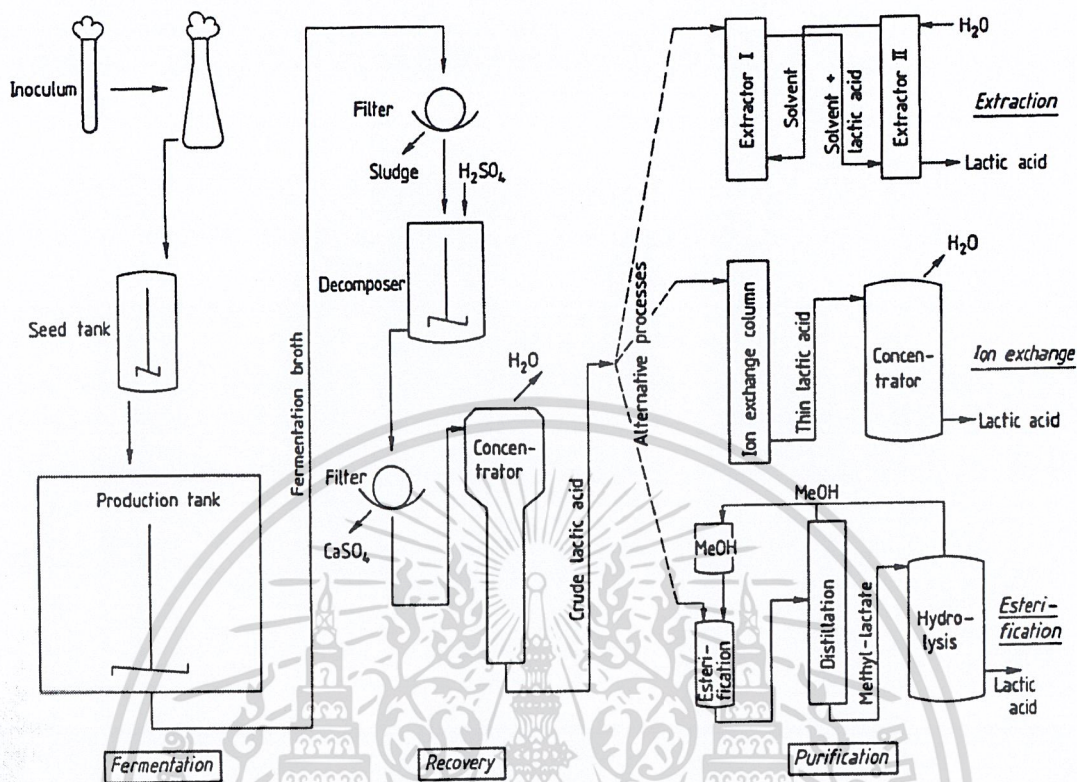
นอกจากนี้การทำให้บริสุทธิ์อาจจะใช้วิธีการตกตะกอนซ้ำและการสลายตัวของแคลเซียมแลคเตตซึ่งอาจจะปรับปรุงวิธีการ โดยการใช้ซิงค์แลคเตต หรือแมกนีเซียมแลคเตตแทน ซึ่งการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้แมกนีเซียมแลคเตตจะทำให้การหมักที่ใช้กากน้ำตาล มีการตกตะกอนที่ดีขึ้น

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดกรดแลคติกในขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ จะใช้สารหลายตัวเช่น ไอโซโพรพิลอีเทอร์ (isopropyl ether) ,แอลฟา, โอเมก้า - ไดอะมิโน - โอลิโกอีเทอร์ (α, ω - diamino-oligoethers), ไอโซบิวทานอล (isobutanol), ไตรแอลคิลเทอติเรียนามีน (trialkyl tertiary amines) ในตัวทำละลายอินทรีย์, ได - เอ็น - ออกทิลเอมีน (di-n-octylamine) ในเฮกเซน นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงใหม่โดยการประยุกต์ใช้ liquid membranes ในอดีตไอโซโพรพิลอีเทอร์จะใช้กับพืชหลายชนิดซึ่งจะเป็นการเสี่ยงต่ออันตรายมาก

วิธีการอื่น ๆ ในการทำให้กรดแลคติกบริสุทธิ์ คือ การใช้เอสเทอร์ทำปฏิกิริยากับเมทานอลและการกลั่นเพื่อให้เกิดการระเหย ซึ่งเป็นขั้นตอนการแยกที่มีประสิทธิภาพสูงและจะทำให้ได้ผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์

จะเห็นว่าขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มีความสำคัญต่อการผลิตเพื่อใช้ในการค้า เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตเพื่อให้ได้เปรียบคู่แข่งทั้งในด้านคุณภาพและราคาของผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 กระบวนการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม

ที่มา : Roehr (1996)

2.9.4 การประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์

กรดแลกติกที่มีความเข้มข้นสูง มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด เป็นที่ต้องการทางการค้า เกรดของกรดแลกติกขึ้นอยู่กับนำไปใช้ ซึ่งสามารถแบ่งเกรดของกรดแลกติกที่ผลิตได้เป็น เกรดที่ใช้ในงานทางเทคนิค (technical grade) เกรดที่ใช้ในอาหาร (food grade) เกรดที่ใช้ทางด้านเภสัชกรรม (pharmacopoeia grade) และเกรดที่ใช้ทำพลาสติก (plastic grade) คุณสมบัติของกรดแลกติกเกรดต่าง ๆ ได้แสดงในตารางที่ 2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 ระดับคุณภาพทางการค้า (commercial grade) ของกรดแลกติกและการนำไปใช้
ประโยชน์

คุณภาพ	คุณสมบัติ	การประยุกต์ใช้
เกรดที่ใช้ในงานทางเทคนิค	สีน้ำตาลอ่อน ปราศจากเหล็ก มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 20 - 80	อุตสาหกรรมการฟอกหนัง และสิ่งทอ การผลิตเอสเทอร์
เกรดที่ใช้ในอาหาร	ใสและไม่มีสี มีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 80	สารปรุงแต่งในอาหาร สาร ให้ความเป็นกรด ผลิตแป้งที่มีรสเปรี้ยว และ โด (dough)
เกรดที่ใช้ทางด้านเภสัชกรรม	ใสและไม่มีสี มีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 90 มีเถ้า (ash) น้อยกว่าร้อยละ 0.1	รักษาอาการในลำไส้ ใช้ในการผลิตยา ใช้ในรูปไอออนของ แลกเตต
เกรดที่ใช้ทำพลาสติก	ไม่มีสี มีเถ้า น้อยกว่าร้อยละ 0.01	แลกเกอร์ น้ำมันเคลือบเงา พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ ทางชีวภาพ

ที่มา : Kristiansen และ Ratledge (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

3.1.2 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท Shimadzu รุ่น C-R7 Ae plus

3.1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

3.1.4 เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท HIRAYAMA

3.1.5 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) ของบริษัท Heidolph

3.1.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB-40000 H

3.1.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น HA-300 HIV

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

3.1.9 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

3.1.10 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

3.1.11 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ของบริษัท Binder

3.1.12 ตู้บ่มปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

3.1.13 ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina air flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT123

3.1.14 เครื่องเขย่า ของบริษัท Gallenkamp

3.1.15 ถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.1.16 ถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.1.17 ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

3.1.18 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX^R

3.1.19 หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^R

3.1.20 กระจกบอขวด (cylinder) ของบริษัท PYREX^R

3.1.21 ปีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท PYREX^R

3.1.22 คิวเวตแก้ว

3.1.23 ปิเปต (pipette)

3.1.24 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

3.1.25 เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)

3.1.26 ตะเกียงแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับภาควิชาใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 ยีสต์สกัด (yeast extract)
- 3.2.2 เปปโตน (peptone)
- 3.2.3 สารสกัดมอลต์ (malt extract)
- 3.2.4 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
- 3.2.5 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 3.2.7 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4 H_2O$)
- 3.2.8 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)
- 3.2.9 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)
- 3.2.10 เนื้อสกัด (meat extract)
- 3.2.11 Tween 80
- 3.2.12 แอมโมเนียมอะซิเตต (CH_3COONH_3)
- 3.2.13 โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)
- 3.2.14 ฐัน (agar)
- 3.2.15 น้ำกลั่น
- 3.2.16 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)
- 3.2.17 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 3.2.18 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 3.2.19 แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)
- 3.2.20 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)
- 3.2.21 โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 3.2.22 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)
- 3.2.23 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)
- 3.2.24 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)

3.3 วัตถุดิบ

- กากน้ำตาลเข้มข้นชนิด blackstrap molasses ซึ่งจากโรงงานผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย จังหวัดกาญจนบุรี
- ยีสต์ออกโตไลเสทได้จากกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แล้วนำมาผ่านขั้นตอนการ Autolysis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

3.3.1.1 การเตรียมยีสต์อโตไลเสท

นำเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ ข้อ 3.6 ที่ให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุด มาทำการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยกวนด้วยใบพัด ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที มีการพ่นให้อากาศ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงนำเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตประมาณ 15-20 เปอร์เซ็นต์ (Calik, 2001) ปรับค่าความเป็นกรดต่าง (ค่าพีเอช) 5.5 (Rajoka, 2006) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง (Rajoka, 2006) หลังจากนั้นทำให้น้ำหมักเย็นลง นำไปกรองหรือปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอากากผนังเซลล์หรือส่วนที่ไม่ละลายน้ำออก นำไปพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส น้ำหมักที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ ระบายน้ำออกบางส่วนด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน แล้วจึงนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส บดให้ละเอียดร่อนผ่านตะแกรงเพื่อให้เป็นผงละเอียดของยีสต์อโตไลเสท

3.3.2 การเก็บวัตถุดิบ

- กากน้ำตาลที่นำมาใช้ในงานวิจัยจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- ยีสต์อโตไลเสทที่ผลิตได้นำมาเก็บไว้ในแช่แข็งเพื่อป้องกันความชื้น

3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.4.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ

3.4.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาสารสกัดจากเซลล์ยีสต์เพื่อนำมาผลิตยีสต์อโตไลเสท

ยีสต์อโตไลเสท

เชื้อที่ใช้ในการศึกษาคือ *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046, Baker's Yeast และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วว.)

3.4.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติก

เชื้อที่ใช้ในการศึกษา คือ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตกรดแลกติก จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.4.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

3.4.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาสารสกัดจากเซลล์ยีสต์เพื่อนำมาผลิตยีสต์อโตไลเสท

การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น มีวิธีการดังนี้ คือ ถ่ายเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046, Baker's Yeast และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059

ปริมาณ 2 ลูกปลิงในอาหารเหลว (Pre-culture) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิกรัมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

3.4.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติก

การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น มีวิธีการดังนี้ คือ ถ่ายเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 ปริมาณ 2 ลูบลงในอาหารเหลว (MRS broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

3.4.3 การเก็บรักษาเชื้อ

3.4.3.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาสารสกัดจากเซลล์ยีสต์เพื่อนำมาผลิตยีสต์ต่อโตะไลเอส

ใช้ลวดเจ็ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อยีสต์ *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046, Baker's Yeast และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059 ปริมาณเล็กน้อยแล้วลาก (streak) ลงบนอาหารวุ้นเยียง (YM slant) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดจุกสำลีให้สนิท เก็บหลอดทดลองใส่ถุงพลาสติกแล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุก ๆ 2 สัปดาห์

3.4.3.2 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติก

ใช้ลวดเจ็ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 ปริมาณเล็กน้อยแล้วลาก (streak) ลงบนอาหารวุ้นเยียง (MRS slant) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดจุกสำลีให้สนิท เก็บหลอดทดลองใส่ถุงพลาสติกแล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุก ๆ 2 สัปดาห์

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัยมีดังนี้

3.5.1 อาหาร Pre-culture (Li, 2009) ประกอบด้วย

กลูโคส	2	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
ยีสต์สกัด	0.5	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปปโตน 1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5.2 อาหาร Yeast Malt medium (YM medium) ประกอบด้วย

กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	3	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	5	กรัมต่อลิตร
มอลต์สกัด	3	กรัมต่อลิตร

ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.2 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5.3 อาหาร Fermentation medium (FM medium) (Ahmed และคณะ, 2010; Rajoka และคณะ, 2006) ประกอบด้วย

โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมซัลเฟต	5	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์	0.13	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	0.5	กรัมต่อลิตร

ใช้สารละลายกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

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

เนื้อสกัด	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
ดี - กลูโคส	20	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซิเตต	5	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไตรแอมโมเนียมซัลเฟต	5	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัมต่อลิตร

ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 (Nancib และคณะ, 2001; Senthurant และ คณะ, 1999) ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5.5 อาหารสังเคราะห์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 (SM) (ดัดแปลงจาก Youssef และคณะ, 2000 ; Vasala และคณะ, 2005) ประกอบด้วย

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

ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5.6 อาหารชุดดัดแปลงที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

3.5.6.1 อาหารชุดดัดแปลงที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ชุดที่ 1, 2 และ 3

(กลูโคส + ยีสต์ออโตไลเสท) ประกอบด้วย

กลูโคส	40	กรัมต่อลิตร
ปริมาณแปรผันยีสต์ออโตไลเสท	5, 10, 15	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.10	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัมต่อลิตร

ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6.2 อาหารชุดดัดแปลงที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ชุดที่ 4 (กากน้ำตาล + ยีสต์สกัด) ประกอบด้วย

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

ใช้สารละลายกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5.6.3 อาหารชุดดัดแปลงที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ชุดที่ 5 (กากน้ำตาล + ยีสต์อโตไลเสท) ประกอบด้วย

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.10	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัมต่อลิตร

ยีสต์อโตไลเสทปริมาณที่เหมาะสมจากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากสูตรอาหารชุดดัดแปลงที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ชุดที่ 1, 2 และ 3 (กลูโคส + ยีสต์อโตไลเสท) ใช้สารละลายกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.6 ศึกษาการผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ โดยใช้ยีสต์ 4 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนสูงสุด โดยเทคนิค Autolysis

นำอาหารเหลว YM และอาหารเหลว FM มาปรับค่าความเป็นด่างให้ได้ 6.2 (Ahmed และคณะ, 2010; Rajoka และคณะ, 2006) จากนั้นนำมาเทใส่พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร พลาสติกละ 100 มิลลิลิตร (แต่ละชุดอาหารให้ทำการทดลอง 5 พลาสติก โดยกำหนดชุดเก็บตัวอย่าง 1 พลาสติก) ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046, Baker's Yeast และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059 จากการทดลองในข้อ 3.4.2.1 ปริมาตรร้อยละ

5 (Ahmed และคณะ, 2010) นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (Rajoka และคณะ, 2006) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาล ค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ และเมื่อครบ 72 ชั่วโมงนำน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงมากรองหรือปั่นเหวี่ยงเพื่อเอากากผนังเซลล์ออก แล้วจึงนำไปพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส (เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์) แล้วนำไปประเหยน้ำออกบางส่วนด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) ทำให้แห้ง โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีเจลดาคาห์ล (Kjeldahl)

3.7 ศึกษาการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลกติกในอาหารสังเคราะห์

นำอาหารสังเคราะห์จากข้อ 3.5.5 มาปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 จากนั้นนำมาเทใส่พลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร พลาสติกละ 175 มิลลิลิตร ทำการนิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทิ้งไว้ให้เย็น เดิมหัวเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 จากการทดลองในข้อ 3.4.2.2 ปริมาตรร้อยละ 5 (Fitzpatrick และคณะ, 2001) บ่มในสภาวะตั้งนิ่ง (Dembczynski และ Jankowski, 2002; จงกมล, 2550) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Tanaka, 2006) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมา วัดน้ำตาล ค่าพีเอช และปริมาณกรดแลกติก

3.8 ศึกษาปริมาณยีสต์ต่อโตนไลสที่ เหมาะสม เพื่อผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409

นำอาหารชุดดัดแปลงจากข้อ 3.5.6.1 โดยมีปริมาณยีสต์ต่อโตนไลสแปรผันดังนี้ 5 , 10 และ 15 กรัมต่อลิตร (ซึ่งแบ่งชุดอาหารดัดแปลงเป็น MM₁ , MM₂ และ MM₃ ตามลำดับ) มาปรับค่า พีเอชให้ได้ 6.5 จากนั้นนำมาเทใส่พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร พลาสติกละ 175 มิลลิลิตร ทำการนิ่ง ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เดิมหัวเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 จากการทดลอง ในข้อ 3.4.2.2 ปริมาตรร้อยละ 5 (Fitzpatrick และคณะ, 2001) บ่มในสภาวะตั้งนิ่ง (Dembczynski และ Jankowski, 2002; จงกมล, 2550) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Tanaka, 2006) เก็บตัวอย่าง ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาล ค่าพีเอช และปริมาณกรดแลกติก

3.9 ศึกษาและเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

นำอาหารชุดดัดแปลงข้อ 3.5.6.2, 3.5.6.3(MM₄, MM₅) มาทำการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติก ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร พลาสติกละ 175 มิลลิลิตร ทำการนิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เดิมหัวเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 จากการทดลองในข้อ 3.4.2.2 ปริมาตรร้อยละ

5 (Fitzpatrick และคณะ, 2001) บ่มในสภาวะตั้งนิ่ง (Dembczynski และ Jankowski, 2002; จงกมล , 2550) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Tanaka, 2006) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาล ค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก และเปรียบเทียบกับชุดอาหารสังเคราะห์ เพื่อหาชุดอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 2 ลิตร กับถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.10 ศึกษาศักยภาพของการผลิตกรดแลกติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

เลือกชุดอาหารที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดจากข้อ 3.8 และ 3.9 มาทำการหมัก เพื่อผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติกขนาด 2 ลิตร และในถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.10.1 การผลิตกรดแลกติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร

ปริมาตรอาหารที่ใช้หมักคือ 1,400 มิลลิลิตร ทำการเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะตั้งนิ่ง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาล ค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณเซลล์

3.10.2 การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ปริมาตรอาหารที่ใช้หมักคือ 1,400 มิลลิลิตร ทำการเติมหัวเชื้อปริมาณร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าพีเอชให้ได้ 6.5 กวนด้วยใบพัดโดยใช้ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ไม่มีการพ่นอากาศ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดน้ำตาล ค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณเซลล์

3.11 การวิเคราะห์ผล

3.11.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์

3.11.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยการวัดความหนาแน่นของเซลล์

นำตัวอย่างมาวัดความขุ่น โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิธีนี้จะใช้กับการทดลองในข้อ 3.6

3.11.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ทั้งหมดโดยวิธี Total plate count

(A.O.A.C. 2000)

นำน้ำหมักที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเทอาหารแข็ง (MRS agar) ลงไปในจานเพาะเชื้อ ทำการหมუნวนจานเพาะเชื้อให้อาหารและน้ำหมักเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งจานเพาะเชื้อทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว ทำการคว่ำจานไม่ต่ำกว่าครึ่งใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำงานเพาะเชื้อออกมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญในอาหาร วิธีนี้จะใช้กับการทดลองในข้อ 3.10

3.11.2 การวัดปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)

การวัดปริมาณกรดแลกติกจะใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยนำน้ำหมักที่ได้จากการเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงต่างๆ มาทำการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มา วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก โดยกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อน การวิเคราะห์จะใช้คอลัมน์ Inersil C8-3 ใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (ประยุกต์จากญาติี ติตะนันท์, 2541) นำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกราฟมาตรฐาน

3.11.3 การวัดปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)

วัดปริมาณน้ำตาลในกากน้ำตาล และในอาหารสังเคราะห์โดยวิธีฟินอล - ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956)

3.11.4 การวัดค่าความเป็นกรดต่าง (พีเอช)

วัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่องวัดพีเอช

3.11.5 การหาปริมาณผลได้ (%Yield) (กรัมกรดแลกติกต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป) และอัตราการผลิตต่อชั่วโมง (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

ปริมาณผลได้จะคิดเทียบระหว่างปริมาณกรดแลกติกที่ได้ต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป และอัตราการผลิตจะคิดเทียบระหว่างปริมาณกรดที่ได้ต่อปริมาณน้ำหมักต่อชั่วโมงที่ใช้ในการหมัก

3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

แต่ละการทดลองเป็นแบบสุ่มอิสระ โดยสมบูรณ์ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ค่าทางสถิติใช้ SPSS 17.0 (Statistic Package for Social Science) การเปรียบเทียบใช้การทดสอบของ Duncan (new multiple range test) ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในการพิจารณาว่ามีความสำคัญทางสถิติหรือไม่

เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นแบบสุ่มอิสระ โดยสมบูรณ์ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยใช้ค่าทางสถิติ SPSS 17.0 (Statistic Package for Social Science) การเปรียบเทียบใช้การทดสอบ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในการพิจารณาว่ามีความสำคัญทางสถิติหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์โดยใช้ยีสต์ 4 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนสูงสุด โดยเทคนิค Autolysis

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida utilis* TISTR 5046, Baker's Yeast และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (FM) และอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth โดยนำไปบ่มในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดโดยใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้น 6.2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดน้ำตาลที่เหลือ (รีออล) ค่าพีเอช ปริมาณเซลล์ทั้งหมด และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีเจลดายาล พบว่า

เชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 ให้ค่าปริมาณโปรตีนสูงสุดมากกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่นที่ได้ทำการทดลอง ซึ่งมีค่าปริมาณโปรตีน (รีออล) 47.79 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบด้วยกากน้ำตาล ยีสต์สกัดและแหล่งแร่ธาตุ (FM) โดยให้ค่าปริมาณ โปรตีน (รีออล) สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ซึ่งได้ค่าเพียง 39.65 ดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ahmed และคณะ (2010) ซึ่งมีใจความว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Candida Utilis* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของกากน้ำตาล ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้โปรตีนชีวภาพจากเซลล์จุลินทรีย์ในปริมาณมากที่สุด

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

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

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

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

เชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046 ให้ค่าปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) 45.50 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบด้วยกากน้ำตาล ยีสต์สกัดและแหล่งแร่ธาตุ (FM) โดยให้ค่าปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ซึ่งได้ค่าเพียง 39.53 ดังตารางที่ 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5046

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

เชื้อ Baker's Yeast ให้ค่าปริมาณ โปรตีน (ร้อยละ) 44.50 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบด้วยกากน้ำตาล ยีสต์สกัดและแหล่งแร่ธาตุ (FM) โดยให้ค่าปริมาณโปรตีน(ร้อยละ)สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ซึ่งได้ค่าเพียง 34.40 ดังตารางที่ 4.5 และ 4.6

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ Baker's Yeast

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ Baker's Yeast

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

เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059 ให้ค่าปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) 46.27 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบด้วยกากน้ำตาล ยีสต์สกัดและแหล่งแร่ธาตุ (FM) โดยให้ค่าปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ซึ่งได้ค่าเท่ากับ 44.85 ดังตารางที่ 4.7 และ 4.8

ตารางที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้เพื่อการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

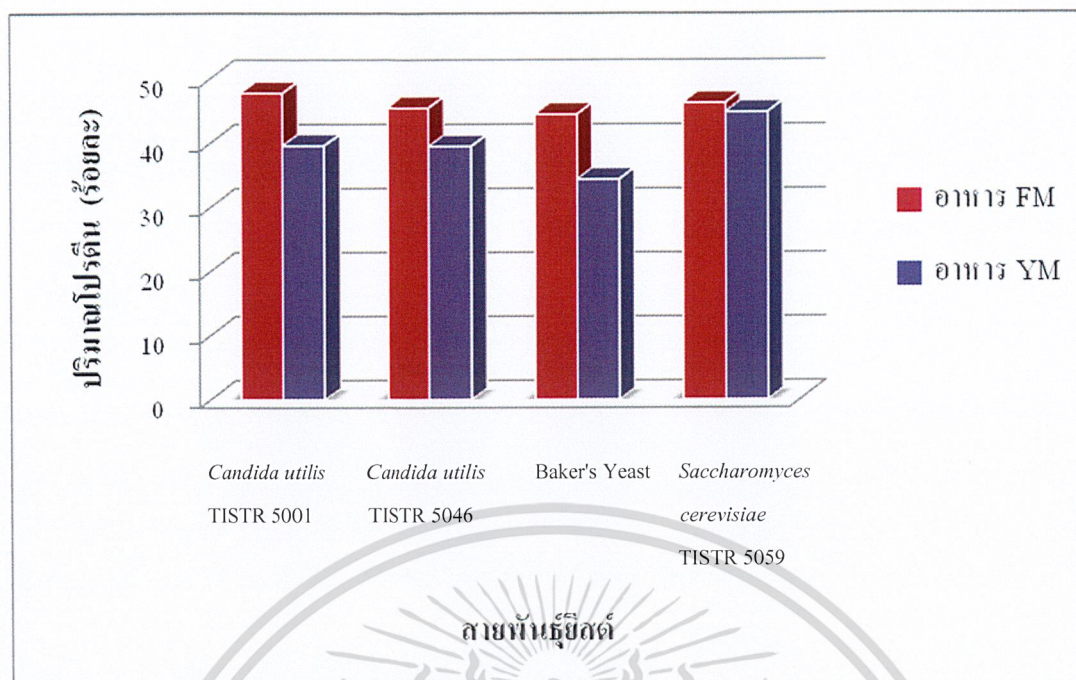
ตารางที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ % การใช้น้ำตาล และการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059

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

ตารางที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบผลการศึกษารผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 4 สายพันธุ์ ในอาหาร FM และ YM เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนสูงสุดโดยเทคนิค Autolysis

เชื้อ	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)		ผู้ทำการทดลอง
	อาหาร FM	อาหาร YM	
<i>Candida utilis</i> TISTR 5001	47.79	39.65	น.ส.ชญาณุช จิตต์อารีย์เทพ น.ส.ธีรนนท์ อิมจิตต์ น.ส.นันทรัตน์ จารุทโรภาสน์
<i>Candida utilis</i> TISTR 5046	45.50	39.53	น.ส.ณิชชาภัทร ชื่นจิตร์ น.ส.นพมาศ ภาณุโชติเสถียรชัย น.ส.เบญจพร คุณากรวิชัย
Baker's Yeast	44.50	34.40	นายณัฐกานต์ วรกุล น.ส.ทิพย์นภา โคน้อย นายทิวากร ศิริพงษ์
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5059	46.27	44.85	น.ส.ปวีณา โต้ะสำลี น.ส.มณีวรรณ วสินอุดมพร น.ส.รัตตินันท์ นิตยสุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการผลิตสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 4 สายพันธุ์ ในอาหาร FM และ YM เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนสูงสุดโดยเทคนิค Autolysis

4.2 ผลการศึกษาปริมาณยีสต์ออกโตไลสที่เหมาะสม เพื่อผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีปริมาณยีสต์ออกโตไลสแปรผัน 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน (ซึ่งแบ่งอาหารชุดดังกล่าวเป็น MM₁, MM₂ และ MM₃ ตามลำดับ) โดยนำไปบ่มในสภาวะตั้งนิ่ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมงมาวัดปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอช พบว่า

เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 19.93 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดดัดแปลง MM₁ ที่ประกอบด้วยกลูโคส ยีสต์ออกโตไลส 5 กรัมต่อลิตร และแหล่งแร่ธาตุ โดยได้ปริมาณของกรดแลกติกสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดอาหารดัดแปลง MM₂ และ MM₃ ที่มีกลูโคส ยีสต์ออกโตไลส 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และแหล่งแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบ ซึ่งได้กรดแลกติกในปริมาณเพียง 13.93 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 และ 12.55 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 และเมื่อทำการวัดพีเอชในชั่วโมงที่ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดของอาหารทั้ง 3 สูตร คืออาหารชุดดัดแปลง MM₁, MM₂ และ MM₃ ได้ค่าพีเอช 5.02, 4.78 และ 4.45 ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ) มีค่าเท่ากับ 27.17, 62.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่ในวงกว้าง

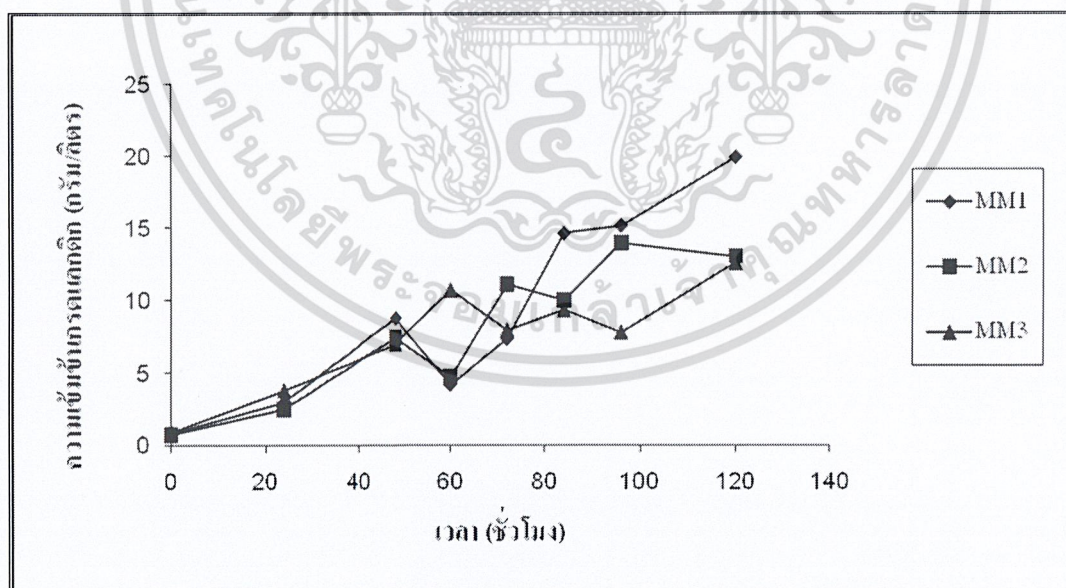
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 42.56 ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่ได้ในอาหาร MM₁, MM₂ และ MM₃ นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นกรดแลกติก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดตัดแปลง 3 สูตร เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

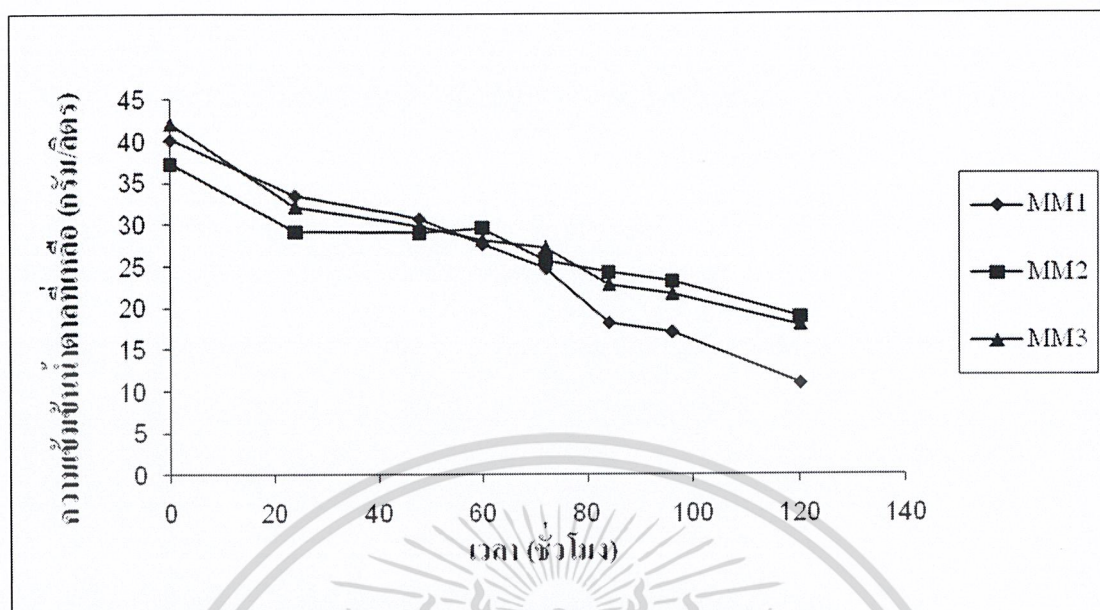
สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ)
MM ₁ (กลูโคส + ยีสต์ออกโตไลเซท 5 กรัมต่อลิตร)	120	5.02 ^a	19.93 ^a	27.17 ^c
MM ₂ (กลูโคส + ยีสต์ออกโตไลเซท 10 กรัมต่อลิตร)	96	4.78 ^b	13.93 ^b	62.22 ^a
MM ₃ (กลูโคส + ยีสต์ออกโตไลเซท 15 กรัมต่อลิตร)	120	4.45 ^c	12.55 ^c	42.56 ^b

หมายเหตุ ในแต่ละสคริปต์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลที่ละลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.11 แสดงการเปรียบเทียบผลได้ และอัตราการผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดคัดแปลง 3 สูตร เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
MM ₁ (กลูโคส + ยีสต์ออกโตไลเสท 5 กรัมต่อลิตร)	120	0.68 ^b	0.17 ^a
MM ₂ (กลูโคส + ยีสต์ออกโตไลเสท 10 กรัมต่อลิตร)	96	0.99 ^a	0.15 ^b
MM ₃ (กลูโคส + ยีสต์ออกโตไลเสท 15 กรัมต่อลิตร)	120	0.52 ^c	0.10 ^c

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยการวิเคราะห์ห้ด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าปริมาณยีสต์ออโตไลเซสที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่แตกต่างกันนั้นมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเมื่อเติมยีสต์ออโตไลเซสในปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร จะให้ค่าการผลิตกรดแลกติกที่ได้มากกว่าการเติมยีสต์ออโตไลเซส 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Young - Jung Wee และคณะ (2004) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล ด้วยวิธีการหมักแบบกะ โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 และมีการศึกษาถึงผลของปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ซึ่งพบว่าการใช้ยีสต์สกัดในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุด เท่ากับ 96.5 กรัมต่อลิตร และยังพบว่าการใช้กากน้ำตาลในปริมาณมากจะส่งผลให้มีการผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 134.9 กรัมต่อลิตร ด้วยเช่นกัน แต่ถ้าหากมีการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดเป็น 15 และ 20 กรัมต่อลิตร จะทำให้มีการผลิตกรดแลกติกในปริมาณที่น้อยลง

4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมียีสต์สกัด และยีสต์ออโตไลเซส เป็นแหล่งไนโตรเจน (ซึ่งแบ่งชุดอาหารเป็น MM₄ และ MM₅ ตามลำดับ) โดยนำไปหมักในสภาวะตั้งนิ่ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก ๆ 12 ชั่วโมงมาวัดปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอช พบว่า

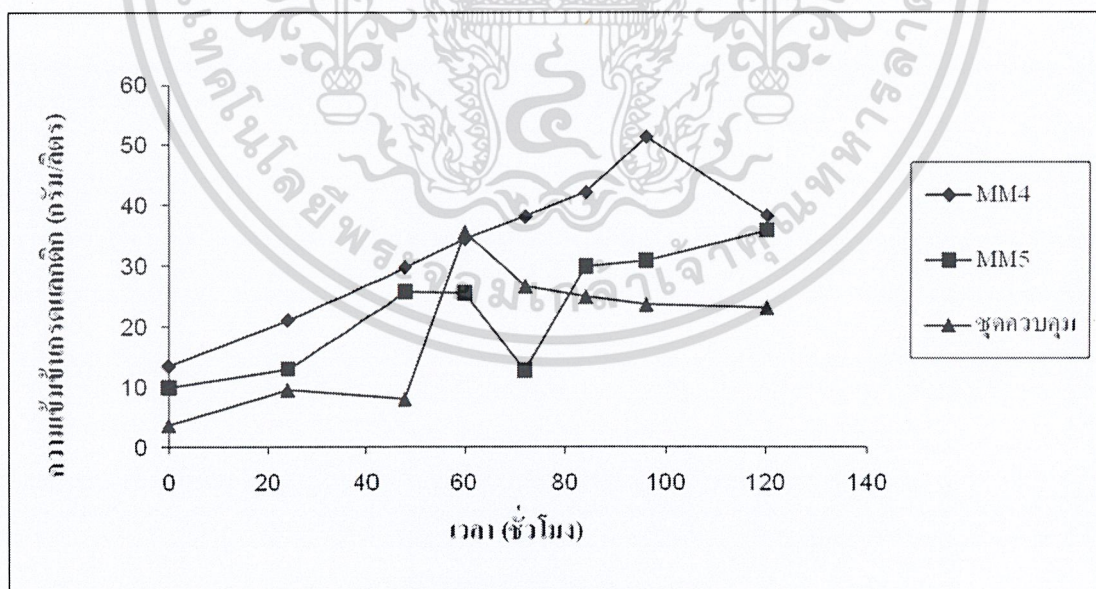
เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 51.36 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร และแหล่งแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบ โดยได้ปริมาณของกรดแลกติกสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลยีสต์ออโตไลเซส 5 กรัมต่อลิตร และแหล่งแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบ ซึ่งได้กรดแลกติกในปริมาณเพียง 35.85 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 และเมื่อทำการวัดพีเอชในชั่วโมงที่ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด ได้ค่าพีเอช 4.29 และ 4.69 ในอาหารชุดคัดแปลง MM₄ และ MM₅ ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารชุดคัดแปลง MM₄ (ร้อยละ 40.06) มีค่าต่ำกว่าอาหารชุดคัดแปลง MM₅ (ร้อยละ 42.69) ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่ได้ในอาหาร MM₄ และ MM₅ นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงการเปรียบเทียบพีเอช ความเข้มข้นกรดแลกติก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดตัดแปลง 2 สูตร และอาหารสังเคราะห์

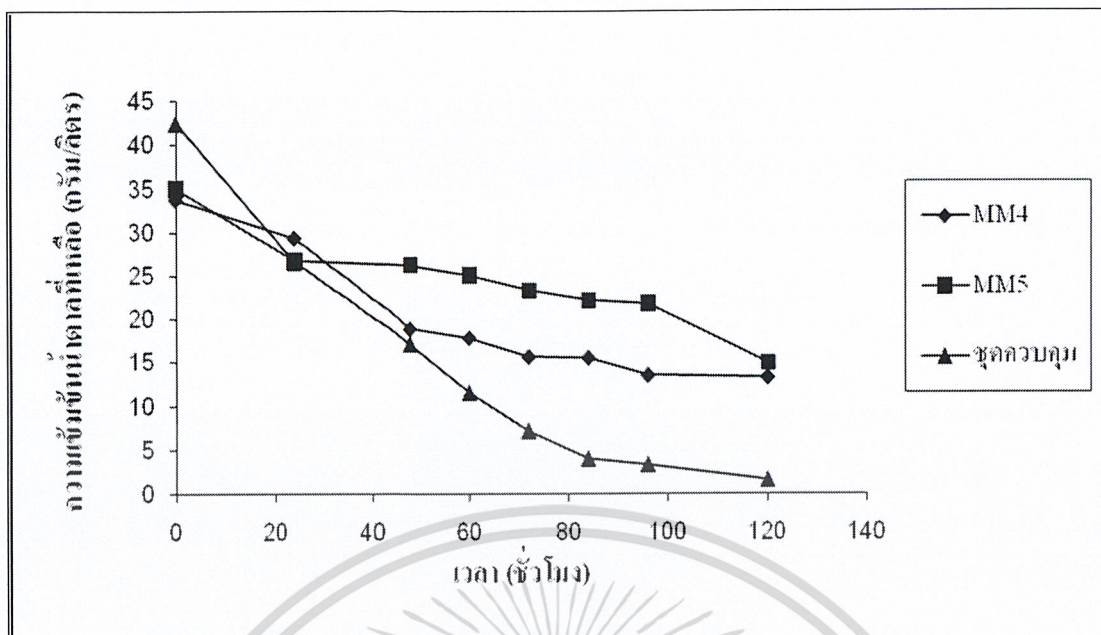
สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (ร้อยละ)
MM ₄ (กากน้ำตาล + ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร)	96	4.29 ^c	51.36 ^a	40.06 ^a
MM ₅ (กากน้ำตาล + ยีสต์ออก โตไลเสท 5 กรัมต่อลิตร)	120	4.69 ^a	35.85 ^b	42.69 ^a
ชุดควบคุม (กลูโคส + ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร)	60	4.48 ^b	35.70 ^b	27.19 ^b

หมายเหตุ ในแต่ละสัปดาห์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตร และ

อาหารสังเคราะห์ เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตร และอาหารสังเคราะห์ เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

จากผลการทดลองการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ได้กับการใช้ยีสต์อโตไลเซทเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารชุดดัดแปลง MM₄ และ MM₅ พบว่าค่าของกรดแลกติกที่ผลิตได้ในอาหารชุดดัดแปลง MM₄ มีค่ามากกว่าค่าของกรดแลกติกสูงสุดที่ผลิตในอาหารชุดดัดแปลง MM₅ และใช้ระยะเวลาสั้นกว่า ซึ่งเนื่องมาจากความบริสุทธิ์ของยีสต์สกัดนั้นมีมากกว่ายีสต์อโตไลเซท จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Aicha Nancib และคณะ (2005) ซึ่งมีใจความว่า การผลิตกรดแลกติกจากน้ำอิมพัลล์ โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* พร้อมทั้งศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่หลากหลายในการผลิตกรดแลกติกด้วย ซึ่งจากการทดลองพบว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ได้ปริมาณการผลิตกรดแลกติกที่สูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอื่นในการผลิตกรดแลกติก และปริมาณของยีสต์สกัดที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก คือ 10 กรัมต่อลิตร โดยจะทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกที่สูงที่สุด เท่ากับ 24.8 กรัมต่อลิตร

เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณกรดแลกติกในอาหารสังเคราะห์พบว่าอาหารชุดดัดแปลง MM₄ ได้ค่าปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าในอาหารสังเคราะห์ที่มี กลูโคส ยีสต์สกัด และแหล่งแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบ ซึ่งได้ปริมาณกรดแลกติกเพียง 35.70 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 และเมื่อทำการวัดพีเอชในชั่วโมงดังกล่าว ได้ค่าพีเอช 4.48 และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ร้อยละ 27.19 แต่เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาในการผลิตกรดแลกติกพบว่า อัตราการผลิตกรดแลกติกในอาหารสังเคราะห์มีค่ามากกว่า คือ 0.60 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งในอาหารชุดดัดแปลง MM₄ พบว่าอัตราการผลิตกรด

แลกติกมีค่า 0.54 ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจาก ในอาหารสังเคราะห์มีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเซลล์สามารถนำไปใช้ได้ดีกว่าน้ำตาลซูโครสที่มีอยู่ปริมาณมากในกากน้ำตาล (กากน้ำตาลมีกลูโคสอยู่บ้างแต่ในปริมาณต่ำ) เห็นได้จากปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสังเคราะห์มีค่าน้อยกว่า (ร้อยละ 27.19) ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารชุดดัดแปลง MM₄ (ร้อยละ 40.06) แต่เมื่อพิจารณาถึงการเจริญเติบโตของเซลล์พบว่าอาหารชุดดัดแปลง MM₄ นั้นมีระยะเวลาการเจริญที่ยาวนานกว่า ซึ่งเป็นผลทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกมากกว่า อาจเนื่องมาจากกากน้ำตาลมีสารอาหารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Bulut และคณะ (2004) ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และได้ทำการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนราคาถูกรูปแบบต่างๆ คือ ฝักถั่ว กากน้ำตาล และรำข้าวสาลี พบว่ากากน้ำตาลจะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคือ 49 กรัมต่อลิตร และนอกจากนี้ยังมีนักวิจัยหลายท่านที่ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น Dumbrepatil และคณะ (2007) ทำการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาลอ้อย โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3 ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ พบว่าความเข้มข้นของกรดแลกติกนั้นเพิ่มขึ้นสูงสุด คือ 166 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลสูงขึ้นไปจนถึง 190 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิต 4.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Kotzamanidis และคณะ (2002) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาลโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130 ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 88 กรัมต่อลิตร จากกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการทรีท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 แสดงการเปรียบเทียบผลได้ และอัตราการผลิต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตร และอาหารสังเคราะห์

สูตรอาหาร	ชั่วโมงที่	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
MM ₄ (กากน้ำตาล + ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร)	96	2.84 ^a	0.54 ^a
MM ₅ (กากน้ำตาล + ยีสต์ออกโต ไลเซท 5 กรัมต่อลิตร)	120	1.79 ^b	0.30 ^b
ชุดควบคุม (กลูโคส + ยีสต์สกัด 10 กรัม ต่อลิตร)	60	1.16 ^c	0.60 ^a

หมายเหตุ ในแต่ละสัปดาห์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดแลกติกระหว่างอาหารชุดดัดแปลง MM₄ กับอาหารสังเคราะห์และอาหารชุดดัดแปลง MM₅ ข้างต้น พบว่าปริมาณของกรดแลกติกในอาหารชุดดัดแปลง MM₄ (51.36 กรัมต่อลิตร) มีค่าสูงกว่าปริมาณกรดแลกติกในอาหารชุดดัดแปลง MM₅ (35.85 กรัมต่อลิตร) และอาหารสังเคราะห์ (35.70 กรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบผลได้และอัตราการผลิตระหว่างอาหารชุดดัดแปลง MM₄ และอาหารสังเคราะห์ พบว่าผลได้มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยอาหารชุดดัดแปลง MM₄ มีค่ามากกว่าอาหารสังเคราะห์ ส่วนอัตราการผลิตมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.13 จึงสรุปได้ว่าอาหารดัดแปลงสามารถนำมาใช้ทดแทนอาหารสังเคราะห์ได้

4.4 ผลการศึกษาศักยภาพของการผลิตกรดแลกติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 โดยใช้อาหารชุดดัดแปลง MM₄ เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 ทำการควบคุมพีเอช โดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตร บ่มในสภาวะนิ่ง

เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที และมีการควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ที่ 6.5 ตลอดการทดลอง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักนี้จะมีค่าสูงสุดอยู่ในชั่วโมงที่ 96 ซึ่งค่าสูงสุดของปริมาณกรดแลกติก ผลได้ อัตราการผลิต และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (43.16 กรัมต่อลิตร, 1.60 กรัมต่อกรัม, 0.45 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 2.58×10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ) จะมีค่าสูงกว่าและใช้เวลาที่สั้นกว่าการผลิตกรดแลกติกโดยใช้พลาสติก ซึ่งการผลิตกรดแลกติก โดยใช้พลาสติกจะให้ค่าของปริมาณกรดแลกติก ผลได้ อัตราการผลิต และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (36.37 กรัมต่อลิตร, 1.61 กรัมต่อกรัม, 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 1.98×10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ) ที่สูงที่สุดอยู่ในชั่วโมงที่ 120 ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณของกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ผลได้ อัตราการผลิต และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 โดยใช้วิธี T-test

สภาวะ	ความเข้มข้น กรดแลกติก (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ น้ำตาลที่ เหลือ (ร้อยละ)	ผลได้ (กรัมต่อ กรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ ที่มีชีวิต (CFU/ml)
พลาสติก (กากน้ำตาล + ยีสต์ สกัด 10 กรัมต่อลิตร)	31.71	66.05	2.37	0.33	1.26×10^8
ถังหมัก (กากน้ำตาล + ยีสต์ สกัด 10 กรัมต่อลิตร)	43.16	28.79	1.60	0.45	2.58×10^8
ค่า p-value	0.017	0.001	0.008	0.021	0.000

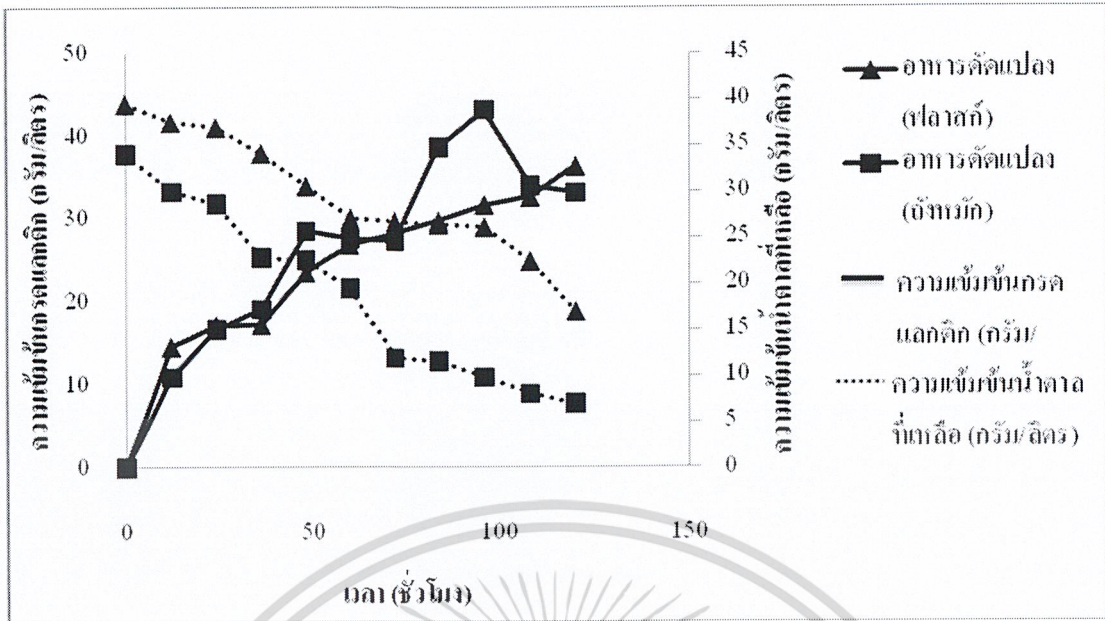
หมายเหตุ

ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

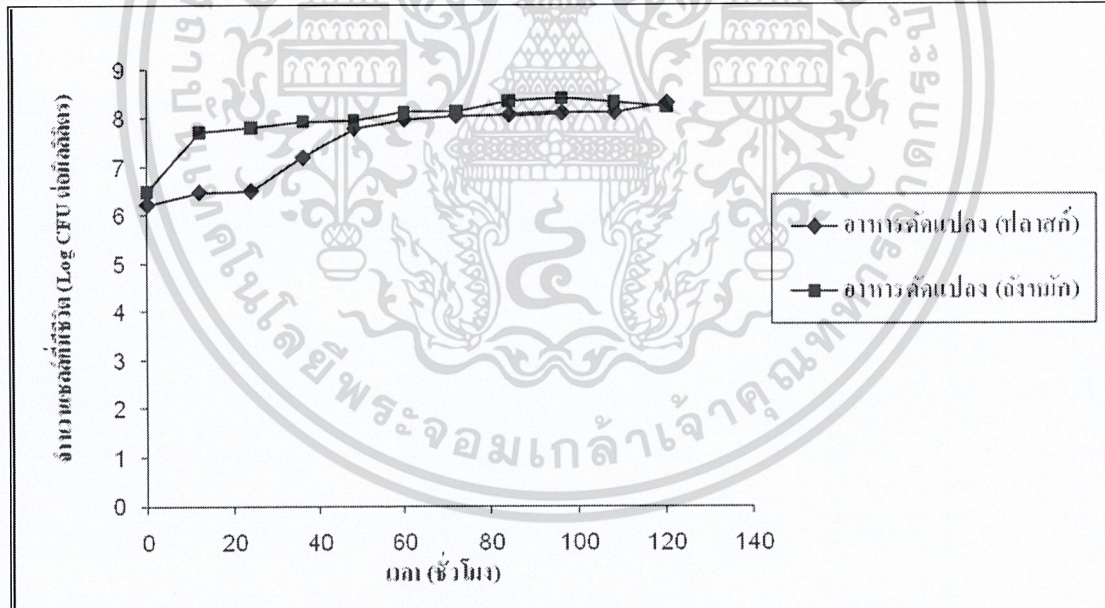
ค่า p-value อยู่ในช่วง $0.01 < p\text{-value} < 0.05$ = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่า p-value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณของกรดแล็กติก และความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือ ในสภาวะต่างๆ ที่ใช้ผลิตกรดแล็กติก เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ในสภาวะต่างๆ ที่ใช้ผลิตกรดแล็กติก เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่า การหมักในถังหมักที่มีการกวนด้วยใบพัดความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที มีผลทำให้เกิดการผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อกับเชื้อที่ใช้ในการหมัก ทำให้เชื้อสามารถใช้สารอาหารที่อยู่ในถังหมักได้ดียิ่งขึ้น ทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกมากกว่าในพลาสติกที่อยู่ในสถานะตั้งนิ่ง นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการผลิตในถังหมักก็ยังใช้เวลาสั้นกว่าการผลิตในพลาสติกอีกด้วย ดังนั้นการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 เมื่อทำการหมักในถังหมักจึงดีกว่าการหมักในพลาสติก เพราะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Gao และคณะ (2005) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* NRBC 3863 ซึ่งใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ความเร็วในการกวน 100 รอบต่อนาที จะทำให้การผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด Agarwal และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Enterococcus flavescens* ในถังหมักขนาด 10 ลิตร มีการควบคุมพีเอช และให้คาร์บอนไดออกไซด์อย่างต่อเนื่อง พบว่าให้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าในพลาสติกถึง 8.7 เท่า Yu และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466 พบว่าการหมักในถังหมักจะใช้เวลาสั้นกว่าในพลาสติก 12 ชั่วโมง และได้ผลผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นร้อยละ 30.4

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของกรดแลกติก และอัตราการผลิต ในอาหารชุดดัดแปลง MM₄ พบว่าทั้งปริมาณกรดแลกติก และอัตราการผลิต ในถังหมักมีค่ามากกว่าในพลาสติก ซึ่งค่าที่ได้นั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำกากน้ำตาลมาประยุกต์ใช้ในการผลิตกรดแลกติก เพื่อลดต้นทุนในการผลิต และยังเป็น การนำของเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกทางหนึ่ง

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 33409 พบว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนคือ กากน้ำตาล แต่ยังคงขาดแหล่งไนโตรเจนและแหล่งแร่ธาตุที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการผลิตกรดแลกติก ดังนั้นจึงต้องเติมแหล่งไนโตรเจนและแหล่งแร่ธาตุลงไปด้วย ซึ่งจากการทดลองแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าเมื่อเพิ่มยีสต์อโตไลเสทลงในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือกากน้ำตาล ปริมาณกรดแลกติกที่ได้น้อยกว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกคือ กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตร แหล่งแร่ธาตุ ซึ่งประกอบไปด้วย ไคโทแซนไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.10 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าการผลิตกรดแลกติกในถังหมักจะให้ปริมาณสูงกว่าการผลิตในพลาสติก ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 43.16 และ 36.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- จกมล จริยกุล. 2550. การผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ธีรวิฑูถิ ฤทธิ์เดชา. 2544. การเลียนแบบกลิ่นรสเนื้อโดยใช้ยีสต์ออกโตไลเอสท เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัตติ. ปรินญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศิวาพร ศิวเวษช. 2546. วัตถุดิบอาหาร เล่ม 1. นครปฐม : โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม การเกษตรแห่งชาติ.
- สถาบันวิจัยและอบรมเกษตรลำปาง. 2004. ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าว (coconut water). [online]. Available : www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/chapter/composition%20coconut%20water.html
- สันทัต ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2544. กากน้ำตาล. [online]. Available : www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=83&i2=15
- สมใจ ศิริโภก. 2544. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ
- สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. 2552. อุตสาหกรรมไบโอพลาสติก. [online]. Available : www.nesdb.go.th/Portals/0/tasks/dev_ability/Profile/industry/...pdf
- Agarwal, L., Dutt, K., Meghwanshi, G.K. and Saxena, R.K. 2008. Anaerobic fermentative production of lactic acid using cheese whey and corn steep liquor. *Biotechnology Letter*. 30, 631–635.
- Ahmad, N. and Marth, E.A. 1989. Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35 °C in tryptone broth acidified with acetic, citric or lactic acid. *Journal of Food Protection*. 52, 688-695.
- Ahmed, S., Ahmed, F. and Hashmi.,A.S. 2010. Production of microbial biomass protein by sequential culture fermentation of *Arachniotus* sp., and *Candida Utilis*. 42(2): 1225-1234
- Aicha Nancib, Nabil Nancib, Djalal Meziane-Cherif, Abdelhafid Boubendir, Michel Fick and Joseph Boudrant. 2005. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 Bioresource Technology. 96, 63–67.
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Altaf, M., Naveena, B.J. and Reddy, G. 2005. Screening of inexpensive nitrogen source for Production of L(+)lactic acid from starch by amylopectin *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation. Food technology and Biotechnology. 43(3), 235-239.
- A.O.A.C. 2000. Official Method of Analysis of A.O.A.C. International. 17th edition. USA : A.O.A.C. International.
- Bae, S. and Shoda, M. 2004. Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium. Biotechnology Progress. 20(5), 1366-1371.
- Bulut, S., Elibol, M. and Ozer, D. 2004. Effect of different carbon sources on l(+) -lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. Biochemical Engineering Journal . 21, 33-37.
- Child, R. 1964. Coconut. London and Colchester : Spottiswoode and Ballantyne.
- Dailey, O.D., Dowd, M.K. and Mayorga, J.C. 2000. Influences of lactic acid on the solubilization of protein during steeping . Journal of Agricultural and Food Chemistry. (48), 1352-1357.
- Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P., Moon, S.H. and Frank, J.R. 1995. Technological and economic potential of Poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS Microbiology Reviews. (16), 221-231.
- Dembczynski, R. and Jankowski, T. 2002. Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. Enzyme and Microbial Technology. 3, 111-115.
- Dubois, M., Gill, K. A., Hamilton, J.K., Rebersand, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. Analytical Chemistry. 28, 350-356.
- Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J. and Gokhale, D. 2008. Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation. Applied and environmental microbiology. 74(1), 333-335.
- Fitzpatrick, J.J., and O'Keeffe, U. 2001. Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentation for producing lactic acid. Process Biochemistry. 37, 183-186.
- Food and Drug Administration. 1998. Code of Federal Regulations. Washington. D.C. :

U.S. Government Printing Office.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Fu, W. and Mathews, A.P. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*. 3(3), 163-170.
- Gao, M.T. Michiteru, K. Rie, G. Hirokazu, T. Makoto, H. and Tadashi, H. 2005. Development of a continuous electro dialysis fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus*. *Process Biochemistry*. 40, 1033–1036.
- Gonzalez, B.M.Y.S. 1941. Change in sugar composition of coconut water during maturation and germination. *Journal of Science and Food Agriculture*. 1, 326-329.
- Gullón, B., Garrote, G., Alonso, J.L. and Parajó, J.C. 2007. Production of L-lactic Acid and Oligomeric Compounds from Apple Pomace by Simultaneous Saccharification and Fermentation: A Response Surface Methodology Assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(14), 5580–5587.
- Hansen, B. 1951. *A study in the theory of inflation*. London : George Allen and Unwin Ltd.
- He, X., Guo, X., Liu, N. and Zhang, B. 2007. Ergosterol production from molasses by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75(1), 55-60.
- Huang, L.P, Lant B. and Zhou, P. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of Potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal*. 23, 265-276.
- Hui, Y.H. and Khachatourians, G.G. 1995. *Food Biotechnology*. New York : VCH Publishers.
- Idris, A. and Suzuna, W. 2006. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *L. delbrueckii*. *Process Biochemistry*. 41, 1117-1123.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2006. Solid state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*. 41(4), 759-763.
- Kadam, S.R., Patil, S.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M. and Gokhale, D.V. 2006. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry*. 41, 120-126.
- Khalaf, S.A. 2001. Lactic acid production by interspecific hybrids of *Rhizopus* strains from potato processing peel waste. *Egypt Journal of Microbiology*. 36(1), 89–102.

- Kotzamanidis, C.H., Roukas, T. and Skaracis, G. 2002. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18, 441–448.
- Lane, J.H. and Eynon, L. 1923. Determination of reducing sugar by means of Fehling solution with methylene blue as internal indicator. *Journal of Society Chemical Industry*. 42, 32–37.
- Martak, J., Schlosser, S., Sabolova, L., Kristofikova, L. and Rosenberg, M. 2003. Fermentation of lactic acid with *Rhizopus arrhizus* in a stirred tank reactor with a periodical bleed and feed operation. *Process Biochemistry*. 25, 1–11.
- Mel, M., Karim, M.I.A., Salleh, M.R.M. and Amin, N.A.M. 2008. Optimizing Media of *Lactobacillus rhamnosus* for Lactic Acid Fermentation. *Journal of Applied Sciences*. 8 (17), 3055-3059.
- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Mancilha, I.M. and Roberto, I.C. 2008. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *Biochemical Engineering Journal*. 40(3), 437-444.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F. and Boudrant, J. 2001. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology*. 78, 149-153.
- Nancib, A., Nancib, N., Mezian, Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M. and Boudrant, J.O, Sph. 2005. Joint effect on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresources Technology*. 96, 63-67.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A. 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7(2), 167 - 179.
- Ogunbanwo, S.T. and Okanlawon, B.M. 2009. Influence of Nutrients Utilization and Cultivation Condition on the Production of Lactic Acid by Homolactic Fermenters. *Biotechnology*. 8(1), 107 – 113.
- Oh, H., Wee, Y.J., Yun, J.S., Han, S.H., Jung, S. and Ryu, H.W. 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology*. 96, 1492-1498.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ohkouchi, Y. and Inoue, Y. 2006. Direct production of L(+)lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011. *Bioresource Technology*. 97, 1554-1562.
- Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Marchant, R. and Banat, I.M. 2007. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresource Technology*. 99, 5951–5955.
- Prescott, A.M., Harley, J.P. and Kiein, D.A. 2008. *Microbiology*. 7th edition. New York : McGraw-Hill.
- Rao, C.S., Prakasham, R.S., Rao, A.B. and Yadav, J.S. 2008. Production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* immobilized in functionalized alginate matrices. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(8), 1411-1415.
- Ratledge, C. and Kristiansen, B. 2006. *Basic Biotechnology*. 3rd edition. New York : Cambridge University Press.
- Rees, T.J. 1997. The Development of a Novel Antifungal Silage Inoculant. [online]. Available : www.brighton73.freemove.co.uk/.../phd-intr.htm
- Rivera, O.M.P., Moldes, A.B., Torrado, A.M. and Domínguez, J.M. 2007. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. *Process Biochemistry*. 42(6), 1010-1020.
- Roehr, M. 1996. *Biotechnology Vol.6*. Weinheim : VCH verlagsgesellschaft mbH.
- Salminen, S., Wright, A. and Ouwehand, A. 2004. *Lactic acid bacteria*. 3rd edition. New York : Marcel Dekker.
- Senthuran, A., Senthuran, V., Kaul, R.H. and Mattiasson, B. 1999. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor : a step towards optimization. *Journal of biotechnology*. 73, 61-70.
- Tanaka, T., Hoshina, M., Tanabe, S., Sakai, K., Ohtsubo, S. and Taniguchi, M. 2006. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. 97, 211-217.
- Todar, K. 2009. *Lactic Acid Bacteria*. [online]. Available : <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tokiwa, Y. and Calabia, B.P. 2007. Production of D -lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*. Biotechnology Letters. 29(9), 1329-1332.
- Vasala, A., Panula, J. and Neubauer, P. 2005. Efficient lactic acid production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* spp. *salicinius* with pretreatment by proteolytic microorganisms. Journal of Biotechnology. 117, 421-431.
- Wee, Y.J., Kim, J.N. and Ryu, H.W. 2006. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Application. Food Technology and Biotechnology. 44(2), 163–172 .
- Wee, Y.J., Yun, J.S., Park, D.H., Ryu, H.W. 2004. Biotechnological production of L(+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. Biotechnology Letters. 26, 71–74.
- Xiao, Z.J., Liu, P.H., Qin, J.Y. and Xu, P. 2007. Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate. Applied Microbiology Biotechnology. 74, 61-68.
- Xu, G.Q., Chu, J., Zhuang, Y.P., Wang, Y.H. and Zhang, S.L. 2007. Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401. Biochemical Engineering Journal. 38(2), 189-197.
- Young-Jung Wee, Jin-Nam Kim, Jong-Sun Yun and Hwa-Won Ryu. 2004. Utilization of sugar molasses for economical l(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. Enzyme and Microbial Technology 35 , 568-573
- Youssef, C.B., Guillou, V. and Dichara, A.O. 2000. Modelling and adaptive control strategy in lactic acid fermentation process. Control Engineering Practice. 8, 1297-1307.
- Yu, L., Lei, T., Ren, X., Pei, X. and Feng, Y. 2008. Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. Biochemical Engineering Journal. 39(3), 496-502.

[online].Available : microbewiki.kenyon.edu/images/b/b4/Lacto.JPG

[online].Available : www.lactospore.com/back.htm

[online].Available : www.purac.com

[online].Available : www.purac.com/purac_com/8edab4bfd1922d05971268f480ea8844.php

[online].Available : http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่า [online].Available : http://www.magma.ca/~pavel/science/L_bulgaricus.htm สารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Pre-culture (Li, 2009) ประกอบด้วย

กลูโคส	2	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
ยีสต์สกัด	0.5	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
เปปโตน	1	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร Yeast Malt medium (YM medium) ประกอบด้วย

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

วิธีการ

ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.2 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร Fermentation medium (FM medium) (Ahmed และคณะ, 2010; Rajoka และคณะ, 2006) ประกอบด้วย

โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมซัลเฟต	5	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์	0.13	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	0.5	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

ใช้สารละลายกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นตัวทำละลาย เพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหาร MRS broth (Fu และ Mathews, 1999; จงกมล, 2550)

4.1 อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (meat extract)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมอะซิเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.05	กรัม

วิธีการ

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 (Nancib และคณะ, 2001; Senthurant และคณะ, 1999) ทำการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.2 อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เฉพาะเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

วิธีการ

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 (Nancib และคณะ, 2001; Senthurant และคณะ, 1999) ทำการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารสังเคราะห์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 (SM) (ดัดแปลงจาก Youssef และคณะ, 2000 ; Vasala และคณะ, 2005) ประกอบด้วย

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

วิธีการ

ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารชุดดัดแปลงที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

6.1 อาหารชุดดัดแปลงที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ชุดที่ 1,2 และ 3 (กลูโคส + ยีสต์ออกโตไลสเทท) ประกอบด้วย

กลูโคส	40	กรัมต่อลิตร
ปริมาณแปรผันยีสต์ออกโตไลสเทท	5, 10, 15	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.10 กรัมต่อลิตร
 แคลเซียมคาร์บอเนต 20 ถึงเจ้าของเอกสาร
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

วิธีการ

ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6.2 อาหารชุดดัดแปลงที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ชุดที่ 4 (กากน้ำตาล + ยีสต์สกัด) ประกอบด้วย

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

วิธีการ

ใช้สารละลายกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6.3 อาหารชุดดัดแปลงที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ชุดที่ 5 (กากน้ำตาล + ยีสต์อโตไลเสท) ประกอบด้วย

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.10	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัมต่อลิตร

วิธีการ

ยีสต์อโตไลเสทปริมาณที่เหมาะสมจากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากสูตรอาหารชุดดัดแปลงที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ชุดที่ 1, 2 และ 3 (กลูโคส + ยีสต์อโตไลเสท) ใช้สารละลายกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสโดยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956)

อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. ปิเปต
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
4. คิวเวต

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5 เปอร์เซ็นต์, specific gravity 1.84)
2. ฟินอลความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟินอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 มิลลิลิตร

3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดังตารางที่ ข-2

ตารางที่ ข-2 การเจือจางสารละลายกลูโคสด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

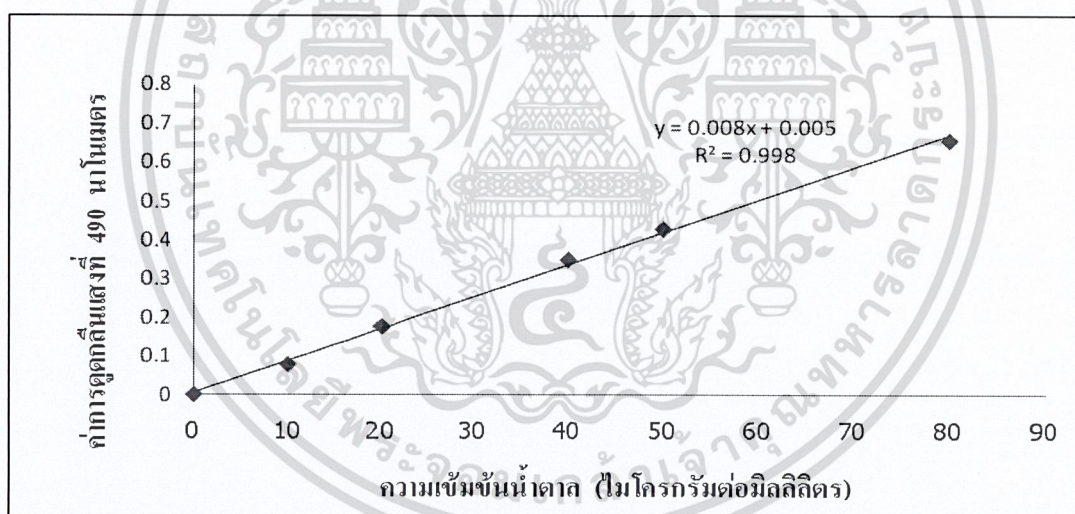
หลอดที่	สารละลายกลูโคส (400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0	1000	0
2	25	975	10
3	50	950	20
4	100	900	40
5	125	875	50
6	200	800	80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยให้กรดลงไป ที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อย ๆ ปล่อยให้ข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่ม ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 - 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 - 20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของ กลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. วิธีการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีเจลดาล์ (Kjeldahl)

โปรตีนเป็นโภชนะหมู่หนึ่งที่มีความสำคัญมากในการเลี้ยงสัตว์ การทำงานของสัตว์ การเจริญเติบโต และการสร้างเนื้อเยื่อต่างๆของสัตว์ และพืชล้วนต้องอาศัยโปรตีนทั้งสิ้น โปรตีนเป็นสารประกอบที่ซับซ้อน ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน และอาจมีธาตุอื่นเป็นองค์ประกอบเพิ่มขึ้นอีก เช่น ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส และเหล็ก แต่ละโมเลกุลของ

โปรตีน ประกอบด้วยสารประกอบไนโตรเจน ที่เรียกว่า กรดอะมิโน จำนวนมากมายหลายชนิด ไม่ว่าจะชนิดใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์หาโปรตีนทางเคมีค้นพบโดย Dane Johan Kjeldahl เป็นชาวเดนมาร์ก ได้ทำการวิเคราะห์โปรตีน โดยวิธีที่เรียกว่า Kjeldahl Method ซึ่งการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ ค่าไนโตรเจนที่ได้เป็นไนโตรเจนจากโปรตีน และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (ยกเว้นไนเตรต) เมื่อนำมาคำนวณค่าที่ได้จึงเป็นค่าโปรตีนหยาบ

การวิเคราะห์หาโปรตีนด้วยวิธีเจลดดาห์ล ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก คือ

1. การย่อยตัวอย่าง (Digestion) เป็นการย่อยตัวอย่างด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น โดยมีสารเร่งปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงไนโตรเจนในตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต

2. การกลั่นแอมโมเนีย (Distillation) เมื่อนำโซเดียมไฮดรอกไซด์ มาทำปฏิกิริยากับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ได้จากการย่อยตัวอย่างแล้ว จะได้ก๊าซแอมโมเนีย ซึ่งจับก๊าซนี้ได้ด้วยสารละลายบอริก

3. การไตเตรตเพื่อหาปริมาณไนโตรเจน (Titration) เป็นการนำสารละลายกรดบอริก ซึ่งจับก๊าซแอมโมเนียไว้ มาไตเตรต กับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก

4. การคำนวณ นำปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก ที่ใช้ในการไตเตรต ไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน แล้วคูณกับ Kjeldahl factor ได้เป็นค่าโปรตีน

$$\% \text{ ใน ไตรเจน (total nitrogen)} = \frac{[A \times (B - C) \times 0.0014 \times 100]}{0.1 \times D}$$

$$\% \text{ โปรตีน (crude protein)} = \% \text{ N} \times 6.25$$

A = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก

B = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่าง

C = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ไทเทรตกับ blank

D = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

วิธีการวิเคราะห์โปรตีน

1. การเตรียมสารตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ ใช้หลักการ sampling โดยน้ำหนักสารตัวอย่างที่ใช้อยู่ในช่วง 0.5 - 5 กรัม

2. ย่อยโดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) ซึ่งปริมาณของกรดที่ใช้ขึ้นกับปริมาณสารตัวอย่าง และองค์ประกอบหรือส่วนผสมอื่น ๆ ในสารตัวอย่าง

3. การกลั่นโดยใช้เครื่องกลั่นแบบใหม่ (Distillation Units) มีวิธีดังนี้

3.1 เปิดก๊อกน้ำเพื่อหล่อเย็นเครื่องควบแน่น และเปิด power ของเครื่อง (Kjeltec) หน้าปัดจะขึ้น รอจนเปลี่ยนเป็น

3.2 กด prog step 1 เติมน้ำกลั่นในหน่วยวินาที (1 วินาที = 15 มิลลิลิตร)

3.3 กด prog step 2 เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้เผยแพร่ข้อมูลนี้ไปยังผู้อื่นโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4 กด prog step 3 เป็นขั้นตอนตั้งเวลาสำหรับรอปฏิกิริยา 0
- 3.5 กด prog step 4 แสดงขั้นตอนการทำงาน ส่วนใหญ่ตั้งเวลาไม่เกิน 500 วินาที 400s
- 3.6 กด prog step 4 ตั้งระดับการผลิตไอน้ำให้เหมาะสม ส่วนมากตั้งไว้ ร้อยละ 70 (คงที่)
- 3.7 กด prog step 5 ตั้งเวลาการดูดสารละลายในหลอดทิ้ง ส่วนมากใช้ 25 - 30 วินาที
- 3.8 กด prog P แล้วกด RUN เครื่องจะทำงาน เมื่อเสร็จการทดลอง ตั้ง P ใหม่ ไม่เอาข้อ 3 0 และ 5 100s แล้วจึงกด RUN

4. การไทเทรต ทำได้โดยใช้กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และเมททิลเรด (methyl red) หรืออินดิเคเตอร์ผสมเมททิลเรดกับบรอมครีซอลกรีน (Brom cresolgreen) โดยหยด 2 - 3 หยดลงใน ฟลาस्कที่มีกรดบอริก และแอมโมเนียม แล้วจึงไทเทรต เมื่อถึงจุดยุติ จะได้สารละลายสีชมพู นำค่าปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไป คำนวณหาปริมาณไนโตรเจน หรือปริมาณโปรตีนตามสูตรด้านบน และในการวิเคราะห์ทุกครั้งต้องทำ blank

ผลการวิเคราะห์โปรตีนในยีสต์อโตไลเสท

โดยเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001

1. ในอาหาร FM

$$\text{ครั้งที่ 1 ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{[0.1030x(53.1 - 0.55)x0.0014x100]}{0.1x1.0093}$$

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \text{ร้อยละ } 7.51$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = \text{ร้อยละ } 46.94$$

$$\text{ครั้งที่ 2 ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{[0.1030x(55.4 - 0.55)x0.0014x100]}{0.1x1.0657}$$

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \text{ร้อยละ } 7.42$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = \text{ร้อยละ } 46.38$$

$$\text{ครั้งที่ 3 ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{[0.1030x(54.5 - 0.55)x0.0014x100]}{0.1x1.0116}$$

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \text{ร้อยละ } 7.69$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = \text{ร้อยละ } 48.06$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-1 แสดงผลการทดลองหาปริมาณโปรตีนในยีสต์ออคโตไลสท โดยเชื้อ

Candida utilis TISTR 5001 ในอาหาร FM

ครั้งที่	ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)
1	7.51	46.94
2	7.42	46.38
3	7.69	48.06
เฉลี่ย	7.54	47.79

2. ในอาหาร YM

$$\text{ครั้งที่ 1 ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{[0.1030 \times (45.5 - 0.55) \times 0.0014 \times 100]}{0.1 \times 1.0371}$$

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \text{ร้อยละ } 6.25$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = \text{ร้อยละ } 39.06$$

$$\text{ครั้งที่ 2 ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{[0.1030 \times (46.3 - 0.55) \times 0.0014 \times 100]}{0.1 \times 1.0370}$$

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \text{ร้อยละ } 6.36$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = \text{ร้อยละ } 39.75$$

$$\text{ครั้งที่ 3 ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{[0.1030 \times (46.8 - 0.55) \times 0.0014 \times 100]}{0.1 \times 1.0389}$$

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \text{ร้อยละ } 6.42$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = \text{ร้อยละ } 40.13$$

ตารางที่ ข-2 แสดงผลการทดลองหาปริมาณโปรตีนในยีสต์ออคโตไลสท โดยเชื้อ

Candida utilis TISTR 5001 ในอาหาร YM

ครั้งที่	ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)
1	6.25	39.06
2	6.36	39.75
3	6.42	40.13
เฉลี่ย	6.34	39.65

หมายเหตุ ทำการทดลองโดย นางสาวชญานุช จิตต์อารีย์เทพ, นางสาวธีรนนท์ อิมจิตต์

และนางสาวนนท์รัต จารุทโรภาสน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-3 แสดงผลการทดลองหาปริมาณโปรตีนในยีสต์อโตไลเซส โดยเชื้อ
Candida utilis TISTR 5046 ในอาหาร FM

ครั้งที่	ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)
1	7.11	44.41
2	7.21	45.08
3	7.52	47.00
เฉลี่ย	7.28	45.50

ตารางที่ ข-4 แสดงผลการทดลองหาปริมาณโปรตีนในยีสต์อโตไลเซส โดยเชื้อ
Candida utilis TISTR 5046 ในอาหาร YM

ครั้งที่	ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)
1	6.18	38.64
2	6.39	39.94
3	6.40	40.01
เฉลี่ย	6.32	39.53

4. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วย HPLC

4.1 สภาพที่ใช้ในวิเคราะห์กรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC

สภาพที่ใช้ในวิเคราะห์กรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

คอลัมน์ : Inertsil C8-3

เฟสเคลื่อนที่ : กรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์

อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ : 20 ไมโครลิตรเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อ 1

ตัวอย่าง : 30 นาที

เครื่องตรวจสอบ : เครื่อง UV visible ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

การเตรียมตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ : ตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้มาจากส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงจากตัวอย่างที่เก็บเพื่อทำการวิเคราะห์ทุกชั่วโมง กรองส่วนใสผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อนการวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วย HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

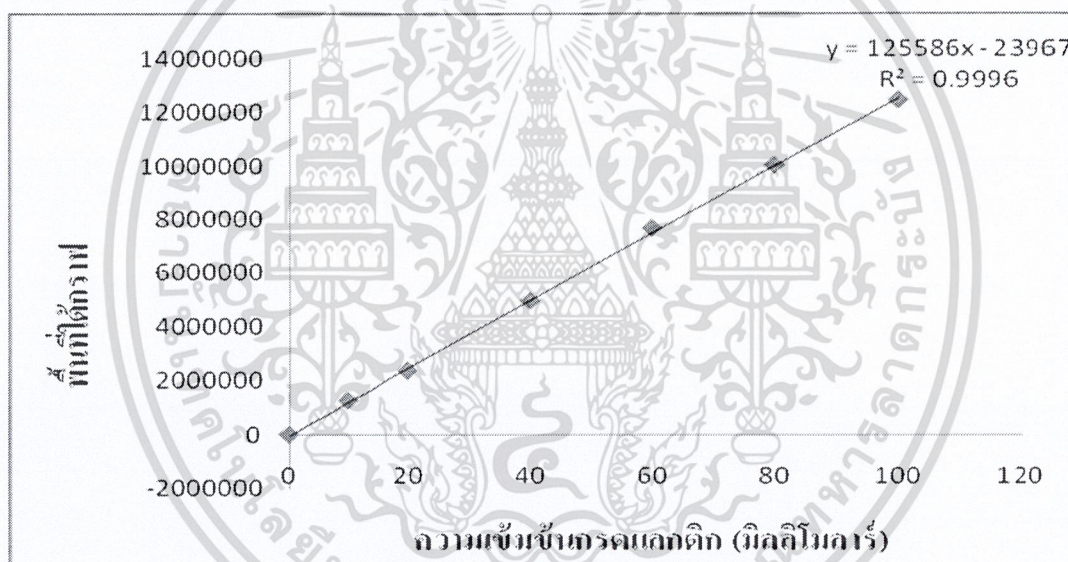
4.2 ขั้นตอนและวิธีทำ

4.2.1 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

นำสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.056 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นกรองกรดซัลฟิวริกผ่านเซลลูโลสเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วทำการไล่อากาศออกด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 30 นาที

4.2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแลกติก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแลกติกความเข้มข้น 10,20,40,60,80 และ 100 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดแลกติกโดยคำนวณความเข้มข้นของกรดแลกติกมาตรฐานที่มีหน่วยมิลลิโมลาร์เป็นหน่วยกรัมต่อลิตร



รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐานกรดแลกติก

4.2.3 ขั้นตอนการใช้เครื่อง HPLC

4.2.3.1 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

- เปิดทุกยูนิตของ HPLC
- ยก Sinker ใส่ในขวดของเฟสเคลื่อนที่
- เปิด Drain ของปั๊มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั๊ม
- ให้สังเกตว่าในสายยางของ Sinker มีฟองอากาศอยู่หรือไม่ ถ้า

ยังมีให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้เอกสารอันปั๊มหยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ปั๊มหยุดทำงานไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดเปิด Drain valve ที่ปั๊มข้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตั้งค่าอัตราการไหล ค่าความดันสูงสุด และค่าความดันที่ต่ำสุด
ที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับปั๊ม (ค่าความดันสูงสุดคือความดันที่คอลัมน์สามารถรับได้สูงสุด)

- ตั้งพารามิเตอร์ให้กับเครื่องตรวจสอบ
- ตั้งปั๊มทำงานตามสถานะที่ใช้วิเคราะห์

4.2.3.2 ขั้นตอนการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

- ปิดปั๊ม HPLC
- เทเฟสเคลื่อนที่ใหม่ลงในบีกเกอร์
- เปิด Drain ของปั๊มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั๊ม
- ยก Sinker ออกจากเฟสเคลื่อนที่เก่า แล้วจุ่มในบีกเกอร์ที่มีเฟสเคลื่อนที่ใหม่อยู่รอจนปั๊มดูดเฟสเคลื่อนที่ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20 - 30 มิลลิลิตร

- ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของ Sinker ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาด แล้วนำ Sinker จุ่มลงในเฟสเคลื่อนที่ใหม่

- ในระหว่างขั้นตอนที่ 1-5 ถ้าปั๊มหยุดทำงาน ให้กดปุ่ม Purge อีกครั้ง ให้สังเกตว่าในสายยางของ Sinker มีฟองอากาศอยู่หรือไม่ ถ้ายังมีให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด

- เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจนปั๊มหยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ปั๊มหยุดทำงาน

- ปิด Drain valve ที่ปั๊ม แล้วตั้งปั๊มทำงานตามสถานะที่ใช้วิเคราะห์

4.2.3.3 ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง

- ตรวจสอบสถานะของเครื่องแสดงผลให้อยู่ในสถานะ Ready
- ตรวจสอบให้แน่ใจว่าเครื่องตรวจสอบอยู่ในสถานะ Ready
- รอจน baseline ก่อนข้างนี้
- ถ้า baseline นี้สูงกว่าศูนย์เล็กน้อยสามารถตั้งศูนย์อัตโนมัติ

โดยกด Z ทำการฉีดตัวอย่าง

4.2.3.4 ตัวอย่างการฉีด HPLC

- ล้างเข็มฉีดตัวอย่างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง
- ล้างเข็มตัวอย่างด้วยตัวอย่างที่ต้องการจะฉีด 3 ครั้ง ดูดตัวอย่างโดยไม่มีฟองอากาศในเข็มฉีดตัวอย่างแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ตามที่จะฉีดเข้าระบบ HPLC
- แทะเข็มเข้าไปใน inject ให้สุดโดย injector ต้องอยู่ในตำแหน่ง

Load

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- นิด Sample เข้าไปใน Sample loop ของ injector (ถ้าต้องการ fill sample ให้เต็มลูป ต้องฉีดตัวอย่างมากกว่า valumn ของ loop ≥ 5 เท่า)
- เมื่อ HPLC system พร้อมให้ปิด injector มาที่ตำแหน่ง inject (กรณีไม่มี AUTO - START ให้กดปุ่ม START ที่ C-R7)
- รอประมาณ 5-10 วินาที และดึงเข็มตัวอย่างออกจาก injector
- ล้าง injector ด้วยน้ำกลั่น 5 - 10 มิลลิลิตร

4.3 ขั้นตอนการปิดเครื่อง

- หลังจากฉีดตัวอย่างสุดท้ายเสร็จแล้ว ให้ run เฟสเคลื่อนที่ต่ออีกประมาณ 30 นาที
- ล้างปั๊ม
- ปิดเครื่อง HPLC แล้วยก Sinker ให้พื้นเฟสเคลื่อนที่

4.4 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

- RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที
- RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เก็บคอลัมน์ 30 นาที
- ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

4.5 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีต้องหยุดมากกว่า 1 เดือน)

- RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที
- RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เก็บคอลัมน์ 1 ชั่วโมง
- หยุดปั๊มแล้วถอดคอลัมน์ออกจากระบบแล้วต่อ pipe เปล่า แทนที่จะปิดคอลัมน์

ด้วย plug ให้แน่น

- เปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็น 70 เมทานอล (MeOH) แล้ว RUN เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมง
- ปิดปั๊มและเปิดเครื่อง HPLC ยูนิต
- ยก Sinker ออกจากขวด เฟสเคลื่อนที่ แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

4.6 ขั้นตอนการใช้งาน C-R7A

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

- กด win 1 จะปรากฏหน้าจอ MENU ของ WIN1 เลือกข้อ 2 ตามด้วย ENTER จะปรากฏ g เลือก L เพื่อเรียก Analysis File ที่เคยสร้าง File เก็บไว้, F ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูก Load ขึ้นมาใช้งาน, R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่าใน Analysis File ที่ Load ขึ้นมาใช้งานอยู่, A ในกรณีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการสร้าง Analysis File ใหม่

- เลือก E เพื่อปรากฏหน้าจอ Analysis File

- แก้ไขพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้

WIDTH	5
DRIFT ($\mu\text{V}/\text{min}$)	0
และ T.DBL (min)	1000

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

Part	1:
File Name	2:

กำหนด Drive และชื่อ Analysis File ตามที่ต้องการตรงตำแหน่ง File Name ตามด้วย Enter เช่น

Part	1:
File Name	2: ACID

หลังจากการ Save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN1 ตั้งชื่อ File สำหรับ Save ข้อมูลของ Chromatogram เลือกตามข้อ 3 ตามด้วย ENTER จะปรากฏ

Chromatogram Storage Mode [s: set R: reset C: Chanal 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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

- เลือก R เมื่อต้องการยกเลิกการตั้งชื่อข้างต้น
 C ยกเลิกการ Save ของโครมาโตแกรมสุดท้าย
 A เมื่อต้องการให้เครื่อง Save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

- เลือกข้อ 1 จากหน้าจอ MENU ของ WIN1 จากนั้นรอรจนสังเกตเห็นเส้น BASE LINE ก่อนข้างเรียบจากนั้นทำการ Zero สัญญาณจาก Detector โดยกดปุ่ม ZERO สัญญาณจาก Detector จนกว่าจะสามารถ set 0 ที่ Detector ได้

- ทำการ test slope ของสัญญาณที่ส่งมาโดยกด S ที่เครื่อง C-R7A เครื่องจะใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 10 เท่าของค่า Width ที่ตั้งไว้ใน Analysis File หลังจากการทดสอบสิ้นสุดค่า slope ที่ได้จะถูก Save ใน Analysis File อัตโนมัติถ้าต้องการแก้ไขให้กลับเข้าสู่หน้า MENU ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis File

- เมื่อ Base line นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณและให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START ในกรณีที่เครื่อง C-R7A สามารถเชื่อมต่อและควบคุมการทำงานของ HPLC จะได้สามารถขอลูค่าต่าง ๆ ของเครื่อง HPLC ผ่านเครื่อง C-R7A ได้จากหน้า MENU ของ WIN1 โดยเลือกข้อ 7: LC Monitor ตามด้วย ENTER

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

5.1 การเจือจางเชื้อเริ่มต้นก่อนการเพาะเลี้ยง

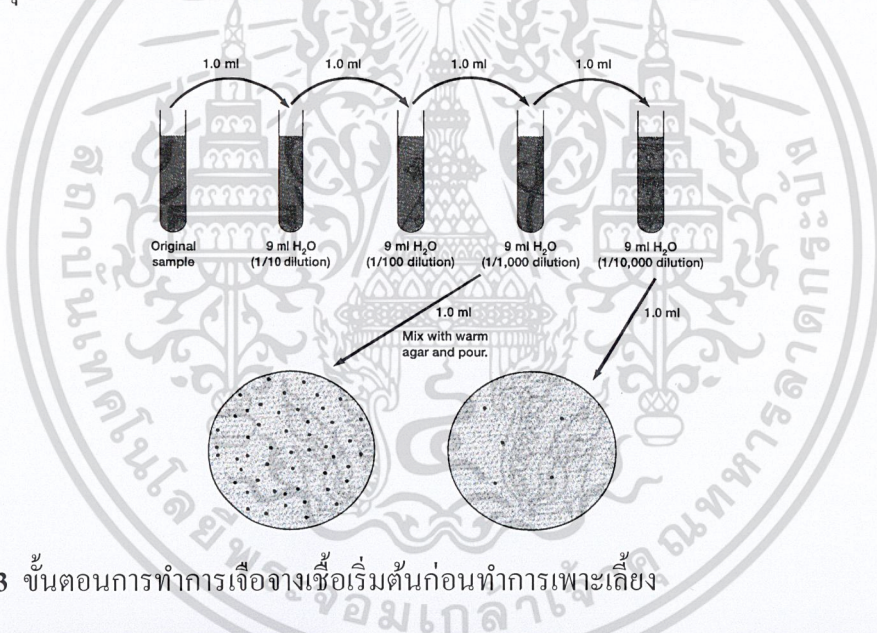
การนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมวุ้น (agar media) มาใช้ตั้งแต่ปลายทศวรรษที่ 1800 ทำให้เกิดการพัฒนาวีธีการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนโคโลนี วิธีการดังกล่าวมีพื้นฐานจากข้อสมมติ 3 อย่างคือ (1) เซลล์จุลินทรีย์หนึ่งเซลล์เจริญและแบ่งตัวเพื่อสร้างโคโลนีเดี่ยว (2) เชื้อ จุลินทรีย์เริ่มต้น (original inoculum) มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) และ (3) ไม่มีเซลล์ใด ๆ ที่อยู่รวมกัน (no aggregate) วิธีนี้ทำงาน นับจำนวนได้ดีแม้ว่าจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำ (sensitive) และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งจากตัวอย่างอาหาร น้ำ และดิน ในการนับเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารมีความสำคัญ คือ ต้องมีจำนวนไม่มากหรือน้อยเกินไป โดยทั่วไปจะนับเฉพาะจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25 - 250 เซลล์เท่านั้น

ดังนั้นเพื่อให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารอยู่ในช่วงดังกล่าว ควรทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้น
 ไม่กี่ครั้ง โดยทั่วไปทำเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า (serial dilution) (รูปที่ ๗-3) แล้วทำการเพาะใช้

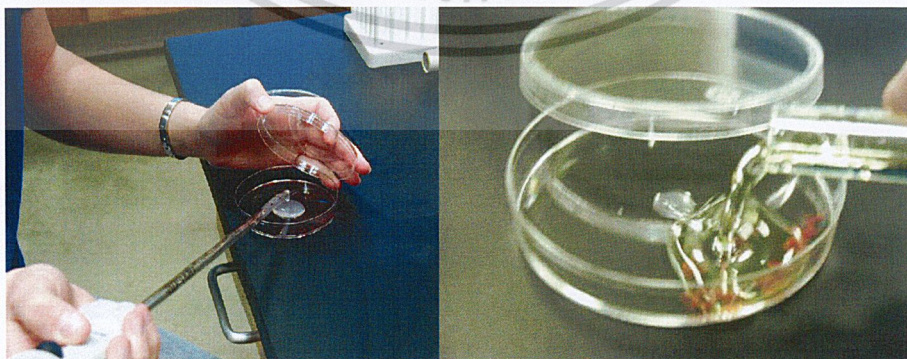
เชื้อจุลินทรีย์ที่แต่ละระดับการเจือจางลงบนจานอาหาร เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนจานอาหารแล้ว นับจำนวน ทำการคำนวณหาจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมล.ของตัวอย่างได้ การรายงานผลมักรายงาน เป็น colony forming unit (CFU) มากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ เนื่องจากไม่สามารถบอกได้อย่างแน่นอน ชัดเจนว่า 1 โคโลนีมาจาก 1 เซลล์

5.2 ขั้นตอนการ pour plate

เมื่อตัวอย่างถูกเจือจางลงระดับละ 10 เท่า ทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างที่มีระดับการเจือจางเหมาะสม โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 มล.หรือ 0.1 มล.หยดไปบนจานอาหารแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 44 - 46 องศาเซลเซียส ลงไป ผสมเชื้อจุลินทรีย์กับให้เข้าอาหารโดยแกว่งจานอาหารไป-มาเบาๆ (รูปที่ ข-4) ทิ้งให้อาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่ม ภายหลังบ่มแล้วโคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญทั้งในและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ 25 - 250 เซลล์ ก็จะทำได้สามารถคำนวณหาเชื้อจุลินทรีย์ต่อมล.หรือต่อกรัมตัวอย่างได้ วิธีนี้หากใช้菌株ที่ร้อนไปอาจทำให้ sensitive cell ตายหรือบาดเจ็บไม่สามารถสร้างโคโลนีได้



รูปที่ ข-3 ขั้นตอนการทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นก่อนทำการเพาะเลี้ยง



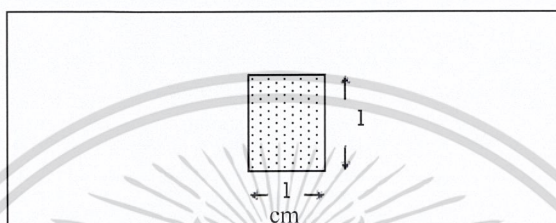
รูปที่ ข-4 วิธีการ pour plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 การนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยตรง (direct count)

วิธีนี้เป็นการนับจำนวนโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ มีหลายวิธี คือ

5.3.1 การนับเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการตรึงและย้อมสี (stained film) วิธีนี้เป็นการนับเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร ที่ถูกตรึงและย้อมสีอยู่บนสไลด์ภายในพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร วิธีนี้มีข้อดีตรงที่ทำง่าย รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ไม่แพง แต่มีข้อเสียตรงที่เป็นการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total count) ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต นอกจากนี้ตัวอย่างที่จะตรวจนับต้องมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมาก



รูปที่ ข-5 พื้นที่ภายในแผ่นสไลด์

5.3.2 การนับเชื้อบนสไลด์ที่มี counting chamber สไลด์ที่มี counting chamber ได้แก่

- Petroff - Hauser counting chamber นิยมใช้นับจำนวนแบคทีเรีย
- Haemocytometer ใช้นับ eucaryotic microbe ที่มีขนาดใหญ่

สไลด์พวกนี้จะมีแอ่ง (chamber) ซึ่งรู้ความลึกของ chamber และที่พื้นของ chamber จะมีตารางสี่เหลี่ยมซึ่งทราบความกว้างความยาวของตารางสี่เหลี่ยม ดังนั้นเมื่อหยดเชื้อจุลินทรีย์ลงไป ใน chamber ที่มี cover glass ปิดอยู่ ตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400X ในสี่เหลี่ยมลูกบาศก์เล็ก ก็จะทำให้สามารถคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรของตัวอย่างได้ สำหรับข้อดีข้อเสียของ counting chamber จะเหมือนกับนับด้วยวิธี stained film

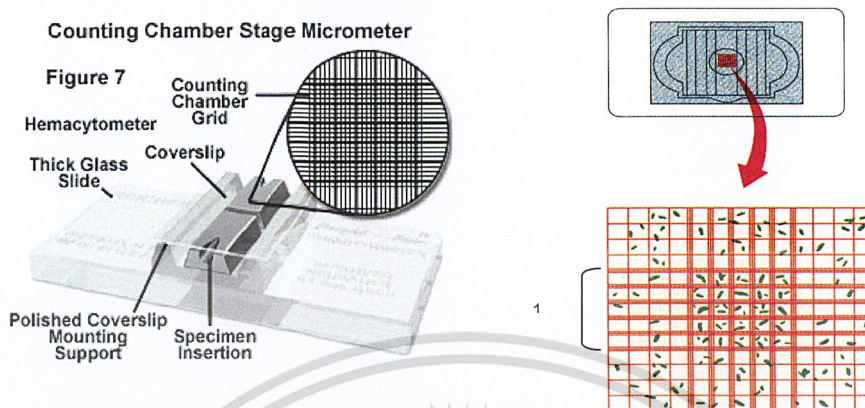


รูปที่ ข-6 Petroff - Hauser counting chamber

การนับเชื้อจุลินทรีย์ใช้กำลังขยาย objective lens 40X (รูปที่ ข-7) ถ้าเป็นเชื้อแบคทีเรียให้นับช่องที่มีความยาวด้านละ 0.05 มิลลิเมตร และควรเจือจางให้มีแบคทีเรีย 1-10 เซลล์

ในแต่ละช่องเล็ก และนับ ไม่น้อยกว่า 10 ช่อง ถ้าเป็นยีสต์หรือจุลินทรีย์ขนาดใหญ่ ให้ใช้ช่องใหญ่ที่มีไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความยาวด้านละ 0.2 มิลลิเมตร การนับให้นับเฉพาะเซลล์ที่แตะหรือทับด้านบนหรือด้านขวาของสี่เหลี่ยมจัตุรัส แต่จะไม่นับเซลล์ใดก็ตามที่แตะหรือทับด้านล่างและทางซ้ายมือของสี่เหลี่ยมจัตุรัส



รูปที่ ข-7 (ก) ภาพที่มองจากด้านบนของ chamber มีตารางอยู่กลางสไลด์

(ข) ภาพขยายของตารางที่กำลังขยาย 10X ประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่แต่ละด้านยาว 1 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กบรรจุอยู่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีเส้น 3 เส้นล้อมรอบโดยแต่ละด้านยาว 0.2 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเล็กบรรจุอยู่อีก 16 ช่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลการทดลอง

1. ผลการทดลอง

1.1 ผลการศึกษาปริมาณยีสต์ต่อโตนไลเสทที่เหมาะสม เพื่อผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ

Lactobacillus delbrueckii ATCC 33409

ตารางที่ ค - 1 อาหาร MM₁ (กลูโคส + ยีสต์ต่อโตนไลเสท 5 กรัมต่อลิตร)

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาล ที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	ความเข้มข้นกรด แลกติก (กรัม/ลิตร)
0	6.30	40.20	0.00	0.82
24	4.04	33.52	16.63	2.91
48	5.14	30.71	23.62	8.72
60	4.92	27.66	31.20	4.16
72	4.85	24.75	38.44	7.31
84	4.94	18.21	54.70	14.61
96	4.94	17.08	57.52	15.15
120	5.02	10.92	72.83	19.93

ตารางที่ ค - 2 อาหาร MM₂ (กลูโคส + ยีสต์ต่อโตนไลเสท 10 กรัมต่อลิตร)

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาล ที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	ความเข้มข้นกรด แลกติก (กรัม/ลิตร)
0	6.34	37.27	0.00	0.71
24	4.39	29.18	21.71	2.45
48	4.32	29.09	21.95	7.42
60	4.86	29.56	20.70	4.70
72	4.51	25.76	30.89	11.06
84	4.81	24.26	34.90	9.97
96	4.78	23.19	37.78	13.93
120	4.87	18.88	49.35	13.00

ตารางที่ ค - 3 อาหาร MM₃ (กลูโคส + ยีสต์ออกโตไลเอส 15 กรัมต่อลิตร)

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาล ที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	ความเข้มข้นกรด แลกติก (กรัม/ลิตร)
0	6.32	42.12	0.00	0.90
24	4.02	32.15	23.67	3.75
48	4.03	29.85	29.14	6.96
60	4.78	28.16	33.14	10.69
72	4.60	27.25	35.30	7.92
84	4.57	22.77	45.95	9.29
96	4.39	21.66	48.59	7.76
120	4.45	17.92	57.45	12.55

1.2 ผลการศึกษาและเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

ตารางที่ ค - 4 อาหาร MM₄ (กากน้ำตาล + ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร)

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาล ที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	ความเข้มข้นกรด แลกติก (กรัม/ลิตร)
0	6.11	33.70	0.00	13.47
24	4.70	29.29	13.07	21.13
48	4.25	18.87	44.00	29.82
60	4.11	17.82	47.12	34.46
72	4.29	15.61	53.68	38.18
84	4.12	15.50	54.00	42.17
96	4.29	13.50	59.94	51.36
120	4.29	13.24	60.71	38.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค - 5 อาหาร MM₅ (กากน้ำตาล + ยีสต์ออกโตไลเสท 5 กรัมต่อลิตร)

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาล ที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	ความเข้มข้นกรด แลกติก (กรัม/ลิตร)
0	6.04	34.95	0.00	9.90
24	5.19	26.72	23.55	12.98
48	4.98	26.22	24.97	25.73
60	4.96	25.01	28.44	25.57
72	4.82	23.30	33.34	12.75
84	4.61	22.15	36.62	29.93
96	4.62	21.80	37.68	30.91
120	4.69	14.92	58.31	35.85

ตารางที่ ค - 6 อาหารชุดควบคุม (กลูโคส + ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร)

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้นน้ำตาล ที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้น้ำตาล	ความเข้มข้นกรด แลกติก (กรัม/ลิตร)
0	6.54	42.42	0.00	3.58
24	5.07	26.55	37.43	9.48
48	4.83	17.13	59.62	7.93
60	4.48	11.54	72.81	35.70
72	4.76	7.20	83.04	26.73
84	4.20	4.04	90.48	24.95
96	4.65	3.36	92.08	23.63
120	4.07	1.61	96.20	23.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ศึกษาศักยภาพของการผลิตกรดแลกติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับถัง

หมักขนาด 2 ลิตร

ตารางที่ ค - 7 อาหารกากน้ำตาล + ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร (พลาสติก)

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้น น้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้ น้ำตาล	ความเข้มข้น กรดแลกติก (กรัม/ลิตร)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml)
0	6.08	39.52	0.00	10.88	1.65×10^6
12	5.12	37.52	5.06	14.62	3.00×10^6
24	4.58	36.94	6.52	17.21	3.15×10^6
36	4.38	34.12	13.65	17.28	1.53×10^7
48	4.32	30.53	22.74	23.57	6.05×10^7
60	4.27	27.10	31.43	26.89	9.30×10^7
72	4.38	26.72	32.39	28.32	1.11×10^8
84	4.20	26.38	33.24	29.74	1.17×10^8
96	4.11	26.10	33.95	31.71	1.26×10^8
108	4.15	22.42	43.25	32.67	1.29×10^8
120	4.12	16.93	57.16	36.37	1.98×10^8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค - 8 อาหารกาน้ำตาล + ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร (ถึงหมัก)

ชั่วโมงที่	พีเอช	ความเข้มข้น น้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	% การใช้ น้ำตาล	ความเข้มข้น กรดแลกติก (กรัม/ลิตร)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml)
0	5.93	37.86	0.00	10.40	3.06×10^6
12	6.17	33.30	9.39	10.91	5.20×10^7
24	6.23	31.79	16.02	16.71	6.45×10^7
36	6.42	25.29	33.19	19.09	8.55×10^7
48	6.45	25.01	33.94	28.51	8.95×10^7
60	6.45	21.58	43.01	27.61	1.35×10^8
72	6.45	13.23	65.06	27.33	1.40×10^8
84	6.45	12.86	66.03	38.61	2.24×10^8
96	6.45	10.90	71.21	43.16	2.58×10^8
108	6.45	8.88	76.55	33.97	2.10×10^8
120	6.45	7.71	79.63	33.14	1.70×10^8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย และค่าทางสถิติของผลการทดลอง โดยใช้โปรแกรม SPSS statistics 17.0

2.1 ผลการศึกษาปริมาณยีสต์ออกโตไลสที่ที่เหมาะสม เพื่อผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ

Lactobacillus delbrueckii ATCC 33409

- เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติก

Descriptives

Lactic acid

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
MM1	2	19.92600	.364867	.258000	16.64780	23.20420	19.668	20.184
MM2	2	13.92505	.242325	.171350	11.74784	16.10226	13.754	14.096
MM3	2	12.54530	.291752	.206300	9.92401	15.16659	12.339	12.752
Total	6	15.46545	3.517675	1.436085	11.77388	19.15702	12.339	20.184

ANOVA

Lactic acid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	61.593	2	30.797	333.575	.000
Within Groups	.277	3	.092		
Total	61.870	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Lactic acid

Duncan^a

treatment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MM3	2	12.54530		
MM2	2		13.92505	
MM1	2			19.92600
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

- เปรียบเทียบร้อยละของน้ำตาลที่เหลือ

Descriptives

residue sugar

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
MM1	2	27.17300	1.118643	.791000	17.12239	37.22361	26.382	27.964
MM2	2	62.22200	2.913280	2.060000	36.04722	88.39678	60.162	64.282
MM3	2	42.55500	2.798729	1.979000	17.40942	67.70058	40.576	44.534
Total	6	43.98333	15.824818	6.460455	27.37621	60.59046	26.382	64.282

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

residue sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1234.553	2	617.276	105.389	.002
Within Groups	17.571	3	5.857		
Total	1252.124	5			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

residue sugar

Duncan^a

treatment	Subset for alpha = 0.05			
	N	1	2	3
MM1	2	27.17300		
MM3	2		42.55500	
MM2	2			62.22200
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 อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เปรียบเทียบค่าพีเอช

Descriptives

pH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
MM1	2	5.0150	.00707	.00500	4.9515	5.0785	5.01	5.02
MM2	2	4.7750	.00707	.00500	4.7115	4.8385	4.77	4.78
MM3	2	4.4450	.00707	.00500	4.3815	4.5085	4.44	4.45
Total	6	4.7450	.25603	.10452	4.4763	5.0137	4.44	5.02

ANOVA

pH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.328	2	.164	3276.000	.000
Within Groups	.000	3	.000		
Total	.328	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

pH

Duncan^a

treatment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MM3	2	4.4450		
MM2	2		4.7750	
MM1	2			5.0150
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

- เปรียบเทียบผลได้กรดแลกติก

Descriptives

Yield

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					MM1	2		
MM2	2	.98900	.016971	.012000	.83653	1.14147	.977	1.001
MM3	2	.51850	.012021	.008500	.41050	.62650	.510	.527
Total	6	.72933	.214057	.087388	.50469	.95397	.510	1.001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

Yield

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.229	2	.114	594.084	.000
Within Groups	.001	3	.000		
Total	.229	5			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Yield					
Duncan ^a	treatment	Subset for alpha = 0.05			
		N	1	2	3
	MM3	2	.51850		
	MM1	2		.68050	
	MM2	2			.98900
	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 อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เปรียบเทียบอัตราการผลิต

Descriptives

Productivity

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
MM1	2	.16600	.002828	.002000	.14059	.19141	.164	.168
MM2	2	.14500	.002828	.002000	.11959	.17041	.143	.147
MM3	2	.10450	.002121	.001500	.08544	.12356	.103	.106
Total	6	.13850	.028034	.011445	.10908	.16792	.103	.168

ANOVA

Productivity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.004	2	.002	286.024	.000
Within Groups	.000	3	.000		
Total	.004	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Productivity

Duncan^a

treatment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MM3	2	.10450		
MM2	2		.14500	
MM1	2			.16600
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

2.2 ผลการศึกษาและเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

- เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติก

Descriptives

Lactic acid

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
MM4	2	51.36000	1.004092	.710000	42.33859	60.38141	50.650	52.070
MM5	2	35.85000	.523259	.370000	31.14870	40.55130	35.480	36.220
SM	2	35.69500	2.566798	1.815000	12.63324	58.75676	33.880	37.510
Total	6	40.96833	8.146836	3.325932	32.41875	49.51791	33.880	52.070

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

Lactic acid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	323.984	2	161.992	61.747	.004
Within Groups	7.870	3	2.623		
Total	331.855	5			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

		Lactic acid		
treatment	N	Subset for alpha = 0.05		Sig.
		1	2	
SM	2	35.69500		
MM5	2	35.85000		
MM4	2		51.36000	
Sig.		.930		1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เปรียบเทียบร้อยละของน้ำตาลที่เหลือ

Descriptives

residue sugar

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
MM4	2	40.06300	.209304	.148000	38.18248	41.94352	39.915	40.211
MM5	2	42.68900	.572756	.405000	37.54299	47.83501	42.284	43.094
SM	2	27.18950	1.683621	1.190500	12.06276	42.31624	25.999	28.380
Total	6	36.64717	7.462502	3.046554	28.81575	44.47858	25.999	43.094

ANOVA

residue sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	275.238	2	137.619	128.759	.001
Within Groups	3.206	3	1.069		
Total	278.445	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

residue sugar

Duncan^a

treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
SM	2	27.18950	
MM4	2		40.06300
MM5	2		42.68900
Sig.		1.000	.085

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

- เปรียบเทียบค่าพิเศษ

Descriptives

pH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
MM4	2	4.2850	.00707	.00500	4.2215	4.3485	4.28	4.29
MM5	2	4.6850	.00707	.00500	4.6215	4.7485	4.68	4.69
SM	2	4.4750	.00707	.00500	4.4115	4.5385	4.47	4.48
Total	6	4.4817	.17904	.07309	4.2938	4.6696	4.28	4.69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

pH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.160	2	.080	1601.333	.000
Within Groups	.000	3	.000		
Total	.160	5			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

treatment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MM4	2	4.2850		
SM	2		4.4750	
MM5	2			4.6850
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 อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เปรียบเทียบผลได้กรดแลกติก

Descriptives

Yield

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
MM4	2	2.84000	.056569	.040000	2.33175	3.34825	2.800	2.880
MM5	2	1.79000	.028284	.020000	1.53588	2.04412	1.770	1.810
SM	2	1.15500	.077782	.055000	.45616	1.85384	1.100	1.210
Total	6	1.92833	.762454	.311271	1.12819	2.72848	1.100	2.880

ANOVA

Yield

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.897	2	1.448	432.333	.000
Within Groups	.010	3	.003		
Total	2.907	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Yield

Duncan^a

treatment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
SM	2	1.15500		
MM5	2		1.79000	
MM4	2			2.84000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

- เปรียบเทียบอัตราการผลิต

Descriptives

productivity

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
MM4	2	.53500	.007071	.005000	.47147	.59853	.530	.540
MM5	2	.30000	.000000	.000000	.30000	.30000	.300	.300
SM	2	.59500	.049497	.035000	.15028	1.03972	.560	.630
Total	6	.47667	.141233	.057658	.32845	.62488	.300	.630

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

productivity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.097	2	.049	58.340	.004
Within Groups	.002	3	.001		
Total	.100	5			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

productivity

Duncan^a

treatment	N	Subset for alpha = 0.05		Sig.
		1	2	
MM5	2	.30000		
MM4	2			.53500
SM	2			.59500
Sig.		1.000		.129

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ศึกษาศักยภาพของการผลิตกรดแลกติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

- เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติก

T-Test

Group Statistics

treatment		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Lactic	พลาสติก	2	31.71450	.828022	.585500
acid	ถังหมัก	2	43.15650	1.983435	1.402500

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
Lactic acid	Equal variances assumed	3.078E16	.000
	Equal variances not assumed		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Independent Samples Test

	t-test for Equality of Means						
						95% Confidence Interval of the Difference	
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Lactic Equal variances assumed	-7.529	2	.017	-11.442000	1.519808	-17.981206	-4.902794
Equal variances not assumed	-7.529	1.338	.047	-11.442000	1.519808	-22.305975	-.578025

- เปรียบเทียบร้อยละของน้ำตาลที่เหลือ

T-Test

Group Statistics

	treatment	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
residue sugar	พลาสติก	2	66.05300	1.156827	.818000
	ถังหมัก	2	28.78800	.791960	.560000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
residue sugar	Equal variances assumed	2.006E15	.000
	Equal variances not assumed		

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means						
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
Lower	Upper							
residue sugar	Equal variances assumed	37.591	2	.001	37.265000	.991324	32.999676	41.530324
	Equal variances not assumed	37.591	1.769	.001	37.265000	.991324	32.417399	42.112601

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เปรียบเทียบค่าพีเอช

T-Test

Group Statistics

	treatment	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
pH	พลาสติก	2	4.1150	.00707	.00500
	ถังหมัก	2	6.4500	.00000	.00000

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means						
						95% Confidence Interval of the Difference		
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
pH	Equal variances assumed	-467.000	2	.000	-2.33500	.00500	-2.35651	-2.31349
	Equal variances not assumed	-467.000	1.000	.001	-2.33500	.00500	-2.39853	-2.27147

- เปรียบเทียบผลได้กรดแลกติก

T-Test

Group Statistics

	treatment	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Yield	พลาสติก	2	2.36500	.063640	.045000
	ถังหมัก	2	1.60100	.073539	.052000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
Yield	Equal variances assumed	1.269E14	.000
	Equal variances not assumed		

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means						
							95% Confidence Interval of the Difference	
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Yield	Equal variances assumed	11.110	2	.008	.764000	.068768	.468116	1.059884
	Equal variances not assumed	11.110	1.960	.009	.764000	.068768	.462193	1.065807

- เปรียบเทียบอัตราการผลิต

T-Test

Group Statistics

	treatment	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
productivity	พลาสติก	2	.33000	.014142	.010000
	ถังหมัก	2	.44950	.020506	.014500

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
productivity	Equal variances assumed	6.060E15	.000
	Equal variances not assumed		

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means						
							95% Confidence Interval of the Difference	
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
productivity	Equal variances assumed	-6.784	2	.021	-.119500	.017614	-.195287	-.043713
	Equal variances not assumed	-6.784	1.776	.028	-.119500	.017614	-.205239	-.033761

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เปรียบเทียบเซลล์ที่มีชีวิต

T-Test

Group Statistics

treatment	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
viabecell ฟลาสติก	2	1.26000E8	1.414214E6	1.000000E6
ถังหมัก	2	2.58000E8	7.071068E5	5.000000E5

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means						
						95% Confidence Interval of the Difference		
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
viable cell	Equal variances assumed	-118.064	2	.000	-1.320000E8	1.118034E6	-1.368105E8	-1.271895E8
	Equal variances not assumed	-118.064	1.471	.001	-1.320000E8	1.118034E6	-1.389185E8	-1.250815E8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้