รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความเสถียรของเม็ดเจลสำหรับเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยเพคตินจากใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ในการผลิตกรดแลกติก

The effect of ferric oxide (Fe_2O_3) on stability of the beads for pectin from Krung kha mao leaves (*Cissampelos pareira* L.) immobilized *Lactobacillus rhamnosus* TISTR 108 in lactic acid production

รศ. สุขใจ ชูฉันทร์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความเสถียรของเม็ดเจลสำหรับเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยเพคตินจากใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ในการผลิตกรดแลกติก

The effect of ferric oxide (Fe_2O_3) on stability of the beads for pectin from Krung kha mao leaves (*Cissampelos pareira* L.) immobilized *Lactobacillus rhamnosus* TISTR 108 in lactic acid production

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

หมู่.....
เลขทะเบียน 143538
วัน.เดือน.ปี 17 ส.ค. 2559

b 12792123
i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ผลของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความเสถียรของเม็ดเจลสำหรับเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยเพคตินจากใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ในการผลิตกรดแลกติก

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2556 **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน** 280,000 **บาท**

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 **ปี ตั้งแต่** ตุลาคม 2555 **ถึง** กันยายน 2556

หัวหน้าโครงการ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ **หน่วยงานต้นสังกัด** สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กทม. 10520 โทร. 02-329-8400-11 ต่อ 240 โทรสาร. 02-3294414 E-mail. Kcsukjai@Kmitl.ac.th

บทคัดย่อ

เมื่อทำการศึกษาศักยภาพของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กากน้ำตาลเป็นซับสเตรต พบว่าเม็ดเจลที่เติมเฟอร์ริกออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3, 4 และ 5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 29.45, 32.21 และ 31.77 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 36 และ 48 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกเฟอร์ริกออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 ในการศึกษา curing time ของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 พบว่าเม็ดเจลที่ผ่านการบ่ม (curing) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 33.39 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชที่ 6.5 พบว่าสามารถนำเม็ดเจลที่เติมเฟอร์ริกออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 กลับมาใช้ซ้ำได้ 8 รอบการหมัก โดยผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 35.99 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.750 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ 0.932 กรัมต่อกรัม ณ ชั่วโมงที่ 48

คำสำคัญ : เฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3), ใบกรุงเขมา, กรดแลกติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title The effect of ferric oxide (Fe_2O_3) on stability of the beads for pectin from Krung kha mao leaves (*Cissampelos pareira* L.) immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 in lactic acid production

Researcher Assoc.Prof.Sukjai Choojun

Faculty Faculty of Science **Department** Biotechnology

ABSTRACT

The effect of ferric oxide (Fe_2O_3) on stability of the beads for pectin from Krung kha mao leaves immobilized *L. casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 in lactic acid production using molasses as substrate was studied. The results showed that the beads added with 3 %, 4 % and 5 % Fe_2O_3 was produced 29.45, 32.21 and 31.77 g/l lactic acid at 36 and 48 h of fermentation, respectively, which were significantly different ($p \leq 0.05$). The curing time that influencing for lactic acid production by immobilized cells of *L. casei* TISTR 108 (added with 4 % Fe_2O_3) was optimized. The concentration of lactic acid was 33.39 g/l at 48 h of operation, after curing in the calcium chloride for 24 h. The conditions for lactic acid fermentation in 5 liters fermenter was controlled at 37 °C, 50 rpm of agitation rate and pH 6.5. The result was immobilization of *L. casei* TISTR 108 could be reuse up to 8 batch cycles and produced lactic acid concentration of 35.99 g/l, productivity of 0.750 $g/l.h^{-1}$ and yield of 0.932 g/g at 48 h.

Keywords : Ferric oxide (Fe_2O_3), Krung kha mao leaves, Lactic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยี-พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 และความช่วยเหลือ รวมถึงกำลังใจจากทุกท่านที่ให้การสนับสนุนเสมอมา จึงขอขอบพระคุณทุก ๆ ท่านที่ได้มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

หากรายงานการวิจัยฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่องผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากรายงานการวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VIII

สารบัญภาพ IX

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 กรดแลกติก 4

2.2 คุณสมบัติของกรดแลกติก 4

2.2.1 คุณสมบัติทางเคมี 4

2.2.2 คุณสมบัติทางกายภาพ 4

2.3 กระบวนการผลิตกรดแลกติก 6

2.3.1 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี 6

2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางชีวภาพ 6

2.4 แบคทีเรียผลิตกรดแลกติก 7

2.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย 8

2.5 การหมักกรดแลกติก 8

2.5.1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนต์เตตีฟ 8

2.5.2 การหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนต์เตตีฟ 9

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก 12

2.6.1 แหล่งคาร์บอน 12

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน 12

2.6.3 แหล่งแร่ธาตุ 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.4 อุณหภูมิ....13
2.6.5 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช)....14
2.6.6 การให้อากาศ....14
2.7 วัตถุดิบราคาถูกที่ใช้ในการทดลอง....15
2.7.1 กากน้ำตาล....15
2.8 การใช้ประโยชน์จากกรดแลกติก....17
2.8.1 การใช้ประโยชน์ในด้านเภสัชกรรม....17
2.8.2 การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร....18
2.8.3 การใช้ประโยชน์ในด้านเครื่องสำอาง....19
2.8.4 การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมไบโอพลาสติก....19
2.9 การผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม....23
2.9.1 วัตถุดิบ....23
2.9.2 กระบวนการหมัก....23
2.9.3 ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและการทำให้บริสุทธิ์....24
2.9.4 การประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์....25
2.10 การตรึงเซลล์....26
2.11 เพคติน....32
2.12 การสกัดเพคติน....37
2.13 กรุงเขมา....39
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย....43
3.1 อุปกรณ์การวิจัย....43
3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย....43
3.1.2 สารเคมี....44
3.2 วัตถุดิบ....44
3.2.1 การเก็บวัตถุดิบ....44
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย....44
3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย....45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ตรึง....45

3.4 อาหารสำหรับการผลิตกรดแลกติก....45

3.5 การสกัดเพคตินจากใบกรุงเขมา....46

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างใบกรุงเขมา....46

3.5.2 ขั้นตอนการสกัดเพคตินจากใบกรุงเขมา....46

3.6 การตรึงเซลล์....48

3.6.1 การตรึงเซลล์ด้วยเพคติน....48

3.7 ศึกษาศักยภาพของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร....48

3.8 ศึกษา curing time ของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร....48

3.9 ศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา กลับมาใช้ซ้ำ (cell recycling) เพื่อผลิตกรดแลกติก ในถังหมักขนาด 5 ลิตร....49

3.10 การวิเคราะห์ผลการทดลอง....49

3.11 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ....49

บทที่ 4 ผลการวิจัย....50

4.1 ผลการศึกษาศักยภาพของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร....50

4.2 ผลการศึกษา curing time ของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร....52

4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา กลับมาใช้ซ้ำ (cell recycling) เพื่อผลิตกรดแลกติก ในถังหมักขนาด 5 ลิตร....53

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ....57

บรรณานุกรม....58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก.....65
ภาคผนวก ก.....65
ภาคผนวก ข.....67
ภาคผนวก ค.....71
ภาคผนวก ง.....76
ประวัติผู้วิจัย.....93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก.....5

2.2 แสดงส่วนประกอบของ blackstrap molasses.....15

2.3 แสดงส่วนประกอบโดยประมาณของ hightest molasses.....16

2.4 เกลือแลกเตดที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรม.....17

2.5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่มีอยู่ในตลาด.....21

2.6 ระดับคุณภาพทางการค้า (commercial grade) ของกรดแลกติกและการนำไปใช้ประโยชน์.....25

4.1 แสดงผลของปริมาณเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจล ในการผลิตกรดแลกติก อัตราการผลิต ผลได้ และปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึง ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....50

4.2 แสดงผลของระยะเวลาการบ่มเม็ดเจลต่อปริมาณกรดแลกติก อัตราการผลิต และผลได้ ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบ เพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4).....53

4.3 แสดงผลของจำนวนรอบการหมักกรดแลกติก อัตราการผลิต และผลได้ ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบ เพคตินจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 3).....55

4.4 แสดงผลของจำนวนรอบการหมักกรดแลกติก อัตราการผลิต และผลได้ ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบ เพคตินจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4).....55

4.5 แสดงผลของจำนวนรอบการหมักกรดแลกติก อัตราการผลิต และผลได้ ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบ เพคตินจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 5).....56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างของกรดแลกติก....4

2.2 กลไกของการเกิดกรดแลกติกจากกรดไพรูวิก....5

2.3 เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108....8

2.4 แสดงวิถีเมแทบอลิซึมของการใช้น้ำตาลกลูโคสแบบโฮโมเฟอร์เมนต์เตตีฟ....10

2.5 แสดงวิถีเมแทบอลิซึมของการใช้น้ำตาลกลูโคสแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนต์เตตีฟ....11

2.6 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีกรดแลกติกเป็นส่วนผสมเพื่อทำหน้าที่ต่าง ๆ....19

2.7 กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกย่อยสลายได้จากวัตถุดิบมวลชีวภาพ....20

2.8 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม....25

2.9 การแบ่งชั้นของผนังเซลล์พืชและองค์ประกอบที่สำคัญในแต่ละชั้น....32

2.10 สูตรโครงสร้างของกรดกาแล็กทูโรนิกจากโมเลกุลของเพคติน....33

2.11 ลักษณะของโครงสร้างของเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำ....34

2.12 การเกิด junction zone ของเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลสูง....35

2.13 การเกิด junction zone ของเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำ....36

2.14 กรุงเขมา....39

3.1 ขั้นตอนการกรองแยกกากและสารละลายส่วนใสออกจากกันด้วยปั๊มสุญญากาศ....46

3.2 ขั้นตอนการนำสารละลายที่ได้จากการกรองมาระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ....46

3.3 ขั้นตอนการตกตะกอนเพคตินด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95....47

3.4 ตะกอนเพคตินที่ได้หลังจากตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95....47

3.5 สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาบดละเอียดขนาด 100 mesh....47

4.1 แสดงผลของปริมาณเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจล ในการผลิตกรดแลกติก และปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร....51

4.2 แสดงผลของ curing time ที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4)....53

4.3 แสดงจำนวนรอบของการหมักกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ....56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ตามธรรมชาติซึ่งได้มีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านเภสัชกรรม เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเคมี และอุตสาหกรรมอาหาร (Dumbrepatil และคณะ, 2008) กรดแลกติกถูกนำมาใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพ (biopreservative) ตามธรรมชาติในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์มานานแล้ว โดยจะเพิ่มอายุการเก็บรักษา (shelflife) ของอาหารให้นานขึ้นและพบว่ามีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เนื่องจากกรดแลกติกทำให้พีเอชของอาหารลดลง ซึ่งจะช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการงอกของสปอร์ อีกทั้งยังเป็นตัวช่วยเพิ่มกลิ่นรสของอาหารและเครื่องดื่มอีกด้วย นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารเสริมชีวนะ (probiotic) เพื่อช่วยปรับสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในลำไส้ของคนและสัตว์ ปัจจุบันกรดแลกติกมีบทบาทในอุตสาหกรรมการผลิตพอลิเมอร์ โดยใช้เป็นวัตถุดิบในรูปพอลิแลกติกแอซิด ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการชีวภาพ (biodegradable plastic) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Lorenzo และคณะ, 2005) เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (Panesar และคณะ, 2007)

กรดแลกติกสามารถผลิตได้ทั้งจากกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพ โดยกระบวนการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์พวกที่สร้างกรดแลกติก (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000) ซึ่งการผลิตกรดแลกติกโดยใช้วิธีทางเคมีนั้นจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสารผสมของ DL-Lactic acid ทำให้มีความยุ่งยากในการทำให้บริสุทธิ์ และยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้สูงขึ้นด้วย โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต คือ ผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีที่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้ผู้ผลิตจึงนิยมใช้กระบวนการผลิตกรดแลกติกทางชีวภาพ เนื่องจากสามารถเลือกรูปแบบ L(+)Lactic acid หรือ D(-)Lactic acid ที่บริสุทธิ์ได้เมื่อใช้จุลินทรีย์ที่เหมาะสม ซึ่งสามารถผลิตโครงสร้างที่ต้องการเพียงโครงสร้างเดียว จึงเป็นวิธีการผลิตที่นิยมมากกว่า เพราะวิธีการนี้สามารถผลิตกรดแลกติกได้อย่างรวดเร็วและผลิตได้ในปริมาณมาก อีกทั้งยังสามารถลดต้นทุนการผลิตโดยการนำวัตถุดิบที่เป็นผลิตผลพลอยได้ซึ่งมีราคาถูกจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลหรือของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติก เช่น กลีเซอรอล (Dholakiya, 2012), ซังข้าวโพด (Vishnu และคณะ, 2000), ชานอ้อย (Calabia และคณะ, 2007), หัวบีท (Kotzamanidis และคณะ, 2002), น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ (Marques และคณะ, 2008) มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อลดต้นทุนในการผลิตได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคการตรึงเซลล์เป็นหนึ่งในวิธีการเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกที่ได้มีการพัฒนาขึ้น เพื่อแก้ปัญหาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยกรดแลกติก (product inhibition) ซึ่งวิธีนี้จะช่วยป้องกันตัวเซลล์จากน้ำหมัก ทำให้เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากขึ้น นอกจากนี้การตรึงเซลล์ยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้ การตรึงเซลล์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในระบบการหมักจากจุลินทรีย์ จึงได้มีการนำวิธีนี้มาใช้ในกระบวนการผลิตกรดอินทรีย์ กรดอะมิโน เอนไซม์ แอลกอฮอล์ และยาปฏิชีวนะ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการใช้เซลล์ตรึงกับเซลล์อิสระพบว่า ระบบการใช้เซลล์ตรึงสามารถควบคุมกระบวนการหมักได้ง่ายกว่าการใช้เซลล์อิสระและให้ผลผลิตที่ดีกว่า อีกทั้งยังมีความคงตัวมากกว่าเซลล์อิสระ (Jianlong, 2000) วัสดุค้ำจุนส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการตรึงเซลล์ เช่น แอลจิเนตหรือคาราจีแนน แต่พบว่ามีปัญหาเรื่องความคงตัวของเม็ดเจลในการหมักระยะยาว ดังนั้นจึงได้มีการประยุกต์ใช้เพคตินที่อยู่ในรูปเพคเตตเจลมาเป็นวัสดุค้ำจุนในการตรึงเซลล์สำหรับการหมักกรดแลกติก พบว่ามีลักษณะดีมากเนื่องจากมีความคงตัวดีที่ค่าพีเอชต่ำ และสามารถยอมรับได้ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Panesar.PS และคณะ, 2007)

"กรุงเขมา" (*Cissampelos pareira* L.) หรือ "กรุงบาดาล" หรือ "หมาน้อย" หรือ "ใบก้นบิด" เป็นพืชเถาที่เลื้อยไปตามต้นไม้อื่น ไม่มีมือเกาะ อยู่ในวงศ์ *Menispermaceae* นอกจากนี้ยังเป็นพืชพื้นเมืองแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีคุณสมบัติพิเศษ คือ เมื่อนำมาขยี้กับน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จะเกิดการจับตัวเป็นก้อนที่มีลักษณะคล้ายเจลหรือวุ้นที่เรียกว่า วุ้นหมาน้อย ซึ่งคนภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารทั้งหวานและคาว อีกทั้งยังมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคและบำรุงร่างกาย ได้แก่ แก้ไข้ แก้ปวดท้อง แก้ร้อนใน แก้ช้ำใน บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย เป็นยาระบาย แก้ท้องร่วง และเป็นยาอายุวัฒนะ เป็นต้น (พะยอม ตันติวัฒน์, 2521 ; วุฒิ ธรรมเวช, 2540 ; ชยันต์ และคณะ, 2542) นอกจากนี้กรุงเขมายังเป็นพืชที่ได้รับความสนใจในการศึกษาเนื่องจากมีเพคติน ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นสารประกอบหรือส่วนประกอบในอุตสาหกรรมอาหารและการผลิตยาต่างๆ ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยในเรื่องการสกัดเพคตินจากใบกรุงเขมา และพบว่ามีปริมาณเพคตินประมาณร้อยละ 25-40 มีค่า DE (degree of esterification) ประมาณร้อยละ 41.7 จัดเป็นเพคตินชนิดที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำ (low-methoxyl pectin) (พิเชษฐ เทบำรุง, 2546 ; จีราภรณ์ สังข์ผุด, 2549 ; Singthong, 2005) เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิต และใช้ทรัพยากรทางธรรมชาติที่มีอยู่ให้คุ้มค่า จึงมีความน่าสนใจที่จะนำใบกรุงเขมามาสกัดเพื่อนำเพคตินมาใช้ประโยชน์เป็นวัสดุในการตรึงเซลล์ แต่ในขณะเดียวกันเมื่อทำการผลิตกรดแลกติกในถังหมัก พบว่าเม็ดเจลเกิดการแตกเนื่องจากเกิดแรงเฉือน (shearing force) จากใบพัดในถังหมักซึ่งมีผลต่อการศึกษาการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำ ทำให้จำนวนรอบของการหมักลดลง ส่งผลให้ผลผลิตกรดแลกติกลดลงด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาผลของการใช้เฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความเสถียรของเม็ดเจลสำหรับเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยเพคตินจากใบกรุงเขมาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาศักยภาพของไคเนติกส์พารามิเตอร์ (kinetic parameters) ของ ferric oxide (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจล

1.2.2 ศึกษา curing time ของเม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$ solution)

1.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ (cell recycling) เพื่อผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 เป็นการศึกษาศักยภาพของ ferric oxide (Fe_2O_3) ความเข้มข้น และความเป็นกรดด่างต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยเพคตินจากใบกรุงเขมา

1.3.2 เป็นการศึกษา curing time ของเม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ที่มีผลต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติก

1.3.3 เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ (cell recycling) เพื่อผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถประยุกต์ใช้เฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) มาใช้ประโยชน์ร่วมกับการตรึงเซลล์เพื่อพัฒนาศักยภาพในการผลิตกรดแลกติก

1.4.2 สามารถประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมามาใช้ในการตรึงเซลล์เชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 สำหรับการผลิตกรดแลกติก

1.4.3 สามารถผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต และลดปัญหาสิ่งแวดล้อม

1.4.4 สามารถเพิ่มมูลค่าของใบกรุงเขมา และลดการใช้เพคตินนำเข้าจากต่างประเทศ

1.4.5 สามารถนำมาเป็นแนวทางในการศึกษาและประยุกต์ใช้สำหรับการขยายขนาดการผลิตไปสู่ระดับอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตกรดแลกติกเชิงพาณิชย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดแลกติก

กรดแลกติกหรือกรดนมได้มีการค้นพบครั้งแรกโดย Scheele นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดน ในปี ค.ศ. 1780 ในนมเปรี้ยว และได้ตั้งชื่อว่า Mjolksyra ซึ่งเป็นกรดชนิดแรกๆ ที่มีการนำมาใช้ในอาหาร พบตามธรรมชาติและนมเปรี้ยว กะหล่ำปลี ผักดองชนิดต่างๆ เบียร์ และเนยแข็ง 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 ดังแสดงในภาพที่ 2.1

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

ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของกรดแลกติก

ที่มา : Akerberg และ Zacchi, 2000

2.2.2 คุณสมบัติทางกายภาพ

คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติกแสดงในตารางที่ 2.1

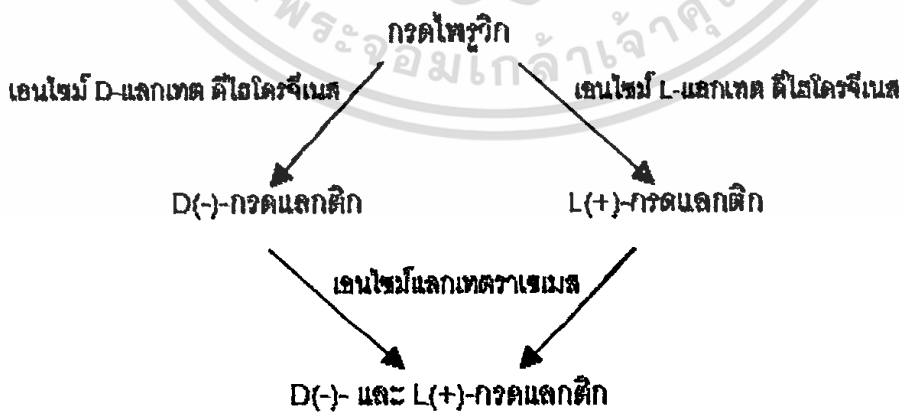
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)	$1.37x10^{-4}$
ค่าความร้อนของการเผาไหม้ (ΔH_c)	1.361 กิโลจูลต่อโมล (KJ/mol)
ค่าความร้อนจำเพาะ (C_p ที่ 20 องศาเซลเซียส)	190 จูลต่อโมลต่อองศาเซลเซียส (J/mol/°C)

ที่มา : Narayanan และคณะ, 2004

มนุษย์และสัตว์สามารถใช้กรดแลกติกในรูปของ L(+) เท่านั้น เพราะภายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์มีเฉพาะเอนไซม์ L- แลกเตตดีไฮโดรจีเนส (L- lactate dehydrogenase) ดังแสดงในภาพที่ 2.2 ดังนั้น มนุษย์และสัตว์จึงไม่สามารถใช้กรดแลกติกในรูปของ D(-) ได้ หากร่างกายมีการสะสมกรดแลกติกชนิด D(-) ในปริมาณมาก (เกิน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัมต่อ 1 วัน) จะส่งผลให้มีการสะสมของกรดแลกติกดังกล่าวในเลือดสูงขึ้น ทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า hyperacidity (Akerberg และ Zacchi, 2000)



ภาพที่ 2.2 กลไกของการเกิดกรดแลกติกจากกรดไพรูวิก

ที่มา : สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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) ได้แลกโตไนไตร์ (lactonitrile) ทำปฏิกิริยาที่ความดันบรรยากาศ ดังสมการที่ 2.1

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

อะซีทัลดีไฮด์ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ แลกโตไนไตร์

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

$$CH_3CHOHCN + \tfrac{1}{2}H_2SO_4 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + \tfrac{1}{2}(NH_4)_2SO_4 \quad \text{.....(2.2)}$$

แลกโตไนไตร์ กรดซัลฟิวริก กรดแลกติก เกลือแอมโมเนียม

ขั้นตอนที่ 3 นำกรดแลกติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ คือ เมทิล-แลกเตต (methyl lactate) นำเมทิลแลกเตตมากลั่นและย่อยจะได้กรดแลกติก ส่วนเมทานอลไฮโดรเจน-ไซนาไนด์ และสารปนเปื้อนอื่น ๆ จะถูกกำจัดออกโดยนำมาผ่านถ่านกัมมันต์ และการแลกเปลี่ยนไอออน ดังสมการที่ 2.3 และ 2.4

$$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \quad \text{.....(2.3)}$$

กรดแลกติก เมทานอล เมทิลแลกเตต

$$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \quad \text{.....(2.4)}$$

เมทิลแลกเตต กรดแลกติก เมทานอล

2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

การผลิตกรดแลกติกโดยใช้วิธีทางชีวภาพจะเริ่มที่การหมักน้ำตาลกลูโคสโดยจุลินทรีย์ และมีการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกลาง ได้ผลผลิตเป็นแคลเซียมแลกเตต แสดงดังสมการที่ 2.5

$$C_6H_{12}O_6 + Ca(OH)_2 \xrightarrow{\text{fermentation}} (2CH_3CHOHCOO^-)Ca^{2+} + 2H_2O \quad \text{.....(2.5)}$$

น้ำตาลกลูโคส แคลเซียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมแลกเตต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมแลกเตตจะถูกนำมากรองเพื่อกำจัดเซลล์ออก จากนั้นทำการแอซิดิฟายด์ (acidified) ด้วยกรดซัลฟิวริกจะได้กรดแลกติก และแคลเซียมซัลเฟต ดังสมการที่ 2.6

$$2(CH_3CHOHCOO^-)\,Ca^{2+} + H_2SO_4 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH + CaSO_4 \quad \text{.....(2.6)}$$

แคลเซียมแลกเตต กรดซัลฟิวริก กรดแลกติก แคลเซียมซัลเฟต

ทำการกำจัดแคลเซียมซัลเฟตออกโดยการกรอง จากนั้นนำกรดแลกติกมาทำให้บริสุทธิ์โดยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันและไฮโดรไลซิส ดังสมการที่ 2.7 และ 2.8

$$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \quad \text{.....(2.7)}$$

กรดแลกติก เมทานอล เมทิลแลกเตต

$$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \quad \text{.....(2.8)}$$

เมทิลแลกเตต กรดแลกติก เมทานอล

2.4 แบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

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

แลกติกแอซิดแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มโฮโมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (homolactic acid bactcria) แลกติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกได้มากกว่าร้อยละ 80 โดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis หรือ EMP pathway) จำนวนโมลของกรดแลกติกและพลังงานที่ได้มีค่าเท่ากับ 2 โมล (โมลของกรดแลกติกต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้) และ 2 โมล ATP ตามลำดับ

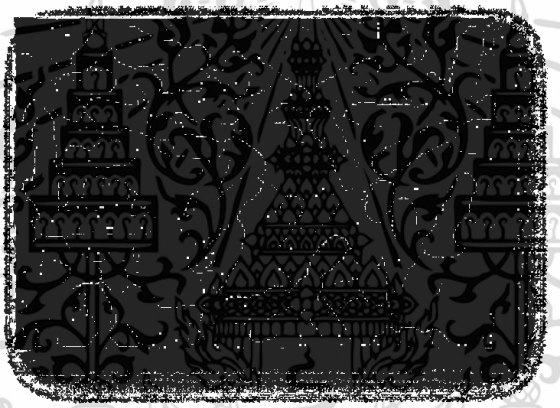
กลุ่มเฮเทอโรแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (heterolactic acid bacteria) จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยจำนวนโมลที่เท่ากัน โดยผ่านวิถีฟอสโฟ-คีโตเลส (phosphoketolase) (Axelsson, 1993) จำนวนโมลของกรดแลกติกและพลังงานที่ได้เท่ากับ 1 โมล (โมลของกรดแลกติกต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้) และ1โมล ATP ตามลำดับ ตัวอย่างของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แลกติกแอซิดแบคทีเรีย ได้แก่ *Lactocbacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Enterococcus* เป็นต้น (Stiles และ Hozapfel, 1997)

2.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย คือ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถทนกรดได้ ทนต่อสภาวะที่มีอากาศ มีรูปร่างเป็นท่อน เซลล์มีขนาด 0.7-1.1 × 2.0-4.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ต้องการสารอาหารปริมาณสูงในการเจริญเติบโต มีกระบวนการหมักแบบ homofermentative ได้ผลิตภัณฑ์หลัก คือ กรดแลกติก แบคทีเรียแลกติกสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นมดิบ นมหมัก ผักผลไม้ ลำไส้ของคนและสัตว์ ในอุตสาหกรรมมีการผลิตเพื่อเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกและใช้เป็นเชื้อตั้งต้นสำหรับอุตสาหกรรมนมหมัก เป็นต้น (Salminen และคณะ, 2004)



ภาพที่ 2.3 เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108
ที่มา : http://www.gutflora.org/science/news/news20081028.html

2.5 การหมักกรดแลกติก (Lactic Acid Fermentation)

กรดแลกติกเป็นผลิตผลในกระบวนการหมักกลูโคสของแบคทีเรียพวกที่สร้างกรดแลกติก กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสมี 2 แบบ คือ

2.5.1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนต์เตตีฟ (Homofermentative)

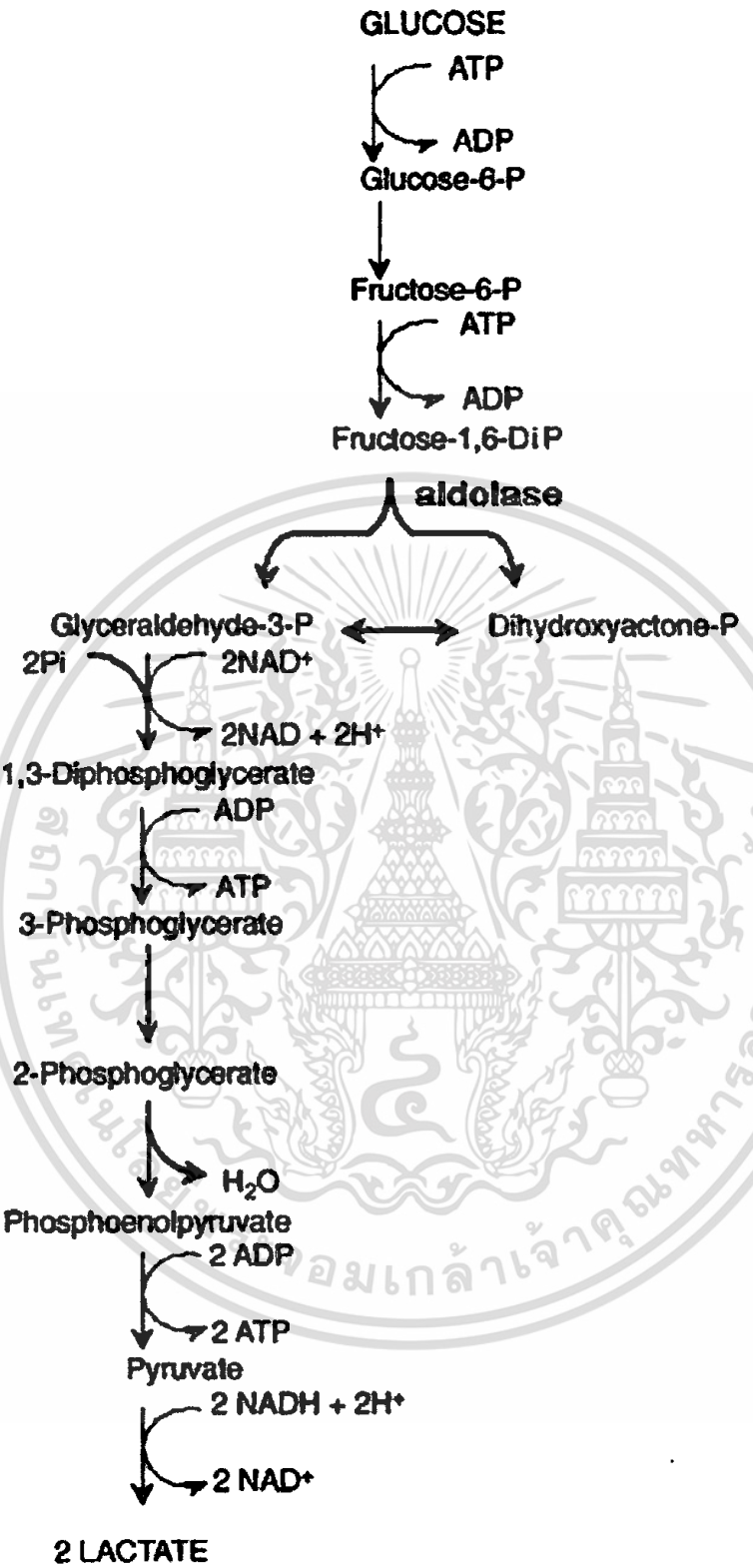
เป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้าย คือ กรดแลกติก เป็นส่วนใหญ่ โดยกลไกการเกิดกรดแลกติก คือ การเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) โดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส (Embdeb-Meyerhof-Pamas glycolytic pathway) หรือ EMP pathway แล้วเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแลกติก ดังแสดงในภาพที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 การหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนต์เตตีฟ (Heterofermentative)

เป็นกระบวนการหมักที่ได้กรดแลกติก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) หรือกรดแอซิติก กลไกการเกิดกรดแลกติก ดังแสดงในภาพที่ 2.5

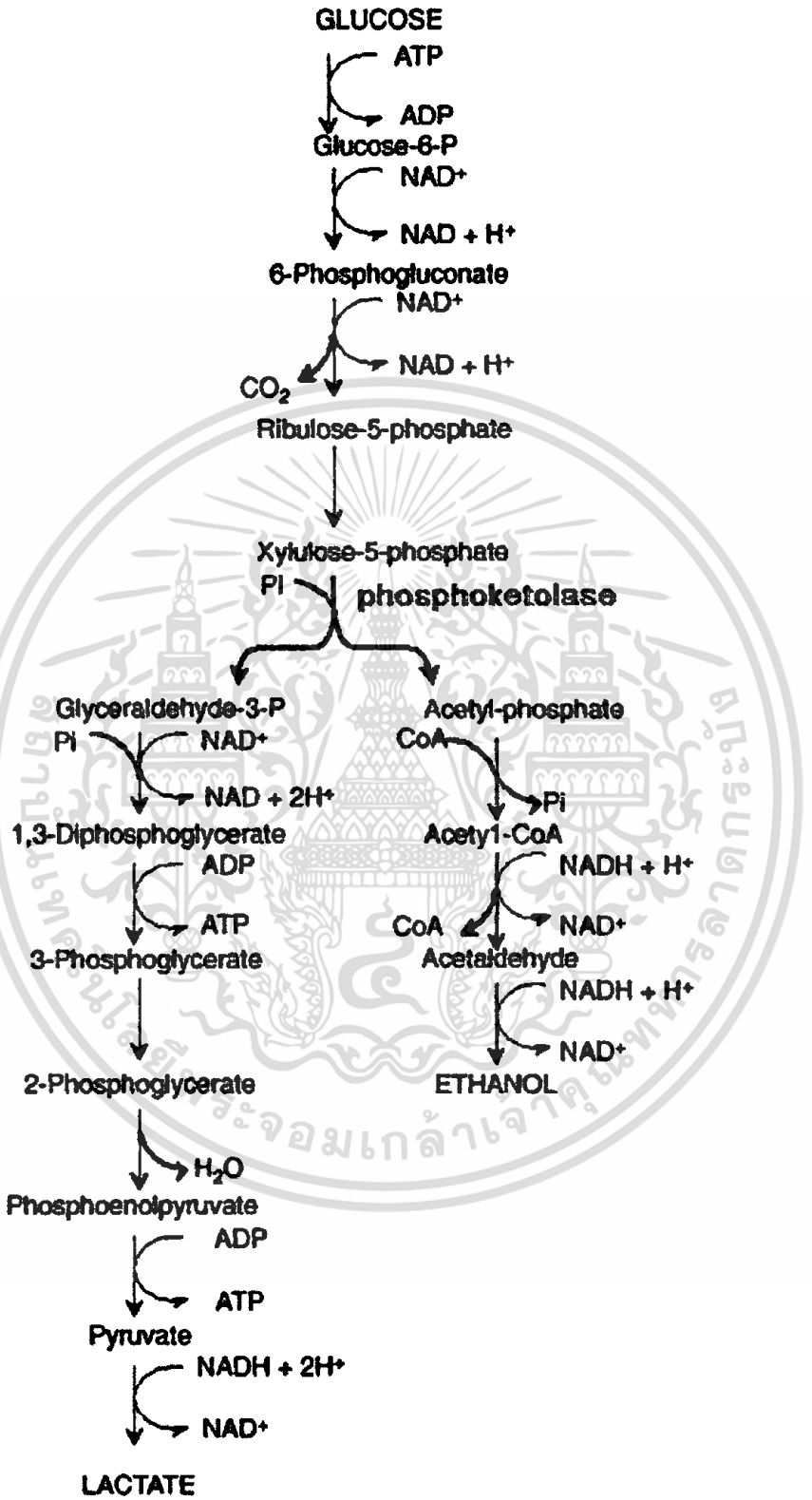
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 แสดงวิถีเมแทบอลิซึมของการใช้น้ำตาลกลูโคสแบบโฮโมเฟอร์เมนต์เตตีฟ

ที่มา : Salminen และคณะ, 1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 แสดงวิถีเมแทบอลิซึมของการใช้น้ำตาลกลูโคสแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนต์เตตีฟ

ที่มา : Salminen และคณะ, 1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ต่อไปนี้

2.6.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50–55 ในการสร้างเซลล์ (สมใจ ศิริโภค, 2544) ดังนั้นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมมาใช้เป็นซับสเตรทในการผลิตกรดแลกติกจึงเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิต และเป็นการใช้วัสดุเหลือทิ้งให้เกิดประโยชน์

Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเซลล์ตรึงของเชื้อ *Lactobacillus casei* โดยใช้หางนมเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตสที่ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 94.37) ให้เป็นกรดแลกติก (32.95 กรัมต่อลิตร)

Mussatto และคณะ (2008) ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลเสทกากข้าวมอลต์ที่ได้จากกระบวนการผลิตเบียร์ โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเสทกากข้าวมอลต์ที่มีการเติมส่วนประกอบของอาหาร MRS เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุด คือ 0.82 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Petrov และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้ง โดยเชื้อ *Lactococcus lactis subsp. lactis* B84 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกรดแลกติก คือ อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส มีอัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 5.5 กรัมต่อลิตรจากแป้ง 18 กรัมต่อลิตร

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกจะใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนแหล่งของไนโตรเจนจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ โดยชนิดและความเข้มข้นของธาตุอาหารที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อซึ่งจะต้องปรับสภาวะให้เหมาะสมจึงจะได้ผลผลิตที่สูงขึ้น (สมใจ ศิริโภค, 2544)

Yu และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus casei* CGMCC โดยใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีการเติมแหล่งคาร์บอน และแร่ธาตุต่าง ๆ พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 115.12 กรัมต่อลิตร

Ogumbanwo และ Okanlawon (2009) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยใช้โฮโมแลกติกแบคทีเรีย พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของยีสต์สกัดสามารถให้ปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุด โดยเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ให้ปริมาณกรดแลกติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงที่สุดเท่ากับ 18.4 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

Silveira และคณะ (2012) ศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากแอปเปิ้ลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 6 กรัมต่อลิตร และน้ำสกัดจากแอปเปิ้ล 50 กรัมต่อลิตร จะให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 2.36 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.6.3 แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างกรดแลกติก ได้แก่ เกลืออนินทรีย์ของธาตุโพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และแมงกานีส เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีโคบอลต์ ทองแดง เหล็ก และสังกะสี โดยทั่วไปมักจะพบแร่ธาตุเหล่านี้เจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่าง ๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (สมใจ ศิริโภค, 2544)

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งและเศษอาหารที่เหลือทิ้งจากโรงงานอาหาร โดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* 18011 พบว่าเมื่อเติมแมงกานีสลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมงกานีส

Nancib และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปติกซอย ยูเรีย เปปโตน และเคซีนไฮโดรไลเสทที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัมโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด

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

2.6.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดแลกติก เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 37-45 องศาเซลเซียส

Nancib และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRL-B445 พบว่าสภาวะการผลิตกรดแลกติกที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณ 11.8 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Cui และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำแช่ข้าวโพด โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด คือ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Silveira และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด คือ 37 องศาเซลเซียส

2.6.5 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช)

แลกติกแอซิดแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 4.5-6.5) ในการผลิตกรดแลกติกจำเป็นต้องควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมจึงจะได้ผลผลิตปริมาณสูง การควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อให้ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่ละลายน้ำ ถ้าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง คาร์บอเนตจะสลายตัวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชคงที่ประมาณ 7 หรืออาจควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติมกรดหรือด่าง เช่น กรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ (สมใจ ศิริโภค, 2544)

Panesar และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากหางนม โดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก คือ 6.5 เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 32.93 กรัมต่อลิตร

Mussatto และคณะ (2008) ศึกษาอิทธิพลของการเติมสารอาหารเสริม และการควบคุมค่าพีเอชในระหว่างกระบวนการหมักกรดแลกติกจากไฮโดรไลเสทกากข้าวมอลต์ (brewer's spent grain) โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าการควบคุมพีเอชที่ 6.0 ในระหว่างการหมักจะให้ผลผลิตกรดแลกติกปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 35.54 กรัมต่อลิตร

Ogumbanwo และ Okanlawon (2009) ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยโฮโมแลกติกแบคทีเรีย พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นที่ดีที่สุดของการผลิตกรดแลกติก คือ 5.5 เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุดเท่ากับ 7.5 ± 0.03 กรัมต่อลิตร

2.6.6 การให้อากาศ

ออกซิเจนเป็นสิ่งที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศ (aerobe) ปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญและการผลิตสารเมตาบอไลท์ (สมใจ ศิริโภค, 2544)

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* ในสภาวะของการหมักที่มีการควบคุมการให้อากาศ และมีอัตราการกวนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้สูงถึงร้อยละ 98

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาถูก โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก คือ มีการให้อากาศ และมีอัตราการกวนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 วัตถุดิบราคาถูกที่ใช้ในการทดลอง

2.7.1 กากน้ำตาล (สันทัด, 2544)

กากน้ำตาลเป็นของเหลวที่มีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลดำ ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย เนื่องจากกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยนั้นเริ่มจากการนำอ้อยเข้าหีบได้เป็นน้ำอ้อย จากนั้นจึงกรองแยกกากออกจากน้ำอ้อยแล้วเคี่ยวน้ำอ้อยจนได้ผลึกของน้ำตาลทรายตกตะกอนออกมา การแยกผลึกน้ำตาลทรายด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ทำให้ได้ผลิตผลพลอยได้ที่สำคัญจากการผลิตน้ำตาลทรายด้วยวิธีนี้ ได้แก่ กากน้ำตาล ขี้ตะกอน (filter cake) และชานอ้อย (bagasses) กากน้ำตาลเป็นผลิตผลพลอยได้ที่มีคุณค่ามากที่สุด เป็นส่วนของของเหลวที่เหลือหลังจากการแยกเอาผลึกของน้ำตาลออกแล้ว กากน้ำตาลมีลักษณะเหนียวข้น มีสีน้ำตาลเข้ม องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ตกผลึก ในการผลิตน้ำตาลทรายนั้นจะมีกากน้ำตาลซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้เกิดขึ้นประมาณร้อยละ 4 ถึง 6 ของปริมาณอ้อยที่ใช้ในการผลิต กากน้ำตาลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามกรรมวิธีในการผลิตน้ำตาลทราย คือ

1. กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว (plantation white sugar) ซึ่งเราเรียกว่า blackstrap molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 50 - 60 ซึ่งส่วนประกอบของ blackstrap molasses แสดงในตารางที่ 2.2

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

3. กากน้ำตาลที่ได้จากการทำบางส่วนของน้ำอ้อยแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหย (inverted can juice) ซึ่งเราเรียกว่า invert molasses หรือ hightest molasses วิธีนี้เป็นการผลิตกากน้ำตาลโดยตรง ซึ่งส่วนประกอบโดยประมาณของ hightest molasses แสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของ blackstrap molasses

ส่วนประกอบ	กากน้ำตาลอ้อย (ร้อยละ)
(ร้อยละของกากน้ำตาล)	
ของแข็งแห้ง	5 - 83
(ร้อยละของของแข็ง)	
ซูโครส	32 - 45
กลูโคส	5 - 11
ฟรุกโทส	6 - 15
น้ำตาลทั้งหมด (ซูโครส + น้ำตาลรีดิวซ์)	52 - 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารอินทรีย์ที่ไม่ใช่ซูโครส	
- มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ	5
- ไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ	10
เถ้า	7 - 11
ไนโตรเจนทั้งหมด	0.4 - 1.5
พีเอช	4.5 - 6

ที่มา : Roehr, 1996

ตารางที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบโดยประมาณของ hightest molasscs

ส่วนประกอบ	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (ร้อยละ)
ของแข็ง	80 - 85
ซูโครส	15 - 35
น้ำตาลรีดิวซ์	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
พีเอช	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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กรดน้ำส้ม กรดแลกติก ผงชูรส ยีสต์ขนมปัง และยีสต์อาหารสัตว์ เนื่องจากกากน้ำตาลมีราคาถูกและเหมาะสมมากกว่าเมื่อเทียบกับวัตถุดิบชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ เช่น

Bae และ Shoda (2004) ศึกษาการผลิต Bacterial cellulose จากกากน้ำตาลที่ผ่านกระบวนการทรีท (ปรับสภาพ) โดยใช้กรดซัลฟิวริก ทำให้ได้ความเข้มข้นของ Bacterial cellulose สูงถึงร้อยละ 76 ซึ่งมากกว่าการใช้กากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการทรีท

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

He และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตเออโกสเตอรอล (ergosterol) จากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรม พบว่ามีการผลิตเออโกสเตอรอล 52.6 มิลลิกรัมต่อกรัม จากการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร มีระยะการหมัก 30 ชั่วโมง

Dumbrepatil และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาลโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 ในสภาวะการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นสูงถึง 190 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 166 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 4.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.8 การใช้ประโยชน์จากกรดแลกติก

กรดแลกติกถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

2.8.1 การใช้ประโยชน์ในด้านเภสัชกรรม

แคลเซียมแลกเตตใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมสำหรับผู้ป่วยที่ขาดแคลเซียม โดยอาจเสริมในนม หรือน้ำผลไม้หรืออาหารอื่น หรือจะบริโภคในรูปแคลเซียมแลกเตตเลย โดยอาจจะเสริมด้วยเฟอรัส-แลกเตต ซิงค์แลกเตต และแมกนีเซียมแลกเตต (Dailey และคณะ, 2000) ตารางที่ 2.4 แสดงแหล่งของแร่ธาตุที่อยู่ในรูปของเกลือแลกเตต ซึ่งมีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรมเพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ

ตารางที่ 2.4 เกลือแลกเตตที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรม

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

143538

ตารางที่ 2.4 (ต่อ) เกลือแลกเตตที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรม

แร่ธาตุ	ใช้รักษาอาการ	ข้อดี
เฟอรัสแลกเตต	- โรคโลหิตจาง - ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง - ลดการเต้นของหัวใจ โดยเฉพาะในทารก	- มีประสิทธิภาพในการรักษา - มีสีอ่อน - มีความคงทน - มีความคงตัว - เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ยาก
แมกนีเซียมแลกเตต	- ความดันโลหิตสูง - อาการเกร็ง - กล้ามเนื้ออ่อนแรง	- มีกลิ่นรสเป็นกลาง - มีประสิทธิภาพในการรักษา - มีความสามารถในการละลายสูง
แมงกานีสแลกเตต	- การเจริญเติบโตล่าช้า - แพ้กลูโคส	- มีความคงทนดี - มีกลิ่นรสเป็นกลาง
ซิงค์แลกเตต	- การเจริญเติบโตล่าช้า - ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง - ความผิดปกติของผิวหนัง - หายใจไม่สะดวก	- มีกลิ่นรสเป็นกลาง - มีความสามารถในการละลายสูง

ที่มา : www.purac.com/ufc/file2/purac_sites/lovettj/ff7c0790d03d748c0375fc1d764111b6/pu/pharmaceutical.pdf

2.8.2 การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้กรดแลกติกในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวาง ซึ่งกรดแลกติกจะทำหน้าที่เป็นสารควบคุมความเป็นกรดด่างหรือใช้เป็นสารกันบูด นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอีกด้วย ตัวอย่างอาหารที่มีการนำกรดแลกติกมาใช้ ได้แก่

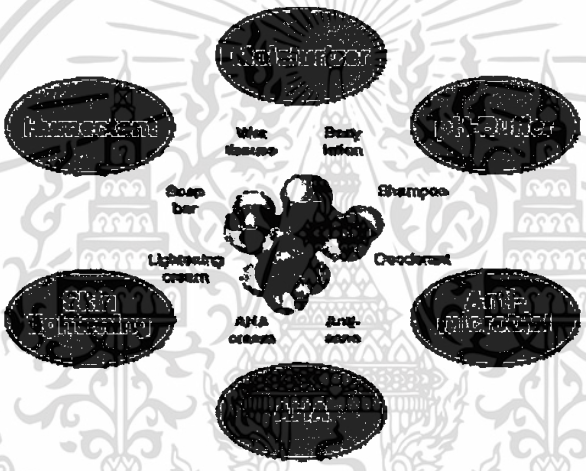
- ใช้เป็นสารควบคุมความเป็นกรดด่างในเครื่องดื่ม เช่น น้ำอัดลมและน้ำผลไม้
- ใช้เป็นส่วนผสมของลูกอม และหมากฝรั่ง ให้กลิ่นรสที่เป็นรสของกรดอ่อน
- ใช้ในรูปของโซเดียมหรือโพแทสเซียมแลกเตต ทำหน้าที่ช่วยยืดอายุการเก็บของอาหารพวกปลา เนื้อ และสัตว์ปีก
- ใช้ในรูปของแคลเซียมแลกเตตในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพคติน ทำให้ผักและผลไม้มีความคงตัวมากขึ้น ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสีและกลิ่นรสของผักและผลไม้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป โดยการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะที่ปนเปื้อน (Hansen, 1951)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

➢ เป็นกรดที่พบใน sourdough ทำให้ขนมปังมีกลิ่นรสเฉพาะตัว นอกจากนี้อนุพันธ์ของกรดแลกติก เช่น แลกทีเลตโมโนและไดกลีเซอไรด์ของกรดไขมัน (lactylated mono - and diglyceride of fatty acid) นิยมนำมาใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมอบโดยเฉพาะแป้งเค้กสำเร็จรูปและเนยขาว เป็นต้น ส่วนแคลเซียมสเตียริล - 2 - แลกทีเลต (calcium stearyl - 2 - lactylate) นิยมนำมาใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมปัง (FDA, 1988)

2.8.3 การใช้ประโยชน์ในด้านเครื่องสำอาง

มีการใช้กรดแลกติกเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพื่อใช้เป็นสารให้ความชุ่มชื้น สารควบคุมความเป็นกรดด่าง สารต้านจุลินทรีย์ และสารเพิ่มความกระจ่างใสให้กับผิวพรรณ ตัวอย่างเครื่องสำอางที่มีการใช้กรดแลกติกเป็นส่วนผสม แสดงในภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีกรดแลกติกเป็นส่วนผสมเพื่อทำหน้าที่ต่าง ๆ

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

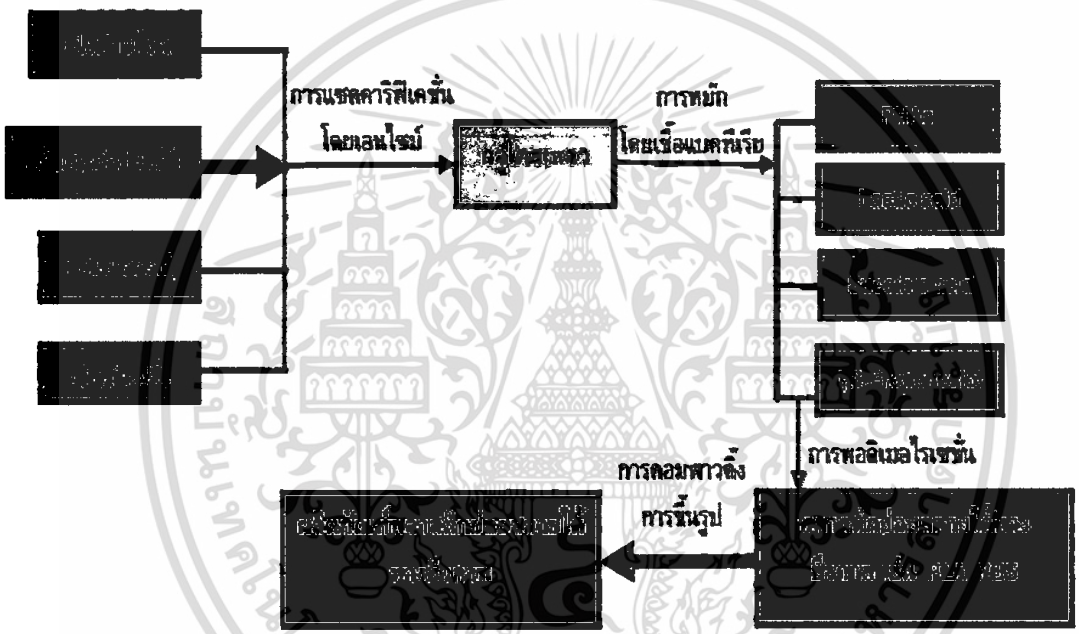
2.8.4 การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมไบโอพลาสติก

กรดแลกติกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สำหรับเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากวัตถุดิบมวลชีวภาพนั้น ดังแสดงในภาพที่ 2.7 ซึ่งเริ่มจากการแปรรูปมันสำปะหลังเป็นแป้งมันสำปะหลัง และนำไปผ่านกระบวนการแซ็กคาริฟิเคชัน (saccharification) โดยใช้เอนไซม์จนกระทั่งได้เป็นกลูโคสเหลว จากนั้นนำกลูโคสเหลวที่ได้ไปหมักโดยเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลกติก และเมื่อนำกรดแลกติกไปผ่านกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) จะได้ PLA ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ พอลิเมอร์เหล่านี้จะถูกนำไปผ่านกระบวนการคอมพาวดิ้ง (compounding) ใส่สารเติมแต่งเพื่อปรับปรุง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติให้ดีขึ้น แล้วนำไปผ่านกระบวนการสุดท้ายคือการขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์รูปร่างต่าง ๆ ตามการใช้งาน

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลายประเภทเช่นเดียวกับพลาสติกจากปิโตรเคมี ผลิตภัณฑ์จากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในงานที่เน้นคุณสมบัติการย่อยสลายได้ เช่น ถุงขยะสำหรับเก็บใบไม้ แผ่นฟิล์มเพื่อการเกษตร กระถางต้นไม้ การใช้งานด้านบรรจุภัณฑ์ (สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, 2552) ตารางที่ 2.5 แสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ



ภาพที่ 2.7 กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกย่อยสลายได้จากวัตถุดิบมวลชีวภาพ

ที่มา : สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, 2552

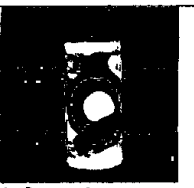
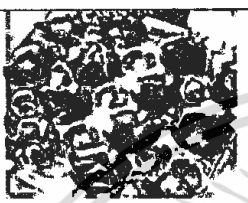
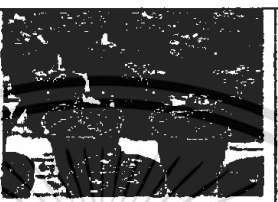
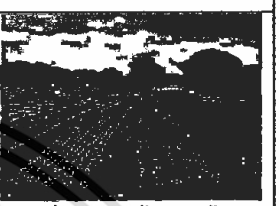
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่มีอยู่ในตลาด

<table>
<tr><td rowspan="3">ผลิตภัณฑ์บรรจุหีบห่อ</td><td>ตัวอย่าง
ผลิตภัณฑ์</td><td>
ถุงใส่ขนมปังเพื่อรักษาความสดใหม่ให้นานขึ้น
Innovia Films®</td><td>
ฟิล์มหุ้มให้อากาศผ่านได้และถาดใส่ผัก
EB®</td><td>
ถุงให้อากาศผ่านได้สำหรับห่อผัก
Natura®</td></tr>
<tr><td>การใช้งาน</td><td colspan="3">แผ่นฟอยล์ แผ่นฟิล์ม หรือโฟมที่กลวงตรงกลางสำหรับกันกระแทก ขวด ถาด พลาสติกกันกระแทก ตาข่าย ถุงกระสอบ ถุง</td></tr>
<tr><td>จุดอ่อน/จุดแข็ง</td><td colspan="3">บรรจุภัณฑ์อาหารที่ปนเปื้อนทางชีวภาพนั้นยากที่จะนำผ่านกระบวนการกลับมาใช้ใหม่ จึงเป็นการใช้งานระยะสั้นเท่านั้น / ไม่ต้องคำนึงถึงปริมาณการทิ้งเนื่องจากสามารถย่อยสลายได้</td></tr>
<tr><td rowspan="4">ภาชนะใส่อาหารแบบใช้แล้วทิ้ง</td><td rowspan="2">ตัวอย่าง
ผลิตภัณฑ์</td><td>
ถ้วยสำหรับใส่อาหาร
NatureWorks®</td><td colspan="2">
ถ้วยย่อยสลายได้ที่งานประชุมเยาวชนผู้นับถือคาทอลิก ปี ค.ศ. 2005 เมืองโคโลญ
Novamont®</td></tr>
<tr><td>
ช้อน มีด ส้อมที่ใช้ครั้งเดียวทิ้งสามารถถูกย่อยเป็นปุ๋ยได้หลังจากใช้แล้ว
Pacovis®</td><td colspan="2">
ถ้วยที่ทำจากแป้งที่ผ่านการเคลือบสำหรับใส่เครื่องดื่มร้อนและเย็น
Huhtamaki®</td></tr>
<tr><td>การใช้งาน</td><td colspan="3">ภาชนะใส่อาหารแบบชั่วคราว (เช่น ถ้วยชาม แก้วน้ำ) หลอด ฯลฯ</td></tr>
<tr><td>จุดอ่อน/จุดแข็ง</td><td colspan="3">การพัฒนาสมบัติทางกายภาพและทางกลให้มีความคงทนและใช้งานได้ดีในเงื่อนไขที่จำเป็น / เป็นสินค้าที่มีปริมาณการใช้มาก และมีตลาดรองรับมาก</td></tr>
</table>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 (ต่อ) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่มีอยู่ในตลาด

เส้นใยและสิ่งทอ	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์	เส้นใยสำหรับทอผ้า	 เส้นใยถูดขัด NoDax®
	การใช้งาน	เสื้อผ้า เส้นใย	
	จุดอ่อน/จุดแข็ง	ความหลากหลายในประเภทและรูปแบบผลิตภัณฑ์ / สมบัติการแพร่ผ่านของก๊าซและความเงางาม	
การเพาะปลูก การทำสวน ไม้ดอก พืชผล พืชไร่	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์	 ถาดสำหรับเก็บและขนส่งดอกไม้ย่อยสลายได้ NNZ®	 กระถางใส่ต้นไม้ย่อยสลายได้หลังการใช้งาน Novamont®	 ฟิล์มคลุมดินไถกลบได้หลังจากใช้แล้ว Novamont®
	การใช้งาน	กระถางต้นไม้ ถุงกระสอบใส่ปุ๋ย แผ่นฟิล์มคลุมดิน ฟิล์มสำหรับผูก ถุงใส่ปุ๋ยหรือเมล็ดพันธุ์พืช		
	จุดอ่อน/จุดแข็ง	ข้อจำกัดด้านราคาของสินค้าจำพวกนี้ / การลดต้นทุนและหมดความยุ่งยากด้านการเก็บขยะหลังการใช้ สามารถใช้งานพร้อมการฝังกลบได้เลย		
การใช้งานทางการแพทย์	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์	ด้ายเย็บแผล Gunze®	วัสดุจับยึดกระดูก Gunze®	
	ตัวอย่างการนำไปใช้	ด้ายเย็บแผล การจับยึดกระดูก การผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะ ถุงมืออนามัย 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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 การผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม (Roehr, 1996)

การผลิตกรดแลกติกในทางการค้าเริ่มขึ้นเมื่อปี 1881 โดยบริษัท AVERY ในเมือง Littleton ประเทศสหรัฐอเมริกา จุดประสงค์เพื่อผลิตแคลเซียมแลกเตตสำหรับใช้เป็นผงฟูแทนทาร์เทรต ที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ ถึงแม้ว่าจะไม่ประสบความสำเร็จมากนัก แต่ก็เป็นอุตสาหกรรมแรก ที่มีการผลิตโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ในปี 1895 มีโรงงานที่ประสบความสำเร็จในการผลิตกรดแลกติก ซึ่งก่อตั้งโดย A. Boehringer ในเมือง Ingelheim ประเทศเยอรมณี

2.9.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกต้องมีความเหมาะสม และควรจะมีความบริสุทธิ์เพื่อที่จะได้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ วัตถุดิบที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ โมโน- และได - แซ็กคาไรด์ เช่น

- กลูโคส และกลูโคสไซรัป สามารถเตรียมได้จากกระบวนการย่อยแป้ง โดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส
- มอลโทส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยแป้ง โดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และบีตา-อะไมเลสจากมอลต์และแหล่งอื่น ๆ
- กากน้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีทซึ่งเป็นแหล่งของน้ำตาลซูโครส
- หางนมซึ่งมีน้ำตาลแลกโทสเป็นส่วนประกอบ

2.9.2 กระบวนการหมัก

ในที่นี้จะกล่าวถึงกระบวนการหมักแคลเซียมแลกเตต กระบวนการพื้นฐานในการผลิตกรดแลกติกแสดงดังในภาพที่ 2.8 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการหมักจะใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณ 120 - 180 กรัมต่อลิตร และเติมแหล่งไนโตรเจนซึ่งอาจจะเป็นสารอนินทรีย์หรือสารอินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต น้ำแช่ข้าวโพด ยีสต์สกัด เพปโตน มอลต์ เป็นต้น ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดจะอยู่ระหว่าง 1 - 10 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีการเติมส่วนประกอบที่เป็นแร่ธาตุ เช่น ฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต และไอออนซัลเฟต แล้วดำเนินการหมักในถังหมักขนาดใหญ่กว่า 100 ลิตร สิ่งที่ควรคำนึงถึงในการใช้ถังหมัก คือ วัสดุที่ใช้ทำถังหมักจะต้องทนต่อการกัดกร่อน เพราะกรดแลกติกเป็นกรดที่มีการกัดกร่อนสูง วัสดุที่นิยมนำมาใช้ คือ คอนกรีต และสแตนเลส หลังจากนั้นทำการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในช่วงเริ่มต้นของการหมัก หรืออาจจะเติมเพิ่มในระหว่างดำเนินการหมักก็ได้ เพื่อให้มีกรดแลกติกอิสระเหลืออยู่ในถังหมักน้อยที่สุด เติมหัวเชื้อเริ่มต้นประมาณร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะที่ใช้ในการหมัก คือ มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 5.5 - 6 ควบคุมอุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ซึ่งสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูง และเพื่อช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ผลิตกรดบิวทีริก กระบวนการหมักจะเสร็จสิ้นในช่วงเวลา 2 - 6 วัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้

2.9.3 ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและการทำให้บริสุทธิ์

การเก็บเกี่ยวและการทำให้แคลเซียมแลกเตตบริสุทธิ์จะใช้ขั้นตอนของ Rauch และคณะ (1960) ซึ่งในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จะขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ ถ้าใช้น้ำตาลที่บริสุทธิ์ (น้ำตาลเด็กซ์โทรสที่ได้จากผักกาดหรืออ้อย) จะใช้ความร้อนในการทำให้แคลเซียมแลกเตตละลายทั้งหมด จากนั้นนำมาทรีท (treat) กับ stoichiometric ที่มีกรดซัลฟิวริกร้อยละ 78 ซึ่งผลที่ได้จากการแยกคือแคลเซียมซัลเฟต (ยิปซัม) จากนั้นจึงกำจัดยิปซัมออกโดยการกรองด้วยถ่านกัมมันต์ นอกจากนี้ความไม่บริสุทธิ์อาจเกิดจากไอออนของโลหะที่มีมากโดยจะแยกออกได้โดยนำไปทรีทกับเฮกซะไซยาโนเฟอเรต (hexacyanoferrate) นอกจากนี้การทำให้บริสุทธิ์อาจจะใช้วิธีการแลกเปลี่ยนไอออนโดยการนำไปทรีทกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) หรือโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (potassium permanganate) ซึ่งจะทำให้ได้กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์และมีความเข้มข้นมากขึ้นถึงร้อยละ 80

การหมักกรดแลกติกโดยใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำจะทำให้ขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์มีต้นทุนสูงขึ้น ส่วนใหญ่แล้วก่อนการทำให้บริสุทธิ์จะทำการกรองแคลเซียมแลกเตตกับกรด ซึ่งจะทำให้แคลเซียมแลกเตตเกิดการตกผลึกลงมา และการทำให้สลายตัวจะใช้กรดซัลฟิวริกกับการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน

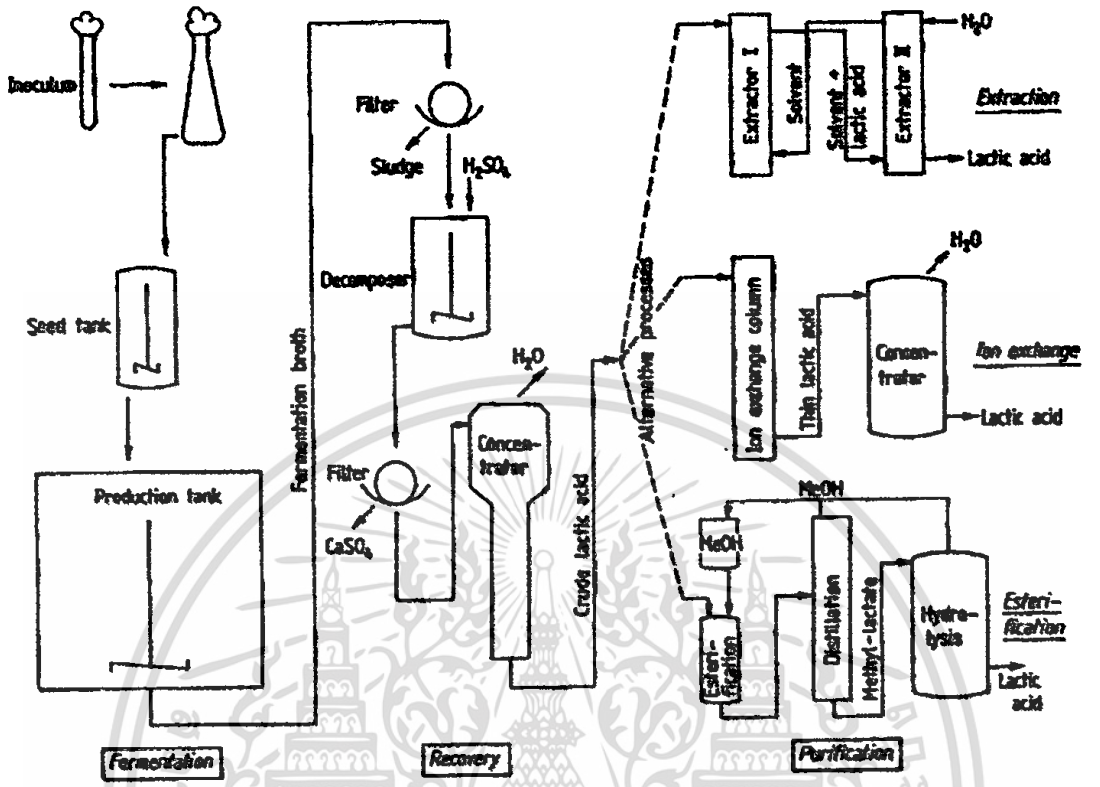
นอกจากนี้การทำให้บริสุทธิ์อาจจะใช้วิธีการตกตะกอนซ้ำและการสลายตัวของแคลเซียมแลกเตต ซึ่งอาจจะปรับปรุงวิธีการโดยการใช้ซิงค์แลกเตต หรือแมกนีเซียมแลกเตตแทน ซึ่งการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้แมกนีเซียมแลกเตตจะทำให้การหมักที่ใช้กากน้ำตาลมีการตกตะกอนที่ดีขึ้น

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดกรดแลกติกในขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์นั้นจะใช้สารหลายตัว เช่น ไอโซโพรพิลอีเทอร์ (isopropyl ether), แอลฟา, โอเมก้า - ไดอะมิโน - โอลิโกอีเทอร์(α, ω - diamino-oligoethers), ไอโซบิวทานอล (isobutanol), ไตรแอลคิลเทอเทียรีเอมีน (trialkyl tertiary amines) ในตัวทำละลายอินทรีย์, ไค - เอ็น - ออกทิลเอมีน (di-n-octylamine) ในเฮกเซน นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงใหม่โดยการประยุกต์ใช้ liquid membranes ในอดีตไอโซโพรพิลอีเทอร์จะใช้กับพืชหลายชนิดซึ่งจะเป็นการเสี่ยงต่ออันตรายมาก

วิธีการอื่น ๆ ในการทำให้กรดแลกติกบริสุทธิ์ คือ การใช้เอสเทอร์ทำปฏิกิริยากับเมทานอลและการกลั่นเพื่อให้เกิดการระเหย ซึ่งเป็นขั้นตอนการแยกที่มีประสิทธิภาพสูงและจะทำให้ได้ผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์มาก

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มีความสำคัญต่อการผลิตกรดแลกติกเพื่อใช้ในทางการค้า เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตเพื่อให้ได้เปรียบคู่แข่งทั้งในด้านคุณภาพและราคาของผลผลิตที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม

ที่มา : Roehr, 1996

2.9.4 การประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์

กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูง และมีลักษณะเป็นของเหลวหนืด เป็นที่ต้องการทางการค้า เกรดของกรดแลกติกขึ้นอยู่กับการนำไปใช้ ซึ่งสามารถแบ่งเกรดของกรดแลกติกที่ผลิตได้เป็น เกรดที่ใช้ในงานทางเทคนิค (technical grade) เกรดที่ใช้ในอาหาร (food grade) เกรดที่ใช้ทางด้านเภสัชกรรม (pharmacopoeia grade) และเกรดที่ใช้สำหรับทำพลาสติก (plastic grade) คุณสมบัติของกรดแลกติกเกรดต่าง ๆ ได้แสดงดังในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ระดับคุณภาพทางการค้า (commercial grade) ของกรดแลกติกและการนำไปใช้ประโยชน์

คุณภาพ	คุณสมบัติ	การประยุกต์ใช้
เกรดที่ใช้ในงานทางเทคนิค	- สีน้ำตาลอ่อน - ปราศจากเหล็ก - มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 20 - 80	- อุตสาหกรรมการฟอกหนังและสิ่งทอ - การผลิตเอสเทอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) ระดับคุณภาพทางการค้า (commercial grade) ของกรดแลกติกและการนำไปใช้ประโยชน์

คุณภาพ	คุณสมบัติ	การประยุกต์ใช้
เกรดที่ใช้ในอาหาร	- ใสและไม่มีสี - มีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 80	- สารปรุงแต่งในอาหาร - สารให้ความเป็นกรด - ผลิตแป้งที่มีรสเปรี้ยวและโด (dough)
เกรดที่ใช้ทางด้านเภสัชกรรม	- ใสและไม่มีสี - มีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 90 - มีเถ้า (ash) น้อยกว่าร้อยละ 0.1	- รักษาอาการในลำไส้ - ใช้ในการผลิตยา - ใช้ในรูปไอออนของแลกเตต
เกรดที่ใช้ทำพลาสติก	- ไม่มีสี - มีเถ้าน้อยกว่าร้อยละ 0.01	- แลกเกอร์ น้ำมันเคลือบเงา - พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

ที่มา : Ratledge และ Kristiansen, 2006

2.10 การตรึงเซลล์

เซลล์ตรึง (immobilized cells) คือ เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณที่ทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง หรือใช้ได้อย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์กำลังเจริญ เซลล์ระยะพักตัว (resting cells) หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (death cells) (สมใจ ศิริโภค, 2544)

วัตถุประสงค์หลักของการตรึงเซลล์ คือ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ในพื้นที่ของวัสดุยึดเกาะ และเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิตในกระบวนการ วัสดุยึดเกาะที่นิยมใช้ คือ alginate, agar, pectin, polyacrylamide และ carageenan และได้มีการใช้วัสดุธรรมชาติบางชนิด เช่น เปลือกไม้ หิน หรือฝ้าย เป็นต้น

2.10.1 การคัดเลือกวัสดุพาหะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

การเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลากหลายวิธีซึ่งคุณสมบัติของวัสดุพาหะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีจึงมีข้อแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกัน ได้แก่ คุณสมบัติทางกลไก (mechanical properties) คุณสมบัติทางฟิสิกส์ ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมทางฟิสิกส์ สารเคมี การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ ความชอบน้ำ ความชุ่มชื้น ราคา และการยอมรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลักในการพิจารณาคัดเลือกวัสดุพาหะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์มีดังนี้ (พรวิสาข์ ยุ่นประยงค์, 2551)

2.10.1.1 สมบัติในการละลาย

ควรเป็นสารที่ละลายได้ง่าย และสารที่ได้ควรมีความคงตัวอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

2.10.1.2 สมบัติในการเกิดเจล

สารผสมที่ได้ควรเกิดเจลได้ง่ายในสภาวะปกติ และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์

2.10.1.3 สมบัติของเจล

เจลที่ได้ควรมีความแข็งแรง มีความคงตัวสูง และรูพรุนที่อยู่ภายในเจลควรมีขนาดเล็กพอที่จะป้องกันการรั่วไหลของเซลล์ได้ ในขณะเดียวกันซับสเตรตและผลิตภัณฑ์สามารถซึมผ่านได้อย่างอิสระ

2.10.2 คุณสมบัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

2.10.2.1 ความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิต

เซลล์ที่ถูกตรึงและเซลล์อิสระจะมีความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน เนื่องจากสารตัวนำเป็นอุปสรรคต่อการซึมผ่านเข้าออกของสารอาหารและผลผลิต

2.10.2.2 ค่าพีเอชที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง

เมื่อเปรียบเทียบค่าพีเอชที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงและเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไปตามค่าพีเอชที่เป็นกรดหรือด่าง

2.10.2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง

เซลล์ที่ถูกตรึงจะสามารถทนทานต่อความร้อนได้ดีกว่าเซลล์อิสระ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงจึงสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์อิสระ

2.10.2.4 ความคงตัวของเซลล์ที่ถูกตรึง

เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงตัวในการใช้งานได้มากกว่าเซลล์อิสระ รวมถึงสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้งานใหม่ได้อีกด้วย นอกจากนี้เซลล์ที่ถูกตรึงยังสามารถทนทานต่อสารเคมีและการเสื่อมสภาพทางฟิสิกส์ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (Cheetham และคณะ, 1980)

2.10.3 ข้อดีและข้อเสียของเซลล์ที่ถูกตรึง

2.10.3.1 การเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมี

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะปกติและใช้พลังงานต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดปัญหามลภาวะต่ำมาก

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ ต้องการสารประกอบเชิงซ้อนต่าง ๆ ในการเกิดปฏิกิริยา เช่น โคแฟคเตอร์ เป็นต้น รวมถึงมีความคงทนน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.3.2 การเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือ สามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำในระบบการหมักแบบกะ (batch) หรือแบบต่อเนื่อง (continuous) ได้ง่ายกว่า เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้น้อยกว่า การแยกผลผลิตทำได้ง่ายกว่า นอกจากนี้เซลล์ที่ถูกตรึงซึ่งเป็นเซลล์ในระยะพักตัวต้องการพลังงานน้อยเพียงเพื่อใช้รักษาสภาพความอยู่รอด ทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เสียค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการตรึงเซลล์ และอาจสูญเสียความสามารถ ระหว่างการตรึงได้

2.10.3.3 การเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือ สามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำในระบบการหมักแบบกะ (batch) หรือแบบต่อเนื่อง (continuous) ได้ง่ายกว่า การแยกผลผลิตทำได้ง่ายกว่า

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เสียค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการตรึงเซลล์ จุลินทรีย์อาจสูญเสียความสามารถบางส่วนในระหว่างการตรึง และเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเนื่องจากภายในเซลล์มีเอนไซม์หลายชนิด

2.10.3.4 การเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึง

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือ มีราคาถูกกว่า เนื่องจากไม่จำเป็นต้องสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์และไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ ช่วยลดการสูญเสียความสามารถของเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมได้ในปริมาณมาก ๆ และนำไปใช้ได้ในปฏิกิริยาที่ต้องใช้เอนไซม์หลายชนิด

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งสามารถผลิตสารที่ไม่ต้องการออกมายับยั้งการผลิตผลผลิตได้ และเซลล์ที่ถูกตรึงยังถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของซับสเตรตและผลผลิตโดยวัสดุพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์ นอกจากนี้ยังอาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตจากตัวเซลล์หรือสารที่ขับออกจากเซลล์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเอง เนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานานหรือเซลล์รั่วไหลเนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงมีการเจริญเพิ่มจำนวน

2.10.4 วิธีการตรึงเซลล์

วิธีการตรึงเซลล์แบ่งออกเป็น 3 วิธีหลัก ๆ ได้แก่ การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method) และการห่อหุ้ม (entrapping method)

2.10.4.1 การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method)

การตรึงเซลล์แบบยึดด้วยตัวนำเป็นวิธีตรึงเซลล์ที่ง่ายที่สุด โดยยึดเซลล์ไว้กับตัวกลางโดยใช้การดูดซับ ซึ่งสารตัวกลางที่ใช้ยึดต้องไม่ละลายน้ำ เช่น EDTA, cellulose, ion-exchange resin เป็นต้น การเลือกใช้สารยึดต้องคำนึงถึงความสามารถในการยึดเกาะและไม่ทำให้เซลล์สูญเสียกิจกรรม เซลล์บางส่วนอาจหลุดได้เพราะไม่มีการใช้สารอื่นช่วย อาศัยเพียงพันธะไฮโดรเจนหรือแรงแวนเดอร์-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วาล์ล และการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้บางครั้งใช้การยึดเกาะด้วยแรงโควาเลนต์ซึ่งเป็นการตรึงเซลล์โดยใช้ประจุร่วมกันระหว่างสารตัวนำ ซึ่งวิธีที่นิยมใช้แบ่งย่อยได้เป็น 2 วิธี คือ การดูดซับ (adsorption) และการยึดด้วยแรงโควาเลนต์ (covalent binding method)

2.10.4.1.1 การดูดซับ (adsorption)

การดูดซับเป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับกับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิก หรือพันธะไฮโดรเจนโดยอาศัยหลักทางเคมี เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือยีสต์ประกอบด้วย กรดไดอะมิโนไพเมลิก (diaminopimelic acid) และเฮกโซสเอมีน (hexosamines) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาไอออนิก (ionic interaction) กับตัวนำที่ใช้ได้ โดยแรงดูดซับนี้จะขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของเซลล์ รวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องด้วย การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อน และมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช การเกิดฟองอากาศ และมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการผลผลิตที่ปราศจากการปนเปื้อนของเซลล์ และข้อเสียอีกประการหนึ่ง คือ อัตราการดูดซับของเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยตัวนำค่อนข้างต่ำ แต่อาจปรับแก้ไขได้โดยการใช้สารที่มีรูพรุนเป็นตัวดูดซับ

2.10.4.1.2 การยึดด้วยแรงโควาเลนต์ (covalent binding method)

การยึดด้วยแรงโควาเลนต์เป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่เชื่อมเซลล์โดยตรงกับแอคติเวทซัพพอร์ต (activatesupport) ซึ่งสารที่ใช้เชื่อมนั้นสามารถต่อกับส่วนประกอบที่ผิวเซลล์ ได้แก่ กลุ่มอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มไฮดรอกซิล กลุ่มอิมมิดาโซล หรือกลุ่มฟีนอลของโปรตีน การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ เซลล์จะเชื่อมกับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และมีการรั่วไหลของเซลล์ได้น้อย แต่มีข้อเสีย คือ ใช้สภาวะค่อนข้างรุนแรง และความเป็นพิษของสารที่ใช้อาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการเอนไซม์เพียงชนิดเดียว และเอนไซม์ที่ต้องการนั้นเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งไม่ต้องสัมผัสกับสารเคมีที่ใช้ระหว่างการเตรียมสารที่ใช้เป็นตัวยึดเซลล์ด้วยวิธีนี้ ได้แก่ ไททาเนียม (titanium) เม็ดแก้ว (glass bead) เซอร์โคเนียม-ไฮดรอกไซด์ (zirconium hydroxides) เป็นต้น

2.10.4.2 การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method)

การตรึงเซลล์แบบเชื่อมไขว้เป็นการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวก bi หรือ multifunctional reagent เช่น กลูทารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) โทลูอีน (toluene) และไดไอโซไซยาเนต (diisocyanate) เป็นต้น (Chibata และคณะ, 1970) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แตกต่างจากวิธีอื่น ๆ คือ เซลล์ไม่ได้ถูกตรึงอยู่กับสารที่เป็นตัวดูดซับ หรือถูกห่อหุ้มอยู่ในเจล หรือในเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) แต่เป็นการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันโดยใช้สารเคมีภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างจะรุนแรง ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับใช้ในปฏิกิริยาเชิงเดี่ยวเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.4.3 การห่อหุ้ม (entrapping method)

การตรึงเซลล์แบบห่อหุ้มเป็นวิธีการตรึงเซลล์ในสารประกอบพวกเจลที่จับกันเป็นพอลิเมอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุนขนาดเล็กกันเซลล์หลุด แต่วัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ต้องผ่านออกมาได้ วิธีนี้นิยมใช้มากแต่พบปัญหา คือ เกิดปฏิกิริยาข้ำเพราะมีเจลกั้น ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยใช้ glutaraldehyde เชื่อมไว้ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ การห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูล (microcapsulation) และการห่อหุ้มแบบร่างแห (lattice type)

2.10.4.3.1 การห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูล (microcapsulation)

การห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูลเป็นการห่อหุ้มเซลล์ด้วยพอลิเมอร์เยื่อบางกึ่งซึมซาบได้ (semipermeable membrane) เช่น คอลลอเดียน หรือ ซิลิโคน ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้ซับสเตรตและผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่ไม่แข็งแรงพอที่จะนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นการใช้ประโยชน์จึงมีจำกัด นิยมใช้ในการผลิตยารักษาโรคและงานวิเคราะห์ทั่วไป (Cheetham, 1980)

2.10.4.3.2 การห่อหุ้มแบบร่างแห (lattice type)

การห่อหุ้มแบบร่างแหเป็นการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ไว้ในช่องว่าง 3 มิติ ในเจลของสารพอลิเมอร์ที่ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ (matrix) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากนำมาใช้ได้กับเซลล์เกือบทุกชนิด ในขณะที่วิธีการอื่นมีความจำเพาะและข้อเสียมากกว่า (Cheetham, 1980) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการห่อหุ้มนี้นิยมใช้สารพวก biochemically inert hydrogel เป็นตัวห่อหุ้มโดยใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดโครงร่าง 3 มิติ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน โดยกลไกในการเกิดเจลนั้นมีหลายแบบ คือ การจับแบบโควาเลนต์ (covalent binding) เช่น การเกิดพอลิเมอไรซ์ของพอลิอะคริลาไมด์ การใช้แรงไอออนิก เช่น แคลเซียมแอลจิเนต การกระจาย (precipitation) โดยพีเอชอุณหภูมิ หรือการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลาย เช่น คอลลาเจล คาราจิแนน พอลิสไตรีน สำหรับสารที่นิยมใช้เป็นตัวห่อหุ้มและประสบความสำเร็จในระดับอุตสาหกรรมมาแล้ว ได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ คาราจิแนน และแคลเซียมแอลจิเนต เป็นต้น

2.10.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเซลล์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dembczynski และ Jakowski (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงของเชื้อ *Lactobacillus casei* ในเยื่อแซนแทนกัม (xanthan gum) และเซลล์ตรึงของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ในเยื่อแอลจิเนต

Bergmaier และคณะ (2003) ศึกษาเปรียบเทียบการใช้เซลล์ตรึงและเซลล์อิสระของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M ในการผลิต exopolysaccharide พบว่าการใช้เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพดีกว่าเซลล์อิสระ โดยสามารถผลิตได้ 1.7 กรัมต่อลิตร

Kourkoutas และคณะ (2005) ศึกษาการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* บนชิ้นแอปเปิลและควินซ์ ในการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต พบว่าสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการหมักแบบกะได้ทั้งหมด 15 รอบ

Idris และ Suzana (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากสับปะรดเหลือทิ้งโดยเซลล์ตรึงของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ คือ ใช้แอลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเจลเท่ากับ 1 มิลลิเมตร พีเอช 6.5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการประยุกต์ใช้เพคตินในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* ในการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต พบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้นร้อยละ 94.37 ให้เป็นกรดแลกติก 32.95 กรัมต่อลิตร และสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการหมักได้ทั้งหมด 16 รอบ

Rao และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเซลล์ตรึงของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 63.5, 76.2 และ 80.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เซลล์อิสระผลิตกรดแลกติกได้เพียง 51 กรัมต่อลิตร

Giordano และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยการตรึงเซลล์เอนไซม์กลูโคอะไมเลสร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยเพคติน พบว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

Mirdamadi และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 39392 ที่ถูกตรึงด้วยวัสดุชนิดต่าง ๆ คือ แบเรียมแอลจิเนต วุ้น และพอลิยูรีเทนโฟม (polyurethane foam cubes) พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแบเรียมแอลจิเนตสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุดเท่ากับ 60.13 กรัมต่อลิตร และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการหมักได้มากกว่า 40 วัน

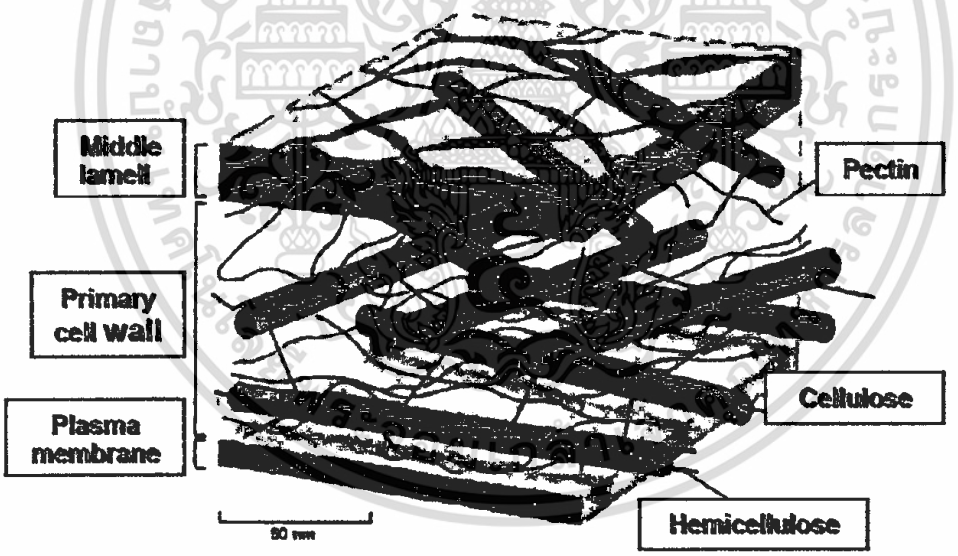
อรทัย (2553) ศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) เพื่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 ในการผลิตกรดแลกติก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ คือ ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาที่ความเข้มข้นร้อยละ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 1.52 มิลลิเมตร และปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 โดยเซลล์ตรึงสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 25.03 และ 21.88 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 และ 108 ตามลำดับ

2.11 เพคติน (Pectin)

เพคตินถูกค้นพบในศตวรรษที่ 18 เป็นโพลีแซ็กคาไรด์เชิงซ้อนในพืช จัดเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเช่นเดียวกับแป้งและเซลลูโลส และเป็นซับสเตรตของเอนไซม์เพคติเนส เพคตินทำหน้าที่เป็นสารที่ทำให้เกิดเจล เป็นโครงสร้างของเซลล์ และเป็นสารที่สำคัญในบริเวณชั้นมิดเดิลลาเมลลา (middle lamella) ของผนังเซลล์พืชในรูปของโปรโตเพคติน (protopectin) (ภาพที่ 2.9) โดยรวมตัวอยู่กับเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และไกลโคโปรตีน (Christensen, 1986) พบมากในบริเวณที่มีเนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม เช่น ต้นอ่อน ใบ และผลไม้ เป็นต้น พบในพืชชั้นสูงโดยปรากฏในชั้นระหว่างเซลล์หรือจุดเชื่อมต่อระหว่างผนังเซลล์ ทำให้เกิดช่องสำหรับอาหารและน้ำผ่านในผนังเซลล์ สารกลุ่มเพคตินเป็นสารเคลือบเส้นใยเซลลูโลสที่สำคัญและอาจจะเชื่อมต่อกับพันธะโควาเลนต์กับโพลีเมอร์อื่น ๆ อีกด้วย (อรทัย วิไลวัลย์, 2553)



ภาพที่ 2.9 การแบ่งชั้นของผนังเซลล์พืชและองค์ประกอบที่สำคัญในแต่ละชั้น

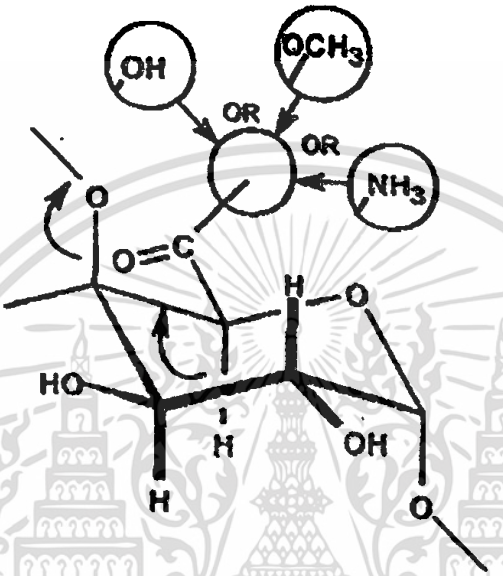
ที่มา : http://filing.fda.moph.go.th/library/e-learning

2.11.1 โครงสร้างของเพคติน

เพคตินเป็นโพลีเมอร์รูปร่างคล้ายสายโซ่ประกอบไปด้วยหน่วยของกรดกาแล็กทูโรนิกเป็นส่วนใหญ่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosides) ที่ตำแหน่ง β-(1$\rightarrow$4) โดยโมเลกุลของเพคตินประกอบด้วยกรดกาแล็กทูโรนิกที่เชื่อมต่อกันประมาณ 200-1000 หน่วย นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลแรมโนส (L-rhamnose) น้ำตาลกาแล็กโทส (D-galactose) น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ในปริมาณน้อยเกาะอยู่เป็นสายแขนง โดยหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl) ในโมเลกุลของกรดกาแล็กทูโรนิกบางส่วนจะถูกเอสเทอริไฟด์ด้วยหมู่เมทธิล ($-CH_3$) เป็นเมทธิลเอสเทอร์ และมี degree of methylation (DM) แตกต่างกัน จึงทำให้เพคตินจากวัตถุดิบแต่ละแหล่งมีโครงสร้างที่แตกต่างกันและเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนมาก



ภาพที่ 2.10 สูตรโครงสร้างของกรดกาแล็กทูโรนิกจากโมเลกุลของเพคติน

ที่มา : May, 1997

น้ำตาลที่พบในเพคตินส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มแรมโนกาแล็กทูโรแนน โดยบริเวณที่พบน้ำตาลประเภทนี้มากมักจะถูกเรียกว่า hairy regions ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลกลุ่มแรมโนกาแล็กทูโรแนนจะมีลักษณะเป็นโพลีเมอร์ที่มาเชื่อมต่อสลับกับกรดกาแล็กทูโรนิก แต่ถ้าเป็นน้ำตาลกาแล็กทูโรแนนมาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวจะเรียกส่วนนี้ว่า *smooth regions* ทั้งนี้ปริมาณของ *smooth regions* หรือ hairy regions นั้นจะขึ้นอยู่กับเพคตินว่าสกัดมาจากส่วนใดของพืช และกรรมวิธีในการสกัดเพคตินด้วย

2.11.2 การแบ่งเพคตินตามค่า Degree of esterification

เพคตินแต่ละชนิดจะมีหมู่คาร์บอนิลของกรดกาแล็กทูโรนิกที่ถูกเอสเทอริไฟด์ (esterified) ด้วยหมู่เมทธิลได้ต่างกัน อัตราส่วนของหมู่เมทธิลที่ถูกเอสเทอริไฟด์จะแสดงในรูปของระดับการเกิดเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Degree of esterification ; DE) ซึ่งค่า DE นี้เป็นจำนวนร้อยละของกรดกาแล็กทูโรนิกที่ถูกเอสเทอริไฟด์ต่อจำนวนกรดกาแล็กทูโรนิกทั้งหมด การแบ่งเพคตินตามค่า DE สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มดังนี้

1. **เพคตินกลุ่มที่มีเมธอกซิลสูง (High methoxyl pectin)** เป็นสารเพคตินที่มีค่าร้อยละ DE ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 50 ในทางการค้าจะมีค่าร้อยละ DE อยู่ในช่วง 55-75 การเกิดเจลของเพคตินชนิดนี้

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

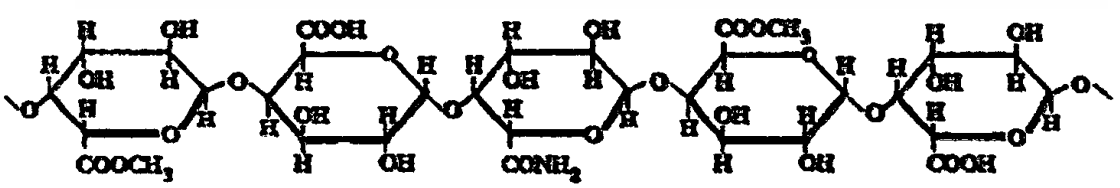
จะต้องมีองค์ประกอบที่เหมาะสม คือ มีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 55-65 ค่าความเป็นกรดด่าง 2.9-3.1 เพคตินเมธอกซิลสูงสามารถแบ่งตามระยะเวลาของการเกิดเจลได้ 6 ชนิด คือ

- Ultra rapid set pectin มีค่า DE ร้อยละ 82
- Extra rapid set pectin มีค่า DE ร้อยละ 76
- Rapid set pectin มีค่า DE ร้อยละ 72
- Medium rapid set pectin มีค่า DE ร้อยละ 65-69
- Slow set pectin มีค่า DE ร้อยละ 60-64
- Extra slow set pectin มีค่า DE ร้อยละ 55-59

2. เพคตินกลุ่มที่มีเมธอกซิลต่ำ (Low methoxyl pectin) เป็นสารเพคตินที่มีค่า DE ต่ำกว่าร้อยละ 50 ส่วนใหญ่จะมีค่า DE อยู่ในช่วงร้อยละ 20-50 ในทางการค้าจะมีค่า DE อยู่ในช่วงร้อยละ 20-40 เพคตินชนิดนี้สามารถเกิดเจลได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยต้องมีไอออนของโลหะบางชนิดช่วยในการเกิดเจล เช่น Ca^{2+} โดยใช้ปริมาณน้ำตาลเพียงเล็กน้อยหรือไม่ใช้เลย และสามารถเกิดเจลได้ในช่วงความเป็นกรดด่างระหว่าง 3.0-4.5 ในการผลิตเพคตินกลุ่มนี้จะต้องมีการดีเอสเทอริไฟด์โดยใช้เอธิล หรือเมธิล แอลกอฮอล์ หรือด่าง ถ้าใช้สารแอมโมเนียมร่วมกับด่างในการดีเอสเทอริไฟด์เพคตินที่ได้จะเรียกว่า amidated low methoxyl pectin ดังนั้นจะต้องหาค่าร้อยละ DE ร่วมกับค่า Degree of amidation (%DA) (May,1997) คือ

➢เพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำและมีหมู่เอไมด์เป็นองค์ประกอบ เป็นเพคตินที่บางส่วนของกรดกาแล็กทูโรนิกเกิดเอสเทอร์กับหมู่เอไมด์ โดยใช้สารแอมโมเนียมร่วมกับด่างในการดีเอสเทอริไฟด์ ทำให้หมู่เมธอกซิลในกรดกาแล็กทูโรนิกบางส่วนถูกแทนที่ด้วยหมู่เอไมด์ ดังนั้น degree of amidation (DA) คือ ปริมาณของกรดกาแล็กทูโรนิกที่มีหมู่เอไมด์มาเกาะแทนหมู่เมธอกซิลในกรดกาแล็กทูโรนิก

➢เพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำโดยทั่วไป ได้จากการดีเอสเทอริไฟด์โดยใช้เอธิล หรือเมธิล แอลกอฮอล์ หรือด่าง ทำให้หมู่ไฮดรอกซิมาแทนที่หมู่เมธอกซิล ได้เพคตินที่มีค่า DE ต่ำกว่าร้อยละ 50



LM-pectin (DE=40% and DA=20%)

ภาพที่ 2.11 ลักษณะของโครงสร้างของเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำ

ที่มา : Nussinovich, 1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.3 คุณสมบัติของเพคติน (อรทัย วิไลวัลย์, 2553)

การละลายของเพคติน

เพคตินสามารถละลายได้ในน้ำเย็นและน้ำร้อนให้สารละลายที่มีความข้นหนืด แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยทั่วไปความสามารถในการละลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อมวลโมเลกุลลดลง และการเกิดเอสเทอริไฟด์ของหมู่คาร์บอกซิลเพิ่มขึ้น

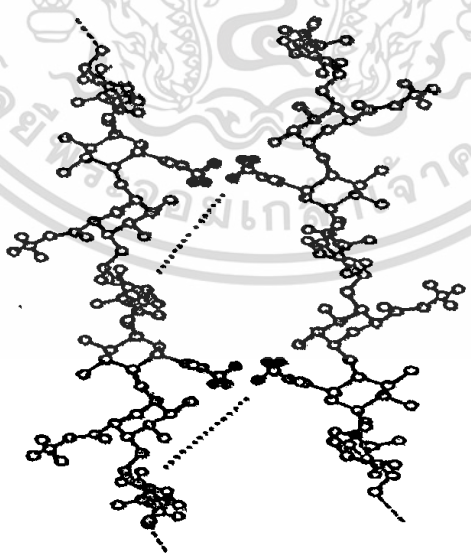
ความหนืดของเพคติน

ความข้นหนืดของเพคตินนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของเพคติน ชนิดของเพคติน ขนาดของมวลโมเลกุล อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง และปริมาณแคลเซียม นอกจากนี้ยังพบว่าเพคตินที่มีมวลโมเลกุลสูงจะทำให้สารละลายมีความหนืดสูงขึ้นด้วย

การเกิดเจลของเพคติน

การเกิดเจลของเพคตินสามารถแบ่งตามกลไกการเกิดเจลได้เป็น 2 ลักษณะ คือ

1. **เจลของเพคติน (pectin gel)** เป็นเจลที่เกิดจากเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลสูง เพคตินมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophobic) เมื่อละลายน้ำจะเกิดพันธะระหว่างเพคตินกับน้ำได้เป็นสารข้นหนืด เพคตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิลส่วนใหญ่เกิดเป็นเอสเทอร์ ($-COOCH_3$) และส่วนน้อยจะเกิดเป็นคาร์บอกซิลอิสระ (-COOH) จะมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน และจะแตกตัวมากน้อยขึ้นอยู่กับพีเอช ที่ค่าพีเอชสูงจะแตกตัวได้มากขึ้นให้ประจุที่ผลักกันเอง ทำให้โมเลกุลเรียงตัวเป็นเส้นตรง ของเหลวจะหนืดแต่ไม่เกิดเจลขึ้น เจลจะเกิดได้เมื่อเพคตินมาเชื่อมเข้าด้วยกันตรงบริเวณที่เรียกว่า junction zone เกิดเป็นโครงสร้างร่างแหสามมิติขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2.12

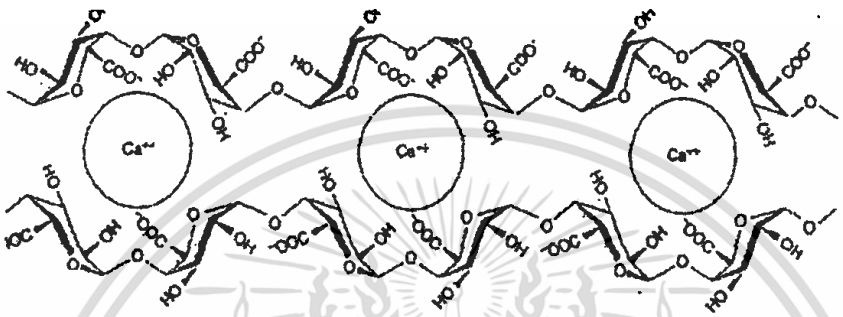


ภาพที่ 2.12 การเกิด junction zone ของเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลสูง

ที่มา : Oakenfull, 1991

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เจลของแคลเซียมเพคเตต (calcium pectate gel) เจลชนิดนี้เกิดกับเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำ จะเกิดที่พีเอชสูงกว่าพวกแรก คือ พีเอชในช่วง 3.4-6.0 โดยร่างแหสามมิติเกิดขึ้นจากการที่ไอออนของแคลเซียม (Ca^{2+}) หรือ แมกนีเซียม (Mg^{2+}) เป็นตัวเชื่อมกลุ่มคาร์บอกซิลที่แตกตัวของโมเลกุลเพคตินที่อยู่ใกล้กัน (เช่นเดียวกับการเกิดเจลของโซเดียมแอลจิเนต) เกิดการฟอร์มตัวของ junction zone ด้วยไอออนของแคลเซียมเพื่อเชื่อมสายโมเลกุลและมีการจัดรูปร่างใหม่ที่เรียกว่า egg box model ดังแสดงในภาพที่ 2.13 เจลชนิดนี้สามารถเกิดเจลได้โดยไม่ต้องมีน้ำตาล



ภาพที่ 2.13 การเกิด junction zone ของเพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำ

ที่มา : May, 1997

2.11.4 ประโยชน์ของเพคติน

เพคตินเป็นสารธรรมชาติที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย และได้รับอนุญาตจากทั่วโลก คณะกรรมการ JFECFA (Joint FAC/WHO Expert Committee on Food Additive) ได้จัดเพคตินเป็นวัตถุเติมแต่งอาหาร (food additive) ที่ปลอดภัยและไม่จำกัดปริมาณในการได้รับต่อวัน ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มนิยมใช้เพคตินเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร โดยใช้เป็นสารก่อให้เกิดลักษณะเจล (gelling agent) ในผลิตภัณฑ์แยม เยลลี่ และขนมหวาน หรือใช้เป็นสารให้ความหนืด (thickener) ในซอสเครื่องปรุง น้ำเชื่อมเข้มข้น น้ำสลัด เครื่องดื่ม หรือใช้เป็นสารให้ลักษณะเนื้อสัมผัส (texturizer) สารก่อให้เกิดอิมัลชั่น (emulsifier) และสารเสริมความคงตัว (stabilizer) ในผลิตภัณฑ์นม และโยเกิร์ต เป็นต้น (จุฬาลักษณ์ ชูพรหม, 2553) นอกจากนี้เพคตินยังมีคุณสมบัติเป็นใยอาหาร (dietary fiber) เนื่องจากไม่สามารถย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ ทำให้เพคตินสามารถช่วยให้เกิดการขับถ่ายได้ดี ลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ และยังช่วยทำหน้าที่ขัดขวางการดูดซึมของไขมันไม่ให้เข้ากระแสเลือดจึงป้องกันไม่ให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและหลอดเลือดในสมองตีบ ดังนั้นทางด้านเภสัชกรรมจึงได้มีการนำเพคตินมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มการทำงานของยาช่วยลดคอเลสเตอรอลและระดับน้ำตาลในเลือด ใช้เป็นเส้นใยอาหารป้องกันโรคระบบทางเดินอาหาร และเนื่องจากเพคตินสามารถช่วยลดการระคายเคืองจึงมีการนำมาผลิตเป็นอาหารเด็กอีกด้วย

นอกจากนี้ยังมีการนำเพคตินมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ โดย Panesar และคณะ (2007) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้เพคตินในการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* สำหรับการผลิตกรดแลกติกจากเวย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตสที่ความเข้มข้นร้อยละ 94.37 ให้เป็นกรดแลกติก 32.95 กรัมต่อลิตร และสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 16 รอบ

2.12 การสกัดเพคติน (อรทัย วิไลวัลย์, 2553)

การสกัดเพคตินที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสามารถสกัดออกมาได้โดยกระบวนการไฮโดรไลซีสด้วยกรด โดยกรดจะสกัดเพคตินด้วยการไฮโดรไลซ์เพคตินในรูปที่ไม่ละลาย (insoluble pectin) ให้เป็นเพคตินที่อยู่ในรูปที่ละลายได้ (soluble pectin) ดังนั้นชนิดและความเข้มข้นของกรดจึงเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งในการสกัดเพคตินจากเนื้อเยื่อพืช โดยทั่วไปสารเพคตินในเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ เช่น โปรโตเพคติน และอยู่รวมกับสารอื่น เช่น เซลลูโลส แคลเซียม และไอออนต่าง ๆ สามารถทำให้เพคตินเหล่านี้ละลายออกมาได้โดยการสกัดด้วยสารละลายกรดหรือด่างที่ร้อนและอาจมีการใช้ chelating agent เช่น สารประกอบพวกพอลิฟอสเฟต (polyphosphate) ร่วมด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด โดยจับกับไอออนที่มาเกาะกับโมเลกุลเพคตินทำให้เพคตินละลายออกมาได้

การเตรียมวัตถุดิบ

ในการสกัดเพคตินนั้นควรทำการเตรียมวัตถุดิบในการสกัดให้เหมาะสมเพื่อให้ได้เพคตินที่มีคุณภาพดีและปริมาณสูง โดยการนำวัตถุดิบที่แห้งไปบดและทำการกำจัดสารแปลกปลอมต่างๆ เช่น สี สารให้รสขม กรด น้ำตาล ตลอดจนสารอื่น ๆ ออก ซึ่งการกำจัดสารเหล่านี้ทำได้ 2 วิธี คือ การใช้น้ำเย็นล้าง และการใช้แอลกอฮอล์ล้าง ในการใช้น้ำล้างนั้นจะมีเพคตินบางส่วนละลายไปกับน้ำ เพคตินส่วนใหญ่ยังอยู่ในรูปโปรโตเพคติน ซึ่งเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ การล้างด้วยน้ำนี้ควรเปลี่ยนน้ำล้างหลาย ๆ ครั้ง พร้อมทั้งคนไปด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการล้าง ซึ่งการล้างน้ำนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากเพคตินที่สกัดออกมาจะมีคุณภาพดีหรือเลวขึ้นอยู่กับการล้าง และการล้างที่ดีจึงไม่ควรให้มีของแข็งที่ละลายน้ำได้เหลืออยู่ในน้ำล้างขั้นสุดท้ายเลย เมื่อล้างด้วยน้ำเรียบร้อยแล้วนำมาล้างต่อในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เพื่อกำจัดสารละลายในแอลกอฮอล์ออกโดยมีการให้ความร้อนช่วยในการสกัดเป็นเวลา 12-18 นาที ความร้อนจะสามารถทำลายสารเพคตินเอนไซม์ได้ (Kertesz, 1951)

การสกัดเพคติน

เมื่อได้วัตถุดิบที่กำจัดสิ่งเจือปนหรือสารประกอบต่าง ๆ ออกบ้างแล้ว จึงนำมาสกัดเพคตินโดยวิธีการไฮโดรไลซ์ ในการสกัดเพคตินโดยวิธีนี้อาจใช้กรดแร่หรือกรดอินทรีย์ แต่ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเพคติน คือ กรดเกลือหรือกรดไฮโดรคลอริก บางครั้งการสกัดเพคตินในเนื้อเยื่อพืชอาจมีเพคตินที่อยู่ในรูปของแคลเซียมเพคติเนส (calcium pectinate) ซึ่งไม่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายกรดจึงมีการใช้สารพวก chelating agent เติมลงไปในสารละลายที่ใช้สกัดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด โดยจะมีผลทำให้แคลเซียมเพคติเนสสามารถแปรสภาพไปอยู่ในรูปเพคตินที่ละลายได้มากขึ้น สารที่นิยมใช้เพิ่มประสิทธิภาพ ได้แก่ สารพวกพอลิฟอสเฟส (Kertesz, 1951)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำสารละลายเพคตินให้เข้มข้น

หลังจากผ่านขั้นตอนการไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายกรดแล้วนำมากรองเอากากออกจากสารละลายเพคติน นำสารละลายนั้นมาทำให้เข้มข้นโดยการระเหยน้ำออกจากสารละลายเพคติน (Kertesz, 1951)

การตกตะกอนเพคติน

เมื่อผ่านขั้นตอนการทำสารละลายเพคตินให้เข้มข้นแล้ว นำสารละลายเพคตินนั้นมาทำให้ตกตะกอนเพื่อแยกเพคติน โดยสารที่นิยมใช้ในการตกตะกอนเพคติน ได้แก่ เอทานอล จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการตกตะกอนแล้วกรองแยกตะกอนออก และทำการตกตะกอนด้วยเอทานอลอีกครั้งหนึ่งเพื่อให้เพคตินมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น นำตะกอนเพคตินที่ได้ไปทำให้แห้งแล้วบดให้เป็นผงจะได้ผงเพคติน

2.12.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเพคติน (พิเชษฐ เทบำรุง, 2546)

1. ชนิดและความแก่อ่อนของเนื้อเยื่อพืช ในพืชที่มีอายุน้อยกว่าจะมีปริมาณเพคตินน้อยกว่าพืชที่แก่กว่า เช่น ในผลไม้ดิบจะมีปริมาณเพคตินน้อยกว่าผลไม้ที่สุกหรือแก่เต็มที่ เนื่องจากในผลไม้ดิบจะมีเพคตินซึ่งอยู่ในรูปโปรโตเพคตินซึ่งเป็นเพคตินที่ไม่ละลายน้ำ

2. ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายกรด การใช้สารละลายกรดไฮโดรไลซ์โปรโตเพคตินให้เป็นเพคตินที่ละลายน้ำได้ สารละลายที่ใช้ในการสกัดเพคติน ได้แก่ สารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายกรดไฮโดรคลอริก สารละลายกรดไนตริก สารละลายกรดฟอสฟอริก สารละลายกรดซิตริก และสารละลายกรดแลกติก โดยความเข้มข้นของสารละลายกรดที่มากจะสามารถไฮโดรไลซ์โปรโตเพคตินได้ดี

3. จำนวนครั้งที่ทำการสกัด การสกัดเพคตินจากเนื้อเยื่อพืชในจำนวนมากครั้งจะเป็นการเพิ่มการไฮโดรไลซ์โปรโตเพคตินให้มากขึ้น ทำให้ได้ปริมาณเพคตินมากขึ้นด้วย

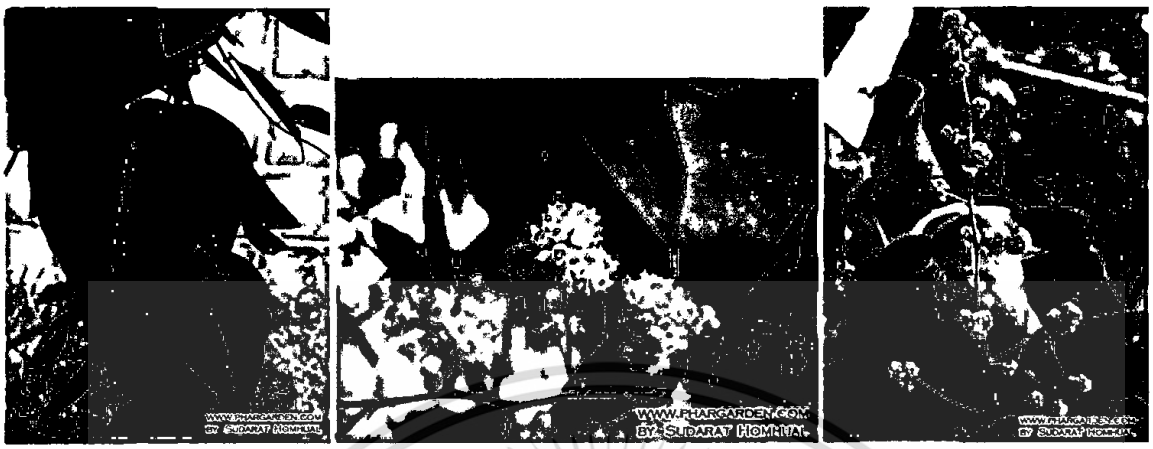
4. อัตราส่วนของน้ำหนักเนื้อเยื่อพืชต่อปริมาณสารละลายกรด ในการสกัดเพคตินโดยใช้อัตราส่วนของสารละลายกรดจำนวนมากจะยิ่งช่วยเพิ่มอัตราการไฮโดรไลซ์ได้มากขึ้น ทำให้ได้ปริมาณเพคตินมากขึ้นไปด้วย

5. เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ถ้าใช้เวลาในการสกัดเพคตินนานขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณเพคตินมากตามไปด้วย และอุณหภูมิที่สูงจะช่วยทำให้เกิดการไฮโดรไลซ์ได้ดียิ่งขึ้น

6. ชนิดของสารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด สารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพที่นิยมเติมลงไปในน้ำเพื่อสกัดเพคตินในเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้ได้ปริมาณเพคตินมากขึ้น คือ สารละลายโซเดียมเฮกซา-เมตาฟอสเฟต โดยความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมเฮกซาเมตาฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ก็จะให้ปริมาณและคุณภาพของเพคตินได้ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. 13 กรุงเขมา



ภาพที่ 2.14 กรุงเขมา

ที่มา : http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=146

กรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) เป็นพืชเมืองร้อน จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae พบได้ทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกในท้องถิ่นอื่น ๆ เช่น ขงเขมา พระพาย กรุงเขาดาล ใบก้นปิด (ภาคกลาง), สีฟัน (เพชรบุรี), เครือหมาน้อย (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ), เปล้าเลือด (แม่ฮ่องสอน), อะกามินเยาะ (มลายู-นราธิวาส) (อรทัย วิไลวัลย์, 2553) กรุงเขมามีลักษณะเป็นไม้เถาที่เลื้อยไปตามต้นไม้อื่น ไม่มีมือเกาะ ใบเดี่ยว รูปร่างใบเป็นรูปหัวใจ โคนใบแบบก้นปิด หน้าใบและหลังใบมีขนสีน้ำตาล โดยถือเป็นพืชที่มีลักษณะเด่นในการนำไปใช้ประโยชน์ กรุงเขมามีคุณสมบัติพิเศษ คือ เมื่อนำมาขยี้กับน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จะเกิดลักษณะเป็นเจลหรือวุ้น ซึ่งได้มีการศึกษาคุณสมบัติของวุ้นที่เกิดจากใบกรุงเขมาพบว่ามีลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีกรดกาแล็กทูโรนิกเป็นมอนอเมอร์ต่อกันเป็นโซ่ยาว ซึ่งเป็นสารจำพวกเพคตินชนิดเมทธอกซิลต่ำ (Low methoxyl pectin, LM) (Singthong และคณะ, 2005) การกระจายพันธุ์ในประเทศไทยพบว่าสามารถพบอยู่ทั่วไปแทบทุกภาคของประเทศโดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการกระจายพันธุ์ที่ประเทศอินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย แอฟริกา และอเมริกา สภาพที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ ริมแม่น้ำลำธาร ในป่าผลัดใบ ตั้งแต่พื้นราบระดับน้ำทะเลจนถึงพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,100 เมตร (พิเชษฐ เทบำรุง, 2546; กชพรรณ วงค์เจริญ, 2548)

2.13.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สัมภาษณ์ คำผุย (2533); กชพรรณ วงค์เจริญ (2548); อรทัย วิไลวัลย์ (2553) ได้รายงานลักษณะของกรุงเขมาไว้ดังนี้

ราก รากมีลักษณะอวบใหญ่ สีน้ำตาล มีหน้าที่สะสมอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบ ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว มีหลายรูป เช่น รูปหัวใจ รูปกลม รูปไต หรือรูปไข่กว้าง ก้นใบปิดออกแบบสลับ ใบกว้าง 4.5-12 เซนติเมตร ยาว 4.5-11 เซนติเมตร ปลายใบส่วนมากมนหรือเรียวแหลม โคนใบกลมตัดหรือเป็นรูปหัวใจ ขอบใบเรียบ เนื้อบางคล้ายกระดาษ มีขนนุ่มสั้นกระจายอยู่ทั้งหลังใบและท้องใบ ใบอ่อนจะมีขนอ่อนนุ่มปกคลุมอยู่ทั้งสองด้านและตามขอบใบ แต่จะร่วงไปเมื่อใบแก่ เส้นใบออกจากโคนใบรูปฝ่ามือ ก้านใบยาว 2-9 เซนติเมตร ขนนุ่มสั้นหรือเกือบเกลี้ยง ติดที่โคนใบห่างจากขอบใบขึ้นมา 1-18 มิลลิเมตร ปลายใบแหลมหรือเป็นติ่งหนาม

ดอก ดอกมีขนาดเล็กแยกเพศเป็นดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ต่างต้น มีสีเขียวอมเหลืองหรือเหลืองอ่อน ดอกเพศผู้ออกเป็นช่อกระจุกที่ง่ามใบ ช่อดอกยาวประมาณ 2.0-8.5 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยง มีกลีบดอก 4 กลีบ โคนติดกันเป็นรูปถ้วย ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยง ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของกลีบเลี้ยง เกสรเพศผู้มัดเดี่ยวยาวกว่ากลีบเลี้ยง อับเรณูติดกันเป็นรูปจาน ดอกเพศเมียออกเป็นช่อที่ง่ามใบ ช่อดอกยาวประมาณ 10-18 เซนติเมตร ก้านดอกสั้นมาก ใบประดับรูปกลมหรือรูปไตซ้อนเหลื่อมกันแน่นไม่ร่วง ปลายเป็นติ่งหนาม มีขน มีกลีบเลี้ยง 1 กลีบ รูปขอบขนานแกมรูปไข่ มีกลีบดอก 1 กลีบ ออกตรงข้ามกับกลีบเลี้ยงและสั้นกว่า

ผล ผลสดมีก้านอวบใหญ่ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร สีส้ม ผลทรงกลมรีอยู่ตรงปลาย เมื่อผลสุกมีสีน้ำตาลแดง มีขน

เมล็ด เมล็ดโค้งงอเป็นรูปพระจันทร์ครึ่งซีก ผิวขรุขระ มีรอยแผลเป็นของก้านเกสรเพศเมียติดอยู่ด้านข้าง มีขนสั้นนุ่ม ผนังผลชั้นในรูปไข่กลับ ยาว 5 มิลลิเมตร ด้านบนมีสันขวาง 9-11 สัน เรียงเป็น 2 แถว ขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ดหรือเหง้า

2.13.2 การใช้ประโยชน์จากกรุงเขมา

พยอม ตันติวัฒน์ (2521); วุฒิ ธรรมเวช (2540); ชยันต์ พิเชียรสุนทร และคณะ (2542); อรทัย วิไลวัลย์ (2553) ได้รายงานสรรพคุณของกรุงเขมาไว้ดังนี้

ราก รสหอมเย็นสุขุม สรรพคุณในการแก้ไข้ แก้ดีรั่ว ดีซ่าน เป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงอวัยวะเพศให้แข็งแรง แก้ลม โลหิต กำเดา แก้โรคตา ขับปัสสาวะ แก้อาการบวมน้ำ แก้ทางเดินปัสสาวะอักเสบ *แก้กระเพาะปัสสาวะอักเสบ แก้กระหายน้ำ แก้ช้ำใน แก้ปวดท้อง แก้โรคฝีดาษ บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย* เป็นยาระบาย แก้ท้องร่วง ในรากมีสาระสำคัญพวกอัลคาลอยด์ในปริมาณสูง

ใบ สรรพคุณแก้ร้อนใน พอกแผล ฝี แก้แผลมะเร็ง แก้หืด ใช้ทาภายนอกแก้หิด ใบมีสารพวกเพคติน

รากและใบ สรรพคุณใช้พอกเป็นยาเฉพาะที่ แก้โรคผิวหนัง แก้หิด

ลำต้น สรรพคุณดับพิษไข้ทุกชนิด บำรุงโลหิตสตรี เป็นยาพอกแก้ตาอักเสบ

เนื้อไม้ สรรพคุณแก้โรคปอด และโรคโลหิตจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13.3 การสกัดเพคตินจากใบกรุงเขมา

ศิริวรรณ ศรีสรฉัตร และคณะ (2532) ได้ศึกษาวิธีการสกัดเพคตินจากใบหมาน้อย และใบบัวโคก โดยวิธีการต้มสกัดกับน้ำโดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักสดต่อน้ำ 1: 80 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที พบว่าเพคตินที่สกัดได้จากใบสดและใบแห้งได้ปริมาณไม่แตกต่างกัน เมื่อเทียบเป็นน้ำหนักแห้ง โดยใบหมาน้อยและใบบัวโคกได้ปริมาณเพคตินร้อยละ 27.80 และ 9.13 ตามลำดับ

สัมภาษณ์ คำผุย (2533) ศึกษาการสกัดเพคตินจากใบหมาน้อย พบว่าปริมาณสารเพคตินที่สกัดได้จากใบสดและใบแห้งของต้นหมาน้อยมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยได้ปริมาณเพคติน 2.576 กรัมต่อใบหมาน้อย 10 กรัม

เทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอกาส และคณะ (2545) โดยศึกษาวิเคราะห์ปริมาณเพคตินจากใบหมาน้อยด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี โดยปริมาณเพคตินที่วิเคราะห์ได้ปริมาณเฉลี่ย 0.25 กรัม ต่อน้ำหนักใบหมาน้อย 1 กรัม

พิเชษฐ เทบำรุง (2546) ศึกษาหาปริมาณและคุณภาพของเพคตินจากใบหมาน้อย โดยทำการสกัดแบบร้อนด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล และสารละลายโซเดียมเฮกซา-เมตาฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.1 สภาวะที่ใช้ในการสกัด คือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที พบว่าการใช้สารละลายโซเดียมเฮกซาเมตาฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.1 ทำให้ได้ปริมาณเพคตินมากที่สุด เนื่องจากเป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพโดยจะไปไฮโดรไลซ์โปรโตเพคตินให้เป็นเพคตินที่ละลายน้ำได้ และพบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่นได้เพคตินที่มีคุณภาพมากที่สุดโดยคุณภาพของเพคตินวัดจากปริมาณเมทธิลเอสเตอร์ และกรดกาแล็กทูโรนิกในเพคติน และพบว่าเพคตินที่สกัดจากใบหมาน้อยเป็นเพคตินชนิดที่มีปริมาณเมทธิลเอสเทอร์ต่ำ

จีราภรณ์ สังข์ผุด (2549) ศึกษาการผลิตเพคตินผงจากกรุงเขมาด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และกรดซิตริกร้อยละ 7 ใช้อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย 1:40 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพคตินประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ สกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ฟอกสีด้วยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 0.2 ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 จากนั้นอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณเพคตินเท่ากับร้อยละ 21.65±0.18 และ 48.48±0.35 (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ และพบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่นมีปริมาณกรดกาแล็กทูโรนิกสูงสุด (ร้อยละ76.45±0.13) มีปริมาณเมทธอกซิลร้อยละ 8.08 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณเมทธิลเอสเทอร์ต่ำ

น้ำทิพย์ นาเชียงใต้ และยุวภา ทัศบุต (2550) ศึกษาผลของพีเอช และอุณหภูมิต่อคุณภาพของเพคตินที่สกัดได้จากใบหมาน้อย พีเอชและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด คือ พีเอช 2, 4 และ 6 อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสได้ปริมาณเพคตินมากกว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพบว่าการสกัดที่พีเอช 2 มีปริมาณเถ้าน้อยที่สุด ส่งผลให้เพคตินที่สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มีการละลายน้ำได้ง่าย นอกจากนี้ยังพบว่าพีเอชมีผลต่อเวลาการเกิดเจลของเพคติน ซึ่งการสกัดที่พีเอช 6 เพคตินจะเกิดเจลได้เร็วและเจลที่ได้มีลักษณะอ่อนนุ่ม แต่การสกัดที่พีเอช 2 จะเกิดเจลได้ช้า แต่เจลมีความแข็งแรงกว่า ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีของเพคติน

อรทัย วิไลวัลย์ (2553) ศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 108 และ *Lactobacillus delbrueckii* TISTR 1339 เพื่อผลิตกรดแลกติกจากเวย์ พบว่าในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 38.50 และ 33.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางสายยาง 1.52 มิลลิเมตร และปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร

Singthong (2005) ศึกษาการสกัดเพคตินและลักษณะทางกายภาพของเพคตินจากเครือหมาน้อยสกัดด้วยน้ำกลั่น ใช้อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย 1 : 40 อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส พีเอชธรรมชาติ (3.8-4.0) พบว่าเพคตินที่สกัดจากเครือหมาน้อยเป็นชนิดที่มีปริมาณเมทธิลเอสเทอร์ต่ำและมีกรดกาแล็กทูโรนิกเป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 70-75)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การวิจัย

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท PYREX

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX

คิวเวต (cuvette)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

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

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่นLIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องเขย่าของบริษัท Gallenkamp

เครื่องอบร้อนของบริษัท Binder

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

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

ถังหมักขนาด 5 ลิตร

โถดูดความชื้น

บีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท PYREX

ปิเปตต์ (pipette) ของบริษัท PYREX

ปั๊ม Peristaltic pump ของบริษัท Heidolph รุ่น PD 5201

สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 เซนติเมตร ของบริษัท Cole-Parmer Instrument Company รุ่น Tygon tubing 2-stop

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 สารเคมี

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

เปปโตน (peptone)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 .4 H_2O$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 .7H_2O$)

ยีสต์สกัด (yeast extract)

ดี-กลูโคส (D-glucose)

เนื้อสกัด (meat extract)

เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

Tween 80

แอมโมเนียมแอซีเตต (CH_3COONH_3)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

โซเดียมแอซีเตต (CH_3COONa)

วุ้น (agar)

กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)

กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

3.2 วัตถุดิบ

กากน้ำตาลเข้มข้นชนิด blackstrap molasses ซื้อจากโรงงานผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย จังหวัดกาญจนบุรี

3.2.1 การเก็บวัตถุดิบ

กากน้ำตาลที่นำมาใช้ในงานวิจัยจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแล้วลาก (streak) ลงบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Youssef และคณะ, 2000) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุก ๆ 2 สัปดาห์

3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ตรึง

การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นมีวิธีการดังนี้ คือ ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 จำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีตะกอนเซลล์เขย่าให้เข้ากันจนเกิดสารแขวนลอยเซลล์จะได้เชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ตรึง (ประยุกต์จากอรทัย วิไลวัลย์, 2553)

3.4 อาหารสำหรับการผลิตกรดแลกติก

อาหารกากน้ำตาล

(ประยุกต์จากอรทัย วิไลวัลย์, 2553; Youssef และคณะ, 2000; Vasala และคณะ, 2005)

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การสกัดเพคตินจากใบกรุงเขมา (อรทัย วิไลวัลย์, 2553)

ใบกรุงเขมาใช้ในงานวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร 199 หมู่ 3 ถนนพังโคน-วาริชภูมิ อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร 47160

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างใบกรุงเขมา

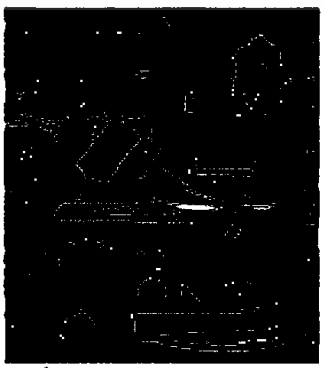
นำใบกรุงเขมามาล้างน้ำให้สะอาดแล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (blender) แล้วชั่ง 10 กรัม นำมาเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองเอาสารละลายทิ้งไป นำใบกรุงเขมาที่ได้จากการกรองมาเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาใบกรุงเขมา แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 *องศาเซลเซียส ให้แห้งสนิท*

3.5.2 ขั้นตอนการสกัดเพคตินจากใบกรุงเขมา

นำใบกรุงเขมาที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้วมาชั่ง 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร นำไปสกัดเพคตินแบบร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นกรองแยกเอากากของใบกรุงเขมาออกขณะร้อน (ภาพที่ 3.1)

ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการกรองแยกกากและสารละลายส่วนใสออกจากกันด้วยปั๊มสุญญากาศ

นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (vacuum evaporator) ให้เหลือ 1 ใน 3 ส่วนของสารละลาย (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการนำสารละลายที่ได้จากการกรองมาระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

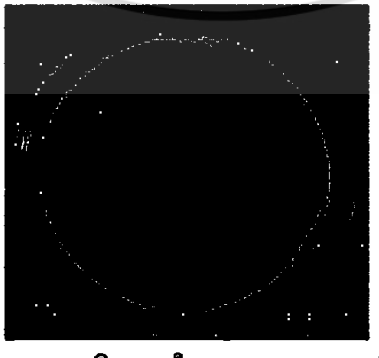
จากนั้นนำมาตกตะกอนเพคตินโดยเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนของสารละลายเพคตินต่อสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 1 : 2 โดยปริมาตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.3)

ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการตกตะกอนเพคตินด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

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

ภาพที่ 3.4 ตะกอนเพคตินที่ได้หลังจากตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

จากนั้นอบตะกอนเพคตินให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดให้ละเอียด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh (ภาพที่ 3.5)



ภาพที่ 3.5 สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาบดละเอียดขนาด 100 mesh

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การตรึงเซลล์

3.6.1 การตรึงเซลล์ด้วยเพคติน (อรทัย วิไลวัลย์, 2553)

การตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาความเข้มข้นร้อยละ 4 จากนั้นเตรียมเพคตินให้อยู่ในรูปโพแทสเซียมเพคเตตโดยทำปฏิกิริยา de-esterification ด้วยโพแทสเซียม-ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 จากนั้นหยดสารผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ผ่านปั๊ม (peristaltic pump) โดยใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยางซิลิโคน 1.52 มิลลิเมตร นำเม็ดเจลมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างแคลเซียมไอออนที่มากเกินไปและตัวเซลล์ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้ม จะได้เม็ดเจลเซลล์ตรึงที่ได้ไปใช้ในการผลิตกรดแลกติก

3.7 การศึกษาศักยภาพของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งแรงและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ศึกษาศักยภาพของเฟอร์ริกออกไซด์ที่เหมาะสมต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมัก โดยแปรผันปริมาณเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 3, 4 และ 5 นำเซลล์ตรึงมาหมักในอาหารกากน้ำตาลปริมาตร 3500 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าพีเอชให้ได้ 6.5 อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที เก็บน้ำหมักทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างตามข้อ 3.10

3.8 การศึกษา curing time ของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ศึกษา curing time ที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกของเม็ดเจลที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมัก โดยหยดสารผสมสำหรับตรึงเซลล์ (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4) ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร (ประยุกต์จากอรทัย วิไลวัลย์, 2553) ผ่านปั๊ม (peristaltic pump) และใช้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของสายยางซิลิโคน 1.52 มิลลิเมตร โดยแปรผันเวลาบ่มเม็ดเจล (curing time) 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาหมักในอาหารกากน้ำตาลปริมาตร 3500 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าพีเอชให้ได้ 6.5 อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที เก็บน้ำหมักทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างตามข้อ 3.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมากลับมาใช้ซ้ำ (cell recycling) เพื่อผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมากลับมาใช้ซ้ำเพื่อผลิตกรดแลกติก โดยนำเซลล์ตรึงมาหมักในอาหารกากน้ำตาลปริมาตร 3500 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าพีเอชให้ได้ 6.5 อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที (ประยุกต์จากอรทัย วิไลวัลย์, 2553) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนถึงระยะที่ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด วิเคราะห์ตัวอย่างตามข้อ 3.10 จากนั้นทำการ ถ่ายน้ำหมักออก และล้างเซลล์ตรึงด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำอาหารกากน้ำตาลใหม่ปลอดเชื้อเติมลงในถังหมักปริมาตร 3500 มิลลิลิตร ทำซ้ำจนกระทั่งปริมาณกรดแลกติกลดลง บันทึกจำนวนครั้งของการหมักแบบกะในรูปของปริมาณกรดแลกติกที่เซลล์ตรึงสามารถผลิตได้

3.10 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

- **การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)**

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกจะใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยนำน้ำหมักที่ได้จากการเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงต่าง ๆ มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกโดยกรองน้ำหมักผ่านเซลลูโลสเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อน การวิเคราะห์จะใช้คอลัมน์ Inersil C8-3 ใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV *detector* ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (ประยุกต์จากญาณี ลีตะนันท์, 2541) นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

- **การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)**

วิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลในกากน้ำตาล และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในตัวอย่างน้ำหมักโดยวิธีฟีนอล - ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956)

- **การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง (พีเอช)**

วิเคราะห์ค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

3.11 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิจัยหัวข้อ 3.7, 3.8 และ 3.9 วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาศักยภาพของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

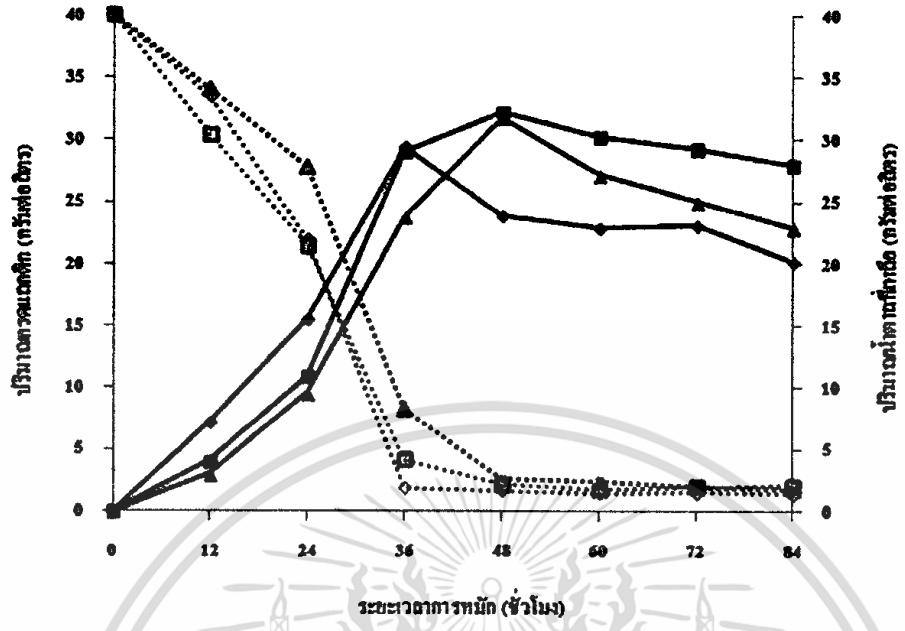
เมื่อทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมัก โดยใช้สภาวะดังนี้ คือ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.5 และอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที พบว่าเม็ดเจลแตกเนื่องจากเกิดแรงเฉือน (shear rate) จากใบพัดที่มีการกวน หรืออาจเนื่องมาจากการสะสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ภายในเม็ดเจลระหว่างการหมัก หรืออาจจะเป็นเพราะความสามารถในการลอยตัวและความเปราะบางของเม็ดเจล ซึ่งมีผลต่อการศึกษาการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำ ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาศักยภาพของเฟอร์ริกออกไซด์ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติก โดยแปรผันปริมาณเฟอร์ริกออกไซด์ดังนี้ คือ ร้อยละ 3, 4 และ 5 พบว่าผลิตกรดแลกติกได้ 29.45, 32.21 และ 31.77 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของปริมาณเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติก อัตราการผลิต ผลได้ และปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เฟอร์ริกออกไซด์ (ร้อยละ)	ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ (ร้อยละ)
3	36	29.45 ± 0.175^{b}	0.818 ± 0.005^{a}	0.772 ± 0.004^{b}	95.377 ± 0.137^{a}
4	48	32.21 ± 0.293^{a}	0.662 ± 0.005^{b}	0.851 ± 0.008^{a}	94.703 ± 0.040^{b}
5	48	31.77 ± 0.255^{a}	0.671 ± 0.006^{b}	0.848 ± 0.006^{a}	93.677 ± 0.068^{c}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 แสดงผลของปริมาณเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติก และปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

◆ กรดแลกติก, ◇ น้ำตาลที่เหลือ ของเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 3

■ กรดแลกติก, □ น้ำตาลที่เหลือ ของเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4

▲ กรดแลกติก, △ น้ำตาลที่เหลือ ของเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 5

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณเฟอร์ริกออกไซด์มีผลต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกซึ่งสังเกตได้จากเม็ดเจลที่มีการเติมเฟอร์ริกออกไซด์ทั้ง 3 ความเข้มข้นมีความเสถียรมากกว่าเม็ดเจลที่ไม่มีการเติมเฟอร์ริกออกไซด์ แม้ว่าจุลินทรีย์จะผลิตกรดออกมาย่อยเม็ดเจล โดยเมื่อทำการเติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 3 ลงในเม็ดเจล พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 29.45 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณกรดแลกติกที่ได้จะค่อย ๆ ลดลง เนื่องจากเม็ดเจลแตก เพราะถูกแรงเฉือนจากใบพัดกวน ทำให้เชื้อสามารถหลุดลอดออกมาจากเม็ดเจล โดยสังเกตได้จากอาหารมีความขุ่นมากขึ้น และเมื่อทำการเติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4 ลงในเม็ดเจล พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 32.21 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณกรดแลกติกที่ได้จะค่อย ๆ ลดลงเช่นกัน และสังเกตได้ว่าเม็ดเจลมีความคงตัวมากกว่าเม็ดเจลที่เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 3 เนื่องจากเม็ดเจลแตกน้อยกว่า แสดงให้เห็นว่าเม็ดเจลได้รับผลกระทบจากแรงเฉือนน้อยมาก สามารถที่จะนำไปใช้ศึกษาการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำใหม่ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Panda และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเซลล์ตรึงของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zymomonas mobilis ในถังหมักแบบ Expanded bed พบว่าการเติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4 ลงในเซลล์ตรึงสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวได้มากยิ่งขึ้น ทำให้เม็ดเจลไม่แตกและทนต่อแรงเฉือนได้ดี แต่เมื่อทำการเติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 5 ลงในเม็ดเจล พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 31.77 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณกรดแลกติกที่ได้จะค่อย ๆ ลดลงเช่นเดียวกัน ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้น้อยกว่าการเติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของเฟอร์ริกออกไซด์ที่มากเกินไปทำให้มีผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหารภายในเม็ดเจล ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4 ไปใช้ในการศึกษา curing time ของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

4.2 ผลการศึกษา curing time ของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

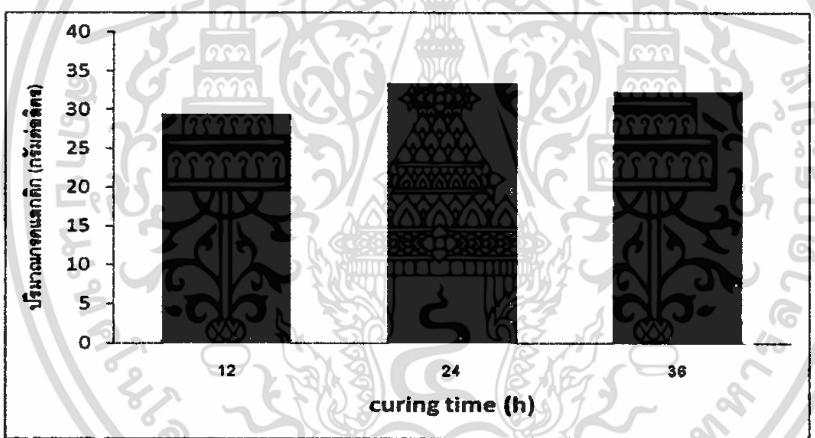
เมื่อทำการศึกษา curing time ที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกของเม็ดเจลที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมัก โดยแปรผันเวลาบ่มเม็ดเจล (curing time) ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาหมักในอาหารกากน้ำตาลโดยใช้สภาวะดังนี้ คือ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.5 และอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที พบว่าเม็ดเจลที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 33.39 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก และสังเกตเห็นว่าเม็ดเจลที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 29.40 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก เนื่องจากเม็ดเจลมีความอ่อนนุ่มมากเกินไป ไม่เสถียร ทำให้เม็ดเจลเกิดการฉีกขาดได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับใบพัดกวน ส่งผลให้มีการรั่วไหลของเซลล์จึงผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณน้อย ส่วนเม็ดเจลที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 32.36 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก ซึ่งผลิตได้ในปริมาณน้อยกว่าเม็ดเจลที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาจเป็นเพราะเมื่อเพิ่มเวลาการบ่มเม็ดเจลให้นานขึ้นทำให้เม็ดเจลแข็งตัวมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์ตรึงสัมผัสกับสารอาหารได้ไม่ทั่วถึงจึงผลิตกรดแลกติกได้น้อยกว่า ดังนั้นเม็ดเจลที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Panda และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเซลล์ตรึงของเชื้อ *Zymomonas mobilis* ในถังหมักแบบ Expanded Bed พบว่าเมื่อนำเซลล์ตรึงที่เตรียมโดยใช้สารผสมของเพคตินร้อยละ 4 และเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4 มาบ่มในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และบอแรกซ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เม็ดเจลมีความคงตัว (ไม่แตก) ตลอดระยะเวลาการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของระยะเวลาการบ่มเม็ดเจลต่อปริมาณกรดแลกติก อัตราการผลิต และผลได้ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4)

curing time (ชั่วโมง)	ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ (ร้อยละ)
12	36	29.40 ± 0.183^{c}	0.817 ± 0.005^{a}	0.764 ± 0.007^{c}	96.153 ± 0.253^{a}
24	48	33.39 ± 0.634^{a}	0.696 ± 0.013^{b}	0.882 ± 0.015^{a}	94.653 ± 0.241^{b}
36	48	32.36 ± 0.270^{b}	0.674 ± 0.006^{c}	0.861 ± 0.006^{b}	93.927 ± 0.371^{c}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)



ภาพที่ 4.2 แสดงผลของ curing time ที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4)

4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมากลับมาใช้ซ้ำ (cell recycling) เพื่อผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมากลับมาใช้ซ้ำเพื่อผลิตกรดแลกติกในถังหมัก โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ คือ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.5 และอัตราการกวน 50 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนถึงเวลา 48 ชั่วโมงของการหมัก (เนื่องจาก ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมักน้ำตาลมีการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดแลกติกเพิ่มขึ้นสูงสุด หลังจากนั้นปริมาณกรดแลกติกที่ได้จะค่อย ๆ ลดลง และปริมาณน้ำตาลเหลือน้อยมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จนเกือบหมด) หลังจากทุก ๆ รอบของการหมักที่ 48 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารกากน้ำตาลที่ใช้ในการหมักและทำซ้ำโดยใช้อาหารกากน้ำตาลปลอดเชื้อใหม่หลังจากล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ พบว่าเม็ดเจลที่เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 3, 4 และ 5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 26.08, 35.99 และ 34.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.3, 4.4 และ 4.5

จากผลการทดลองพบว่าเม็ดเจลที่เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 3 สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 6 รอบการหมัก ส่วนเม็ดเจลที่เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4 และ 5 สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้มากถึง 8 รอบการหมัก โดยจะสังเกตเห็นว่าที่ความเข้มข้นเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4 ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดมากกว่าที่ความเข้มข้นเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 5 แต่เมื่อสิ้นสุดการหมักของเม็ดเจลที่เติมเฟอร์ริกออกไซด์ทั้ง 3 ความเข้มข้น พบว่าเม็ดเจลมีการแตกและละลายตัวเกือบทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถหมักรอบต่อไปได้อีก และเมื่อพิจารณาการผลิตกรดแลกติกจะเห็นว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกลดลงเรื่อย ๆ เมื่อจำนวนรอบในการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญในถังหมักและสัมผัสกับสภาวะความเป็นกรดที่เกิดขึ้นเป็นระยะเวลานาน จนกระทั่งเซลล์อาจเกิดการเสื่อมสภาพ (cell degeneration) เซลล์อ่อนแอ (inactivated cells) ซึ่งความเสื่อมสภาพของเม็ดเจลนี้ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดแลกติกลดลง สอดคล้องกับการทดลองของ อรทัย วิไลวัลย์ (2553) ศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) เพื่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 ในการผลิตกรดแลกติก พบว่าสามารถนำเม็ดเจลเพคตินกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 12 รอบการหมัก Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการประยุกต์ใช้เพคเตตในการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* สำหรับการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ พบว่า สามารถนำเม็ดเจลเพคเตตกลับมาใช้ซ้ำได้มากถึง 16 รอบการหมัก โดยความสามารถในการหมักน้ำตาลแลกโตสในอาหารจากเวย์ไม่เปลี่ยนแปลง แต่หลังจากผ่านรอบการหมักที่ 16 ความสามารถในการหมักลดลง เกิดการยับยั้งการหมักน้ำตาลแลกโตสในเวย์หลังจากรอบการหมักที่ 16 ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเสื่อมสภาพของชีวมวลที่ห่อหุ้มเซลล์ทำให้ความสามารถในการหมักกรดแลกติกลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของจำนวนรอบการหมักกรดแลกติก อัตราการผลิต และผลได้ ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคติน จากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 3)

จำนวนรอบการหมัก	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)
1	25.76 ± 0.056^{b}	0.537 ± 0.002^{b}	0.677 ± 0.002^{a}
2	26.08 ± 0.056^{a}	0.543 ± 0.001^{a}	0.676 ± 0.002^{a}
3	24.00 ± 0.131^{c}	0.500 ± 0.003^{c}	0.620 ± 0.004^{b}
4	22.19 ± 0.076^{d}	0.462 ± 0.002^{d}	0.580 ± 0.002^{c}
5	16.14 ± 0.197^{e}	0.336 ± 0.004^{e}	0.415 ± 0.005^{d}
6	10.07 ± 0.296^{f}	0.210 ± 0.006^{f}	0.260 ± 0.008^{e}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.4 แสดงผลของจำนวนรอบการหมักกรดแลกติก อัตราการผลิต และผลได้ ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคติน จากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4)

จำนวนรอบการหมัก	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)
1	34.02 ± 0.128^{b}	0.709 ± 0.003^{b}	0.892 ± 0.004^{b}
2	35.99 ± 0.474^{a}	0.750 ± 0.010^{a}	0.932 ± 0.012^{a}
3	33.15 ± 0.947^{b}	0.691 ± 0.020^{b}	0.856 ± 0.024^{c}
4	31.68 ± 1.355^{c}	0.660 ± 0.028^{c}	0.826 ± 0.035^{d}
5	28.94 ± 0.364^{d}	0.603 ± 0.008^{d}	0.756 ± 0.009^{e}
6	21.53 ± 0.070^{e}	0.449 ± 0.002^{e}	0.556 ± 0.002^{f}
7	21.02 ± 0.026^{e}	0.438 ± 0.001^{e}	0.541 ± 0.001^{f}
8	15.84 ± 0.233^{f}	0.330 ± 0.005^{f}	0.407 ± 0.006^{g}

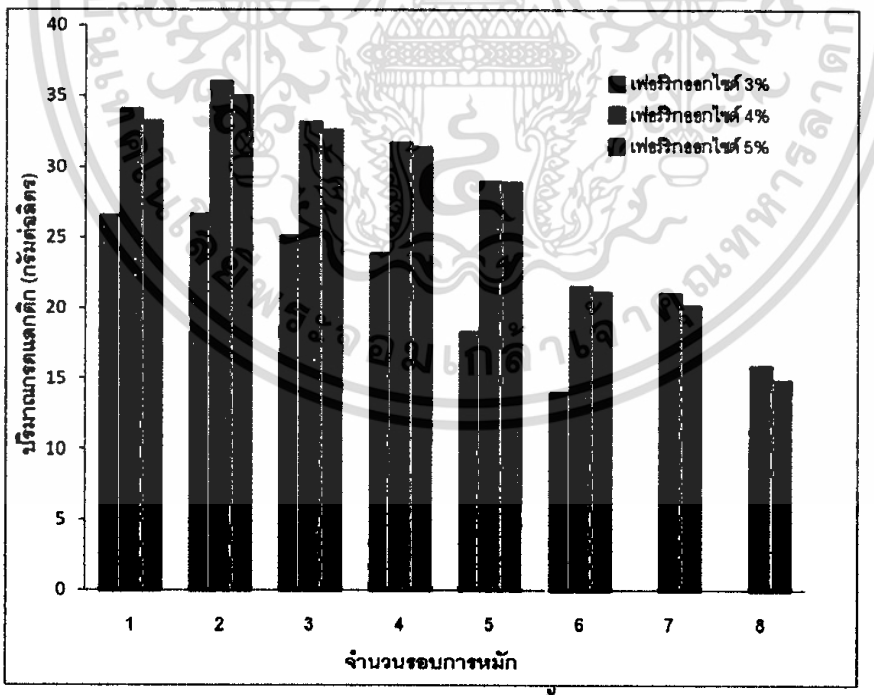
หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงผลของจำนวนรอบการหมักกรดแลกติก อัตราการผลิต และผลได้ ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 5)

จำนวนรอบการหมัก	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)
1	33.24 ± 0.056^{b}	0.693 ± 0.002^{b}	0.874 ± 0.002^{b}
2	34.99 ± 0.245^{a}	0.729 ± 0.005^{a}	0.915 ± 0.007^{a}
3	32.63 ± 0.190^{c}	0.680 ± 0.004^{c}	0.848 ± 0.005^{c}
4	31.41 ± 0.151^{d}	0.654 ± 0.003^{d}	0.821 ± 0.004^{d}
5	28.85 ± 0.374^{e}	0.601 ± 0.007^{e}	0.752 ± 0.010^{e}
6	21.07 ± 0.159^{f}	0.439 ± 0.004^{f}	0.546 ± 0.004^{f}
7	20.12 ± 0.053^{g}	0.419 ± 0.001^{g}	0.519 ± 0.001^{g}
8	14.83 ± 0.407^{h}	0.309 ± 0.009^{h}	0.382 ± 0.011^{h}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.3 แสดงจำนวนรอบของการหมักกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาศักยภาพของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าเม็ดเจลที่เติมเฟอร์ริกออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 32.21 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

เมื่อศึกษา curing time ของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าเม็ดเจลที่ผ่านการบ่ม (curing) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 33.39 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมากลับมาใช้ซ้ำ (cell recycling) เพื่อผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าสามารถนำเม็ดเจลที่เติมเฟอร์ริกออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 กลับมาใช้ซ้ำได้ 8 รอบการหมัก โดยผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 35.99 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.750 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ 0.932 กรัมต่อกรัม ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

ดังนั้นเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) จึงมีศักยภาพในการเพิ่มความแข็งแรงและช่วยลดความสามารถในการลอยตัวของเม็ดเจล ทำให้เม็ดเจลมีความเสถียรมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้เซลล์ตรึงผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณมากขึ้นอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในขั้นตอนการผลิตกรดแลกติกในถังหมักแบบ packed bed เพื่อที่จะสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้จำนวนรอบการหมักมากขึ้น เพราะการใช้ถังหมักแบบ stirred tank ทำให้เม็ดเจลแตก เนื่องจากเกิดแรงเฉือนของใบพัดกวน

2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในขั้นตอนการทำกรดแลกติกให้บริสุทธิ์ เพื่อเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กชพรรณ วงค์เจริญ. 2548. "การศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณสารเพคติน และสารอัลคาลอยด์ในกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.)." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

กนกพร สังขรักษ์ และเจนจิรา โตะแบ. 2552. "เพคตินจากเศษผักกาดขาวและการประยุกต์ใช้." การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 19.

กรมศุลกากร. 2550. "พิกัดอัตราอากรขาเข้าสารจำพวกเพคติน." ออนไลน์เข้าถึงได้จาก www. customsclinic.org. สืบค้นเมื่อวันที่ 24 สิงหาคม 2556.

จงกมล จริยกุล. 2550. "การผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จิรศักดิ์ ศรีสมศักดิ์ และ ธนากร อัปมะเทา. 2543. "การหาปริมาณเพคตินจากใบหมาน้อย." ปัญหาพิเศษ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

จีราภรณ์ สังข์ผุด. 2549. "การผลิตและคุณสมบัติของเพคตินผงที่สกัดจากกรุงเขมา." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร (วิทยาศาสตร์การอาหาร) มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ .

จุฬาลักษณ์ ชูพรหม. 2553. "การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติกและศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดีในหลอดทดลอง." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

ญานี ลีตะนันท์. 2541. "การสกัดและการทำกรดแลกติกให้บริสุทธิ์จากน้ำหมัก." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณรงค์ ศิขิรัมย์. 2546. "การสกัดและการหาลักษณะเฉพาะของเพคตินที่ได้จากกากฝรั่ง." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอกาส, วรรณา กาญจนมยูร และ ปีนะเนตร ศรีธาราธิคุณ. 2545. การวิเคราะห์ปริมาณเพคตินในใบหมาน้อยด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำทิพย์ นาเชียงใต้ และ ยุวภา ทัศบุต. 2550. "ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อคุณภาพของเพคตินที่สกัดได้จากใบหมาน้อย." ปริญญาวิทยาศาสตร์สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร.

พยอม ตันติวัฒน์. 2521. สมุนไพร. กรุงเทพฯ: สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย.

พรวิสาข์ ยุ่นประยงค์. 2551. "การผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อยับยั้งราและยีสต์ โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พิเชษฐ เทบำรุง. 2546. "การหาปริมาณเพคตินและคุณภาพของเพคตินจากใบหมาน้อย." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

มัทนียา จงนิตยกาล. 2545. "การบำบัดน้ำทิ้งขั้นต้นของโรงงานนมด้วยแบคทีเรียแลกติก." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

มาริษา ไชยโอสถ. 2549. "การสกัดเพคตินจากของเหลือทิ้งของขนุน." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา.

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

วรนงค์ ทองสมบัติ. 2546. "การผลิตใยอาหารและน้ำฝรั่งพร้อมดื่มเติมใยอาหาร." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วราภรณ์ ชัยโอภาส. 2538. การสกัดเพคตินในผลไม้ที่เป็นอาหาร. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 10(2) : 43-48.

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

ศิริประภา มั่นตรง. 2550. "การเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยการใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิริวรรณ ศรีสรณัตร, สมใจ ศิริโภค และ เทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอภาส. 2533. รายงานการวิจัยการศึกษาแนวทางการสกัดเพคตินจากใบหมาน้อยและใบบัวโคก. มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม.

สมใจ ศิริโภค. 2544. จุลชีวอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2544. กากน้ำตาล. [Online]. Available : www. itstr.or.th

สัมภาษณ์ คำผุย. 2533. "การสกัดเพคตินจากใบหมาน้อย" วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2544. เทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. 2552. อุตสาหกรรมไบโอพลาสติก.

สุขใจ ชูจันทร์. 2554. การผลิตกรดอินทรีย์จากวัสดุเหลือใช้มวลชีวภาพ. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรทัย วิไลวัลย์. 2553. "การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบจากใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 เพื่อผลิตกรดแลกติก." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อาทิตย์ ธานี. 2548. "การผลิตกรดแลกติกจากกลูโคส ไซโลส และสารสกัดจากชานอ้อยโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* IO-1." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Akerberg, C. and Zacchi, G. 2000. "An economic evoluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour." **Bioresouce Tecnology**. 75 : 119-126.

Axelsson, L.T. 1993. Lactic acid bacteria : Classification and physiology. In: Salminen, S. von Wright, A. editors. Lactic acid bacteria. New york : Marcelp.

Bae, S. and Shoda, M. 2004. "Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium." **Biotechnology Progress**. 20(5) : 1366-1371.

Bergmaier, D., Champagne, C.P. and Lacroix, C. 2003. "Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M." **Applied Microbiology**. 95 : 1049-1057.

Calabia, B.P. and Tokiwa, Y. 2007. "Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*." **Biotechnology Letters**. 29(9) : 1329-1332.

Cheetham, P.S.J. 1980. "Developments in the immobilization of microbial cells and their application." **Journal of Biotechnology**. 4 : 189-242.

Chibata, I. and Tosa, T. 1970. "Transformation of organiccompounds by immobilized microbial cells." **Advances in Applied Microbiology**. 22 : 1-25.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Christensen, S.H. 1986. "Pectins in Food hydrocolloids." boca Raton, FL, Glicksman: CRC Press. 206-207.

Cui, F., Li, Y. and Wan, C. 2011. "Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*." **Bioresource Technology**. 102 : 1831-1836.

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.

Dembczynski, R. and Jankowski, T. 2002. "Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules." **Enzyme Microbiology Technology**. 31 : 111-115.

Dholakiya, B., Choubisa, B., Patel, H. and Patel, M. 2012. "Microbial production of lactic acid by using crude glycerol from biodiesel." **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**. 2(1) : 90-93.

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.

Food and Drug Administration. 1998. Code of Federal Regulations. Washington. D.C. : U.S. Government Printing Office.

Gardner, W.H. 1972. "Acidulants in food processing." **Hand book of food additives**. 2 nd ed.

Giordano, L. C. R., Trovati1, J., and Schmidell, W. 2008. "Continuous production of ethanol from starch using glucoamylase and yeast co-immobilized in pectin gel." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 147 : 47–61.

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.

Hofvendahl, K. and Hagerdal, H. 2000. "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources." **Enzyme and microbial technology**. 26(2-4) : 87-107.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Idris, A. and Suzana, W. 2006. "Effect of sodium alginate concentration, bead diameter , initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*." **Process Biochemistry**. 41 : 1117–1123.

Jianlong, W. 2000. "Production of citric acid by immobilized *Aspergillus niger* using a rotating biological contactor (RBC)." **Bioresource Technology**. 75 : 245-247.

Kertesz, Z.I. 1951. **The pectic substances**. New York : Interscience Publishers Inc.

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.

Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E. and Kanellaki, M. 2005. "*Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production." **Process Biochemistry**. 40 : 411–416.

Marques, S., Santos, J. A. L., Girio, F. M. and Roseiro, J. C. 2008. "Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation." **Biochemistry Engineering Journal**. 41 : 210-216.

May, C.D. 1997. Pectin In: Thickening and Gelling Agents for Food. New York : Ed. Imeson, A. Chapman and hall. 230-261.

Mirdamadi, S., Atashgahi, S., Rajabi, A., Mohseni, F.A., Roayaei, M. and Hamedi, J. 2008. "Cell entrapment of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 39392 for lactic acid production." **Iranian Journal of Biotechnology**. 6(1) : 6.

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 a from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*." **Bioresource Technology**. 78 : 149–153.

Nancib, A., Nancib, N. and Boudrant, J. 2009. "Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*." **World Journal Microbial Biotechnology**. 25 : 1423-1429.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A. 2004. "Lactic acid fermentation and its product polymerization." **Electronic Journal of Biotechnology**. 7 : 167 -179.

Nussinovitch, A. 1997. Pectins. In: **Hydrocolloid Applications**. Chapman & Hall, New York. 83-104.

Oakenfull, D.G. 1991. The Chemistry of High Methoxyl Pectin. In : **Chemistry and Technology of Pectin**. Ed. Walter, R.H., Cornell University Geneva , New York. 87-106.

Ogumbanwo, 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.

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.

Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Knill, C.J. and Kosseva, M.R. 2007. "Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L(+) lactic acid production from whey." **Applied Microbiology Biotechnology**. 74 : 35–42.

Petrov, K., Urshev, Z. and Petrova, P. 2008. "L(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84." **Food Microbiology**. 25 : 550–557.

Prescott, S.C. and Dunn, G.C. 1959. **Industry Microbiology**. 3rd ed. Tokyo : Kogakushi.

Rao, C.S., Prakasham, R.S., Rao, A.D. and Yadav, J.S. 2008. "Production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* immobilized in functionalized alginate matrices." **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 24 : 1411–1415.

Ratledge, C. and Kristiansen, B. 2006. Basic Biotechnology. 3rd edition. New York : Cambridge University Press.

Roehr, M. 1996. **Biotechnology** Vol.6. Weinheim : VCH verlagsgesellschaft mbH.

Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A. 2004. **Lactic acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects.** 2nd ed. New York : Marcel Dekker.

Silveira, M.S., Fontes, C.P.M.L., Guilherme, A.A., Fernandes, F.A.N. and Rodrigues, S. 2012. "Cashew apple juice as substrate for lactic acid production." **Food Bioprocess Technology**. 5 : 947-953.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singthong, J., Ningsanond, S., Cui, S. W. and Goff, H. D. 2005. "Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin." **Food Hydrocolloids.** 19 : 793-801.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." **Food Microbiology.** 36 : 1-29.

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.

Vishnu, C., Seenaya, G. and Reddy, G. 2000. "Direct conversion of starch to L(+)lactic acid amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6." **Bioprocess Engineering.** 23 : 155-158.

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.

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.

Youssef, C.B., Guillou, V. and Dichara, A.O. 2000. "Modelling and adaptive control strategy in lactic acid fermentation process." **Control Engineering Practice.** 8 : 1297-1307.

Yu, L., Lei, T., Rena, X., Pei, X. and Feng, Y. 2008. "Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466." **Biochemical Engineering Journal.** 39 : 496–502.

[Online]. Available : http://www.gutflora.org/science/news/news20081028.html

[Online]. Available : http://www.purac.com

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

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

[Online]. Available : http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=146

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว MRS (จงกมล จริยกุล, 2550; อรทัย วิไลวัลย์, 2553)

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
โซเดียมแอซีเตต (CH_3COONa)	5	กรัม
ไดรแอมโมเนียมแอซีเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.05	กรัม

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารแข็ง MRS (จงกมล จริยกุล, 2550; อรทัย วิไลวัลย์, 2553)

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
โซเดียมแอซีเตต (CH_3COONa)	5	กรัม
ไดรแอมโมเนียมแอซีเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . 4H_2O$)	0.05	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหารกากน้ำตาล

(ประยุกต์จากอรทัย วิไลวัลย์, 2553; Youssef และคณะ, 2000; Vasala และคณะ, 2005)

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

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในสารละลายกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
2. หลอดทดลอง
3. ปิเปตต์
4. คิวเวตต์

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5 เปอร์เซ็นต์, specific gravity 1.84)
2. ฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางที่ ข-1 การเจือจางสารละลายกลูโคสด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ไมโครลิตร)	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 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอลร้อยละ 5 ลงไป 1 มิลลิลิตร

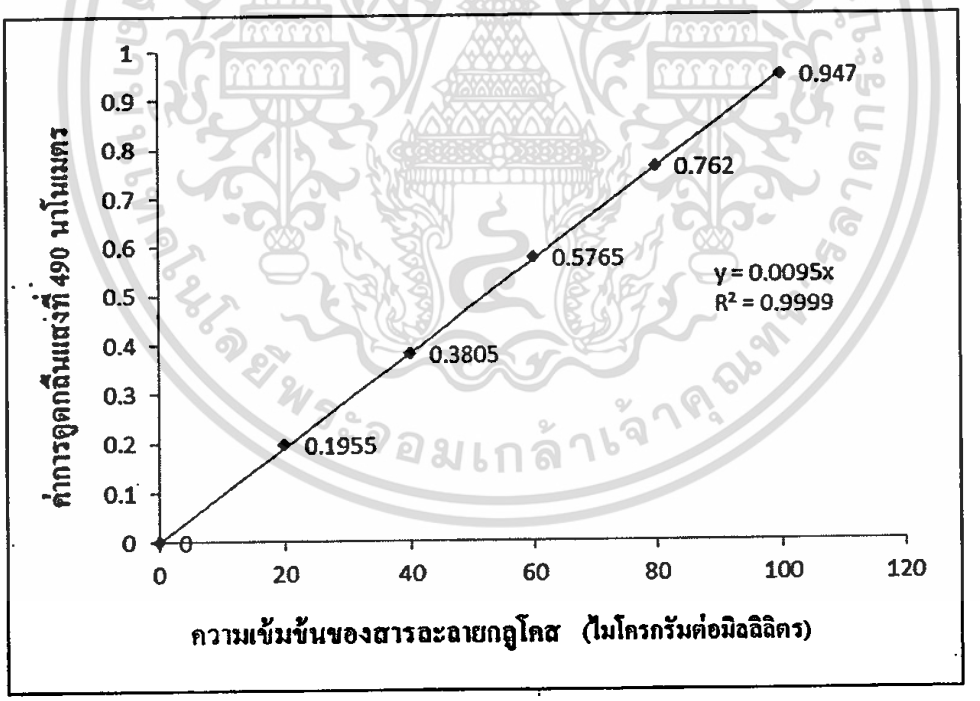
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็วโดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อย ๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด

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

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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



ภาพที่ ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

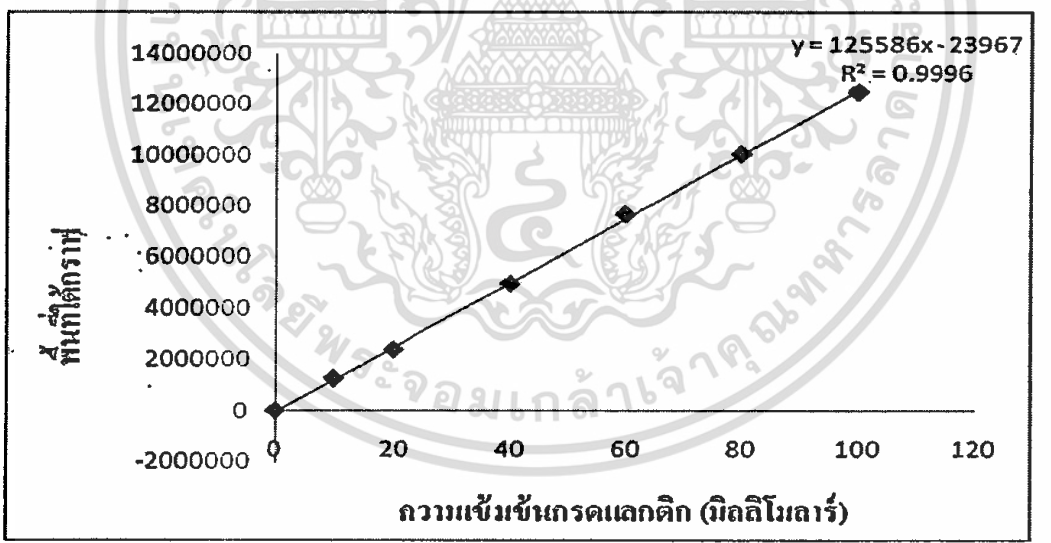
2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วย HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

วิธีการ

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ Inertsil C8-3 โดยมีกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV detector ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (อรทัย วิไลวัลย์, 2553) ปริมาตรตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ คือ 20 ไมโครลิตร เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง คือ 45 นาที นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแลกติก

การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแลกติก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแลกติกความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดแลกติก โดยคำนวณความเข้มข้นของกรดแลกติกมาตรฐานที่มีหน่วยมิลลิโมลาร์เป็นหน่วยกรัมต่อลิตร แสดงกราฟมาตรฐานกรดแลกติกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังภาพที่ ข-2

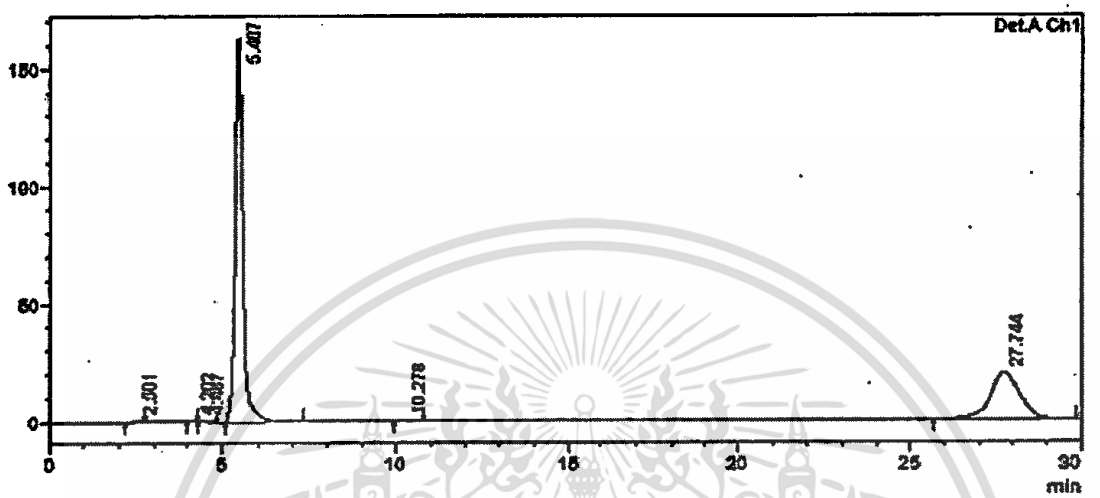


ภาพที่ ข-2 แสดงกราฟมาตรฐานกรดแลกติกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างโครมาโตแกรมของกรดแลกติก

โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดแลกติก ดังภาพที่ ข-3 แสดงให้เห็น retention time ของกรดแลกติก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.467



ภาพที่ ข-3 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายกรดแลกติกมาตรฐาน

3. วิธีคำนวณค่าจลนพลศาสตร์

3.1 ผลได้ (Yield; $Y_{p/s}$)

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

Δp = ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้น

Δs = ปริมาณซับสเตรตที่ถูกใช้ไป

3.2 อัตราการผลิตของผลิตภัณฑ์ (Q_p)

$$Q_p = \Delta p / t$$

Δp = ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

t = เวลาที่ใช้ในการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
ข้อมูลการทดลอง

1. ผลการศึกษาศักยภาพของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 1.1 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลกติกและปริมาณน้ำตาลที่เหลือของการศึกษาศักยภาพของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร) เฟอร์ริกออกไซด์ (ร้อยละ)			ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) เฟอร์ริกออกไซด์ (ร้อยละ)		
	3	4	5	3	4	5
0	0	0	0	40	40	40
12	7.18	4.06	2.98	33.43	30.38	34.05
24	15.57	10.95	9.58	21.94	21.47	27.82
36	29.45	29.11	23.82	1.85	4.14	8.22
48	23.88	32.21	31.77	1.65	2.12	2.53
60	22.94	30.29	27.21	1.42	1.71	2.38
72	23.10	29.32	25.02	1.46	1.94	1.97
84	20.17	28.04	22.92	1.37	2.03	1.74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการศึกษา curing time ของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 2.1 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลกติกและปริมาณน้ำตาลที่เหลือของการศึกษา curing time ของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		
	curing time (ชั่วโมง)			curing time (ชั่วโมง)		
	12	24	36	12	24	36
0	0	0	0	40	40	40
12	7.41	4.22	3.58	33.15	30.24	33.58
24	15.20	11.40	9.94	20.23	21.35	27.29
36	29.40	29.16	25.14	1.54	4.67	7.95
48	25.40	33.39	32.36	1.32	2.14	2.43
60	24.63	29.99	27.94	1.28	1.89	2.17
72	24.89	30.76	25.52	1.46	1.94	1.86
84	22.62	29.51	24.02	1.15	2.05	1.53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมากลับมาใช้ซ้ำ (cell recycling) เพื่อผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 3.1 แสดงจำนวนรอบของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมากลับมาใช้ซ้ำ ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในถังหมักขนาด 5 ลิตร (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 3)

จำนวนรอบที่หมัก	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)					ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)				
	0	12	24	36	48	0	12	24	36	48
1	0	8.01	16.22	26.55	25.76	40	31.22	19.41	3.95	1.97
2	0	18.32	26.92	26.64	26.08	40	25.92	4.50	3.47	1.42
3	0	17.81	23.05	25.05	24.02	40	21.33	4.12	3.01	1.30
4	0	14.34	16.73	23.87	22.19	40	12.46	3.83	2.77	1.72
5	0	10.55	18.96	18.23	16.14	40	15.65	2.66	1.23	1.15
6	0	7.95	14.10	13.97	10.07	40	14.97	2.01	1.27	1.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 แสดงจำนวนรอบของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมากลับมาใช้ซ้ำ ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในถังหมักขนาด 5 ลิตร (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4)

จำนวนรอบที่หมัก	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)					ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)				
	0	12	24	36	48	0	12	24	36	48
1	0	12.02	20.23	30.56	34.02	40	29.04	17.25	3.26	1.87
2	0	22.33	30.93	30.65	35.99	40	23.81	4.21	3.15	1.39
3	0	21.82	27.06	29.06	33.15	40	19.18	4.17	3.08	1.30
4	0	19.11	24.11	28.44	31.68	40	13.30	3.94	2.83	1.65
5	0	18.32	20.74	27.88	28.94	40	10.35	3.55	2.43	1.74
6	0	16.81	21.69	22.73	21.53	40	12.61	2.68	1.59	1.26
7	0	14.56	22.97	22.24	21.02	40	16.64	2.33	1.21	1.13
8	0	11.96	18.11	17.98	15.84	40	12.86	2.02	1.04	1.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 แสดงจำนวนรอบของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมา กลับมาใช้ซ้ำ ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในถังหมักขนาด 5 ลิตร (เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 5)

จำนวนรอบที่หมัก	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)					ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)				
	ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)					ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)				
	0	12	24	36	48	0	12	24	36	48
1	0	11.11	19.32	29.65	33.24	40	30.03	18.24	3.55	1.98
2	0	21.42	29.92	29.74	34.99	40	24.80	4.64	3.45	1.79
3	0	20.91	26.15	28.15	32.63	40	20.16	4.28	3.12	1.51
4	0	18.2[illegible]	23.20	27.53	31.41	40	14.29	3.99	2.72	1.73
5	0	17.4[illegible]	19.83	26.97	28.85	40	11.34	3.24	2.59	1.63
6	0	15.9[illegible]	20.78	21.82	21.07	40	13.61	2.78	1.63	1.39
7	0	13.6[illegible]	21.95	21.33	20.12	40	17.62	2.32	1.30	1.25
8	0	11.0[illegible]	7.20	16.97	14.83	40	13.85	2.16	1.14	1.19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ผลการศึกษาลักษณะภาพของเฟอร์ริกออกไซด์ (Fe_2O_3) ต่อความแข็งและความเสถียรของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lactic acid	Between Groups	13.215	2	6.607	109.194	.000
	Within Groups	.363	6	.061		
	Total	13.578	8			
Sugar	Between Groups	4.397	2	2.199	264.905	.000
	Within Groups	.050	6	.008		
	Total	4.447	8			
Productivity	Between Groups	.046	2	.023	798.085	.000
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.046	8			
Yield	Between Groups	.012	2	.006	155.968	.000
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.012	8			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactic acid

Duncan[a]

เฟอร์ริกออกไซด์ (ร้อยละ)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	3	29.4500	
5	3		31.7700
4	3		32.2133
Sig.		1.000	.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Sugar

Duncan[a]

เฟอร์ริกออกไซด์ (ร้อยละ)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
5	3	93.67667		
4	3		94.70333	
3	3			95.37667
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Productivity

Duncan[a]

เฟอร์ริกออกไซด์ (ร้อยละ)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	3	.66200	
5	3	.67133	
3	3		.81800
Sig.		.077	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Yield

Duncan[a]

เฟอร์ริกออกไซด์ (ร้อยละ)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	3	.77200	
5	3		.84767
4	3		.85067
Sig.		1.000	.574

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการศึกษา curing time ของเม็ดเจลในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lactic acid	Between Groups	25.743	2	12.871	76.012	.000
	Within Groups	1.016	6	.169		
	Total	26.759	8			
Sugar	Between Groups	7.736	2	3.868	44.648	.000
	Within Groups	.520	6	.087		
	Total	8.256	8			
Productivity	Between Groups	.035	2	.018	227.607	.000
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.036	8			
Yield	Between Groups	.024	2	.012	116.978	.000
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	.024	8			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactic acid

Duncan[a]

curing time (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
12	3	29.4000		
36	3		32.3600	
24	3			33.3900
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Sugar

Duncan[a]

curing time (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
36	3	93.92667		
24	3		94.65333	
12	3			96.15333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Productivity

Duncan[a]

curing time (hour)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
36	3	.67433		
24	3		.69567	
12	3			.81667
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Yield

Duncan[a]

curing time (hour)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
	3	.76433		
24	3		.86133	
12	3			.88200
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา กลับมาใช้ซ้ำ (cell recycle) เพื่อผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

(เติมเฟอร์รีกออกไซด์ร้อยละ 3)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lactic acid	Between Groups	604.345	5	120.869	4663.756	.000
	Within Groups	.311	12	.026		
	Total	604.656	17			
Productivity	Between Groups	.262	5	.052	4737.584	.000
	Within Groups	.000	12	.000		
	Total	.262	17			
Yield	Between Groups	.418	5	.084	4774.834	.000
	Within Groups	.000	12	.000		
	Total	.418	17			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactic acid

Duncan[a]

cycle	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
6	3	10.0700					
5	3		16.1400				
4	3			22.1900			
3	3				24.0000		
1	3					25.7600	
2	3						26.0800
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Productivity

Duncan[a]

cycle	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
6	3	.21000					
5	3		.33567				
4	3			.46167			
3	3				.49967		
1	3					.53667	
2	3						.54300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Productivity

Duncan[a]

cycle	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
6	3	.21000					
5	3		.33567				
4	3			.46167			
3	3				.49967		
1	3					.53667	
2	3						.54300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Yield

Duncan[a]

cycle	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
6	3	.25967				
5	3		.41467			
4	3			.57967		
3	3				.61967	
2	3					.67567
1	3					.67667
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.775

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 4)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lactic acid	Between Groups	1137.172	7	162.453	410.585	.000
	Within Groups	6.331	16	.396		
	Total	1143.502	23			
Productivity	Between Groups	.494	7	.071	409.239	.000
	Within Groups	.003	16	.000		
	Total	.497	23			
Yield	Between Groups	.788	7	.113	423.305	.000
	Within Groups	.004	16	.000		
	Total	.792	23			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactic acid

Duncan[a]

cycle	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
8	3	15.8400					
7	3		21.0200				
6	3		21.5300				
5	3			28.9400			
4	3				31.6800		
3	3					33.1500	
1	3					34.0200	
2	3						35.9900
Sig.		1.000	.335	1.000	1.000	.110	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Productivity

Duncan[a]

cycle	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
8	3	.32967					
7	3		.43833				
6	3		.44867				
5	3			.60267			
4	3				.66033		
3	3					.69067	
1	3					.70867	
2	3						.75000
Sig.		1.000	.349	1.000	1.000	.113	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yield

Duncan[a]

cycle	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
8	3	.40667						
7	3		.54100					
6	3		.55600					
5	3			.75567				
4	3				.82633			
3	3					.85633		
1	3						.89167	
2	3							.93200
Sig.		1.000	.277	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(เติมเฟอร์ริกออกไซด์ร้อยละ 5)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lactic acid	Between Groups	1163.373	7	166.196	3047.373	.000
	Within Groups	.873	16	.055		
	Total	1164.245	23			
Productivity	Between Groups	.505	7	.072	2949.905	.000
	Within Groups	.000	16	.000		
	Total	.505	23			
Yield	Between Groups	.820	7	.117	3068.336	.000
	Within Groups	.001	16	.000		
	Total	.820	23			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactic acid

Duncan[a]

cycle	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
8	3	14.8300							
7	3		20.1200						
6	3			21.0700					
5	3				28.8500				
4	3					31.4100			
3	3						32.6300		
1	3							33.2400	
2	3								34.9900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Productivity

Duncan[a]

cycle	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
8	3	.30900							
7	3		.41867						
6	3			.43900					
5	3				.60133				
4	3					.65367			
3	3						.67967		
1	3							.69267	
2	3								.72900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yield

Duncan[a]

cycle	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
8	3	.38167							
7	3		.51867						
6	3			.54567					
5	3				.75200				
4	3					.82067			
3	3						.84767		
1	3							.87367	
2	3								.91533
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)	รศ. สุขใจ ชูจันทร์
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)	Assoc. Prof. Sukjai Choojun
หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน	3 3499 00412 57 7
หมายเลขบัตรประจำตัวนักวิจัย	39-40-0259
ตำแหน่งปัจจุบัน	รองศาสตราจารย์ ประจำสาขาชีววิทยา (เทคโนโลยีชีวภาพ)
หน่วยงานต้นสังกัด	สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520 โทร. 02-329-8400-11 ต่อ 240 โทรสาร. 02-3294414 E-mail : Kcsukjai@Kmitl.ac.th

ประวัติการศึกษา

- วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

- Food Microbiology
- Wastes Utilization

ผลงานที่ตีพิมพ์ (งานวิจัยทั้งหมดเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย)

- Steinböck, F.A, Held, I., Choojun, S., Harmsen, H., Röhr, M., Kubicek-Pranz, E.M., Kubicek, C.P. 1991. Regulatory aspects of carbohydrate metabolism in relation to citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. **Acta Biotechnol**. 11 : 571-581.
- Steinböck, F., Choojun, S., Held, I., Röhr, M., Kubicek, C.P. 1994. Characterization and regulatory properties of a single hexokinase from the citric acid accumulating fungus *Aspergillus niger*. **Biochem Biophys** Acta. 1200 : 215-223.
- Somathiti S. and Surappunpisid V., 1988.Type and Numbers of Bacteria in a Thai Beef Sausage (Mum) Fermentation. Proceedings of the Food Conference' 88. Bangkok, Thailand. October. 24 -26., p. 399-402.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Choojun S. and Teerawatsathien N.,1992.A Study of Sugar Type and Suitable Sugar Concentration for Citric Acid Production by *Aspergillus niger* and its Mutants. Proceeding of the 8th Biotechnology for Progress and Development. Bangkok, Thailand.p.105.
- Choojun S. and Charuthanawat P., 1992. Passion Fruit Power. Proceeding of the 8th Biotechnology for Progress and Development. Bangkok, Thailand.p.133
- Choojun S. and Wiangwalai H. 2006. Production of Xylitol from Agricultural Wastes by *Candida guilliermondii* TISTR 5068. **Journal of Science Ladkrabang**. Vol.15 No.1 : 24- 37.
- Choojun S. and Aschariyhaphotha W. 2006. Research and Development on Wine Product by Mushroom Rermentation Substituted for using Yeast being as Health Food. **Journal of Science Ladkrabang**. Vol. 15 No.2 : 44- 59.
- Choojun S. , Srabua P. And Kimheng P. 2007. The Utilization of Agricultural and Wood Industries for Xylitol Production by Biological Process. **Journal of Science Ladkrabang**. Vol. 16 No.1 : 77- 90.
- Choojun S. and Kiatmanaroj S. 2007. Glucoamylase Production from Agricultural Wastes by *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310. **Journal of Science Ladkrabang**. Vol. 16 No.2 : 56- 76.
- Choojun S. and Sutthisuwan R. 2007. Studies on Propionic acid Production from Whey by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 in Combination with Lacticoccus lactis TISTR 1401. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Nong Khai, Thailand. November 1-3.
- Choojun S. and Aramruang S. 2007. Production of Propionic acid from Whey by Batch Fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Nong Khai, Thailand. November 1-3.
- Choojun S. and Jariyakul J. 2007. Lactic acid Production from Whey by *Lactobacillus casei* TISTR 1341. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Nong Khai, Thailand. November 1-3.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Choojun S. and Mantrong S. 2007. Increase Productivity of Lactic acid from Whey using Calcium Alginate Immobilized *Lactobacillus casei* TISTR 1341. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Nong Khai, Thailand. November 1-3.
- Choojun S. and Yoonprayong P. 2007. Production of Propionic acid for Antifungal Activity by Calcium Alginate Immobilization of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 using Whey as Substrate. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Nong Khai, Thailand. November 1-3.
- Choojun S. and Sutthisuwan R. 2008. Lactic acid Production from Whey by Mixed Culture of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and *Lactobacillus casei* TISTR 1341. **Journal of Science Ladkrabang**. Vol. 17 No.1 : 63-73.
- Choojun S. and Sutthisuwan R. 2008. Development of Biotechnological Lactic acid Production by Coimmobilized *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and *Lactobacillus casei* TISTR 1341. The 34th Congress on Science and Technology of Thailand. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. October 31- November 2.
- Choojun S. and Sutthisuwan R. 2009. Development and Utilization of Propionic Acid Production from Whey by Coimmobilized Cultures of *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 442 in Combination with *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and Cell Recycling. Thailand Research Symposium 2009. Central World Plaza, Bangkok, Thailand. August 26-30.
- Choojun, S. and Suttisuwan. R. 2010. Lactic acid production by coimmobilized cells of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and *Lactobacillus casei* TISTR 1341 using whey as substrate . **CMU. J. Nat. Sci.** 9(2) : 245-254.
- Choojun, S. and Yoonprayoung, P. 2011. Production of propionic acid for antifungal activity by calcium alginate immobilization of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965. **CMU. J. Nat. Sci.** (accepted)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้