

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของแร่ธาตุปริมาณน้อยต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei*

ATCC 10863



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

72596

20 ส.ย. 2550

b. 11x61853
i.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of Trace Element on Lactic acid Production by *Lactobacillus casei*

ATCC 10863



**Chiraporn Praipattarakul
Nattawut Hoesuwon**

A special Project Submitted in Partial of Requirement for Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Science

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ ผลของแร่ธาตุปริมาณน้อยต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863
นักศึกษา นางสาวจิราภรณ์ ไพรัชทรกุล นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 46050115
 นายณัฐวุฒิ ให้อู่สุวรรณ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 46050119
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.สุโขใจ ชูจันทร์
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.พรณี รุติภักขิต	
กรรมการ อ.ศรีสุภาพ พูนลาภเดชา	
กรรมการ รศ.สุโขใจ ชูจันทร์	

(..... นว.....)

รศ.ดร.นवलพรรณ วัฒนอง
 หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	ผลของแร่ธาตุปริมาณน้อยต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863
นักศึกษา	นางสาวจิราภรณ์ ไพรภัทรกุล นายณัฐวุทธิ ให้สุวรรณ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาแหล่งแร่ธาตุปริมาณน้อยของความเข้มข้นของแมกนีเซียม และแมงกานีสที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยทำการศึกษาแมกนีเซียมที่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร และศึกษาแมงกานีสที่ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการหมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าแมกนีเซียมที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุดคือ 25.83 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรดคือ 0.973 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งมีอัตราการผลิตสูงสุดเป็น 0.358 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 72 ของระยะเวลาการหมัก และแมงกานีสที่ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุดคือ 25 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรดคือ 0.969 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งมีอัตราการผลิตกรดสูงสุดเป็น 0.347 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 72 จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลการผลิตกรดระหว่างการหมักโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร และ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863ซึ่งพบว่า ถังหมักขนาด 2 ลิตรมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกสูงกว่าฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ซึ่งถังหมักขนาด 2 ลิตรสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 15.27กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.159 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของผลผลิตคือ 0.719กรัมต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

Special Project Title	Effect of Trace Element on Lactic acid Production by <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863
Name	Ms. Chiraporn Praipattarakul Mr. Nattawut Hoesuwon
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Assoc.Prof. Sukjai Choojun

ABSTRACT

A study about suitable trace elements for lactic acid, producing by *Lactobacillus casei* ATCC 10863 from two trace element that are Magnesium and Manganese. Study on Magnesium at the concentration of 0.025, 0.05, 0.1 and 0.15 mg/l. And study on Manganese at the concentration of 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 and 0.05 mg/l. It was fermented in stationary flask at temperature 37 °C. This experiment found that Magnesium at the concentration of 0.1 mg/l can produce lactic acid in the maximum quantity is 25.83 g/l. Yield of lactic acid is 0.973 g/g substrate and the productivity of lactic acid is 0.358 g/l/hr, at the 72 hours of fermentation respectively. And Manganese at the concentration of 0.03 mg/l can produce lactic acid in the maximum quantity is 25 g/l. Yield of lactic acid is 0.969 g/g substrate and the productivity of lactic acid is 0.347 g/l/hr, at the 72 hours of fermentation. Compare the result of lactic acid production between fermenter tank 2 l and flask 2 l found that fermenter tank 2 l had more proficiency than flask 2 l. Fermenter tank 2 l produced lactic acid 15.27 g/l, productivity rate is 0.159 g/l/hr and yield is 0.719 g/g substrate at the 96 hours of fermentation.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถสำเร็จได้ทันนั้น เนื่องจากการสนับสนุนหลายด้าน ทั้งความช่วยเหลือ ความร่วมมือ ตลอดจนคำปรึกษา และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำโครงการวิจัยของผู้จัดทำ คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.สุโขใจ ชูจันทร์ ที่ให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางในการปฏิบัติ ข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงการนี้ ตลอดจนการตรวจตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นซึ่งทำให้โครงการชิ้นนี้ สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณ รศ.ดร.พรหมิ ฐิตาภิชาติ ประธานกรรมการ และอาจารย์ ศรีสุภาพ พูนตากเลขา กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษเล่มนี้ให้ สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติๆ ที่คอยให้กำลังใจ และเงินทุนในการทำ โครงการพิเศษเสมอมา ขอขอบพระคุณพี่ๆ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อใช้ในโครงการพิเศษ รวมถึงที่ปริญาโท เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงการพิเศษชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้จัดทำใคร่ขอโอกาสนี้ขอบพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนามมา และไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย หากโครงการพิเศษนี้มีสิ่งใดที่ขาดตกบกพร่อง คณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วน ความดีที่ปรากฏในโครงการพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นความดีของผู้มีส่วนช่วยเหลือในการให้ทำ โครงการพิเศษนี้สำเร็จได้ทันนี้

นางสาว จิราภรณ์ ไพรภัทรกุล

นาย ณัฐวุฒิ ให้อุวรรณ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก	3
2.2 ความสำคัญของกรดแลกติก	5
2.3 กระบวนการผลิตกรดแลกติก.....	7
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตกรดแลกติก	9
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก	14
2.6 หลักการของเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	18
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	30
3.1 อุปกรณ์.....	30
3.2 สารเคมี.....	31
3.3 ขั้นตอนในการดำเนินงาน	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	35
4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863.....	35
4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863	40
4.3 การเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ในระดับ ฟอสฟอรัสขนาด 2 ลิตร ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO ₃) เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต.....	47
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	57
เอกสารอ้างอิง.....	59
ภาคผนวก.....	62
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	62
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์.....	64
ภาคผนวก ค การใช้เครื่อง HPLC	66
ภาคผนวก ง ข้อมูลผลการทดลอง.....	74

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก.....	4
4.1 แสดงผลการทดลอง พิเศษของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลิต ของกระบวนการหมัก เมื่อทำการศึกษาผลของแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.15 กรัมต่อลิตร.....	43
4.2 แสดงผลการทดลอง พิเศษของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลิต ของกระบวนการหมัก เมื่อทำการศึกษาผลของแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 กรัมต่อลิตร.....	46
4.3 แสดงผลการทดลอง พิเศษของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลิต เมื่อเปรียบเทียบ กระบวนการหมักแบบ ฟลักซ์ 2 ลิตร กับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	56

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดแลกติก.....	4
2.2 โครงสร้างของ L(+) Lactic acid และ D(-) Lactic acid.....	5
2.3 แสดงลักษณะทางกายภาพของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i>	11
2.4 แสดงลักษณะ โคลินิจของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ที่เกิดขึ้นบนอาหาร MRS Agar.....	11
2.5 วิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของกลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli.....	12
2.6 วิธีฟอสโฟกลูโคเนด.....	13
2.7 วิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของกลุ่ม heterofermentative lactobacilli.....	14
2.8 เครื่อง HPLC (High-performance liquid chromatography).....	19
2.9 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC.....	19
2.10 แสดงลักษณะภายนอกของคอลัมน์ HPLC.....	22
2.11 แสดงกลไกการทำงานของ Injector for HPLC.....	24
2.12 กลไกการทำงานของ Reciprocating piston pumps.....	25
2.13 แสดง Ultra - Violet (UV) detector.....	26
4.1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการหมัก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสถานะนิ่ง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร.....	35
4.2 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการหมัก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสถานะนิ่ง โดยวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	36
4.3 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อทำการศึกษาผลของแมกนีเซียมที่ความ เข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.15 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง.....	37

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

4.4	แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของเมงกานีสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร..	38
4.5	แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของเมงกานีสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง โดยวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	38
4.6	แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป เมื่อทำการศึกษาผลของเมงกานีสที่ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง.....	39
4.7	แสดงปริมาณกรดแลกติกเมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียมเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่สภาวะความดัน 100 กิโลพอร์ส (Kgf.) อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ใช้ฟออสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที.....	41
4.8	แสดงปริมาณกรดแลกติก พีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ โดยเกิดจากเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 โดยใช้แหล่งอาหารที่มีแร่ธาตุแมกนีเซียม 0.1 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง....	42
4.9	แสดงปริมาณกรดแลกติกเมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแร่ธาตุเมงกานีสเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่สภาวะความดัน 100 กิโลพอร์ส (Kgf.) อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ใช้ฟออสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที.....	44
4.10	แสดงปริมาณกรดแลกติก พีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ โดยเกิดจากเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 โดยใช้แหล่งอาหารที่มีแร่ธาตุเมงกานีส 0.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง.....	45
4.11	ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรของ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ระดับพลาสติกขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต.....	48

สารบัญรูป (ต่อ)

4.12	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ระดับพลาสติกขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต.....	49
4.13	ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในพลาสติกขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	50
4.14	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ใน พลาสติกขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863.....	51
4.15	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือในการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ในอาหาร เลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในพลาสติกขนาด 2 ลิตรที่เติม และ ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	52
4.16	แสดงปริมาณกรดแลกติก พีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ซึ่งเกิดจากเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 โดยทำการบ่มในพลาสติกขนาด 2 ลิตรที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสถานะนิ่ง.....	53
4.17	แสดงปริมาณกรดแลกติก พีเอช และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ซึ่งเกิดจากเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 โดยทำการบ่มในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่มีการเติม แคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสถานะนิ่ง.....	54
4.18	แสดงปริมาณกรดแลกติก พีเอช และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ซึ่งเกิดจากเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 โดยทำการบ่มในถังหมักที่มีใบพัดกวนที่ความเร็ว รอบ 100 รอบต่อนาที และมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน สถานะนิ่ง.....	55

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการ

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์นิยมนำมาใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารที่มีความจำเป็นต่อวงการอุตสาหกรรมอาหารอย่างมากเพราะ กรดแลกติกที่เติมลงไปนั้นจะเป็นตัวช่วยเพิ่มกลิ่น และรสชาติของอาหาร ช่วยควบคุมความเป็นกรดค่า pH อีโคอาซูการเก็บอาหารช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และการงอกของสปอร์ ใช้เสริมประสิทธิภาพของสารป้องกันการหืนและช่วยปรับปรุงลักษณะเนื้อของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆเป็นต้น(สิวาพร, 2526) นอกจากนี้ยังนิยมนำใช้ในวงการเกษตรกรรม, อุตสาหกรรมพลาสติกในรูปพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics) (Fitzpatrick, 2003)

กรดแลกติกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตกรดแลกติก โดยใช้วิธีทางเคมีเป็นวิธีที่ใช้ค่าใช้จ่ายสูง และมีความยุ่งยากในช่วงการทำให้บริสุทธิ์ ส่วนกระบวนการทางชีวภาพสามารถผลิตกรดแลกติกโดยใช้ไฮโมแลกติกแอซิดแบคทีเรียเนื่องจากการผลิตกรดแลกติกสามารถใช้สารตั้งต้นร่วมกับ ไฮโมแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้หลายชนิด จึงได้มีการศึกษาหาวิธีที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณมาก และเสียค่าใช้จ่ายในการลงทุนด้านนอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะ และองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม (Senthuran และคณะ, 1999)

ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาความเข้มข้น และปริมาณของแมกนีเซียม และแมงกานีสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยใช้อาหารสังเคราะห์ในการผลิต ซึ่งเป็นแนวทางอีกแนวทางหนึ่งที่จะเป็นการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น โดยกระบวนการทางชีวภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

1.2.1.1 ศึกษาสภาวะความเข้มข้น และปริมาณของแมกนีเซียม

1.2.1.2 ศึกษาสภาวะความเข้มข้น และปริมาณของแมงกานีส

1.2.2 ศึกษาการเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC

10863 ในระดับพลาสติกเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เพื่อทดลองหาสภาวะความเข้มข้น และปริมาณของแมกนีเซียม และแมงกานีสที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตกรดแลกติก และการศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาस्कเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร และวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของเซลล์ กรดแลกติก น้ำตาลกลูโคสก่อน และหลังทำการหมัก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการทางชีวภาพจาก เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ได้

1.4.2 สามารถทราบถึงสภาวะความเข้มข้นของแมกนีเซียม และแมงกานีสที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

1.4.3 เป็นแนวทางในการศึกษาการผลิตกรดแลกติก เพื่อประยุกต์ไปสู่การผลิตทางด้านอุตสาหกรรม

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

กรดแลกติกเป็นอินทรีย์กรดที่พบมากในธรรมชาติ และมีการใช้ในอาหาร จะต่างกับกรดอื่นที่มีลักษณะหนืด และเป็นของเหลวที่ไม่มีกลิ่น สำหรับ food-grade D, L-lactic acid ที่ขายทั่วไปจะเป็นสารละลายที่ไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะตัวและมีความเข้มข้น ร้อยละ 50 และร้อยละ 80

กรดแลกติกละลายในน้ำได้ดีใช้มากในอุตสาหกรรมการทำไวน์ เบียร์ น้ำผลไม้ต่างๆ ทั้งชนิดที่อัดคาร์บอนไดออกไซด์ และไม่อัดคาร์บอนไดออกไซด์ แยม เยลลี่ น้ำสลัดต่างๆ ใช้ละลาย pepper oleoresin นอกจากนี้ยังใช้ในพวกผักดอง pickles และ relishes ใช้ช่วยในการปรับความเป็นกรดต่าง และเพิ่มกลิ่นรสในอุตสาหกรรมการทำเนยแข็ง และdried food cascin ใช้ปรับปรุงคุณสมบัติของ whipping ของไข่ขาว lactylated mono และ diglycerides ของ fatty acid และ stearoyl-2-lactylate ใช้เป็น emulsifier ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ส่วน calcium lactate ใช้ช่วยเกี่ยว firmness ของ apple slices ในระหว่างการแปรรูป ช่วยป้องกันการเปลี่ยนสีของผัก ผลไม้ และเป็นตัวช่วยให้เกิดเจลสำหรับ demethylate pectin

กรดแลกติกเตรียมได้จากการหมัก highly refined sucrose แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยเปลี่ยนให้เป็นผลิตภัณฑ์ของ calcium lactate จากนั้น decompose โดย กรดซัลฟิวริก เพื่อให้ได้กรดบริสุทธิ์ สำหรับวิธีอื่นๆ นั้นอาจจะโดยหมักแป้งมันฝรั่ง กากน้ำตาลหรือข้าวโพด โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* หรือ *Lactobacillus bulgaricus* จากนั้นใช้วิธีทำให้บริสุทธิ์แบบเดียวกันหรือจะใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายได้หรืออาจเตรียม กรดแลกติก โดยการ hydrolyze lactonitrile

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ช่วยเพิ่มรสชาติ และช่วยป้องกันการเสื่อมในอาหารหมักดอง และในผลิตภัณฑ์นม โดยทั่วไปสามารถพบกรดแลกติกในร่างกายของคน สัตว์ปีก และจุลินทรีย์ได้ตามธรรมชาติ กรดแลกติกถูกตรวจพบเป็นครั้งแรกในนมเปรี้ยว โดยนักเคมีชาวสวีเดน เมื่อปี ค.ศ 1780 จึงทำให้ทราบว่ากรดแลกติกเป็นผลที่เกิดขึ้นจากการหมักจุลินทรีย์ จากการสำรวจการผลิตกรดแลกติกทั่วโลกพบว่ามีการผลิตอยู่ประมาณ 50,000 ตันต่อปี โดยสองในสามส่วนที่ผลิตได้ ได้มาจากกระบวนการหมัก ส่วนที่เหลือผลิตได้จากกระบวนการทางเคมี กรดแลกติกที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 85 ใช้กันอยู่ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยกรดแลกติกทำหน้าที่เป็นตัวปรับสภาพความเป็นกรดในอาหารเพื่อให้เกิดรสชาติของความเปรี้ยวที่พึงประสงค์ของอาหาร และเครื่องดื่ม

ตลอดจนการใช้ในอาหารแปรรูป และผลิตภัณฑ์ขนม กรดแลกติกยังสามารถใช้เป็นสารกันบูดเพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์อาหารได้

นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้กรดแลกติกในเวชภัณฑ์ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นส่วนผสมของแล็กเกอร์ และสาร โพลีเมอร์ได้อีกด้วย กรดแลกติกบริสุทธิ์สามารถเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ที่เรียกว่า พอลิแลกเตต เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี

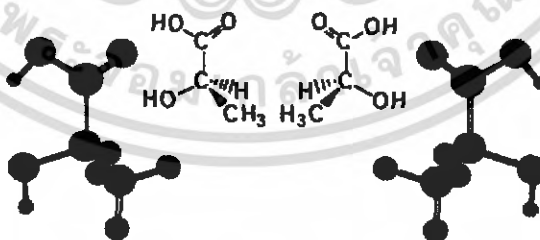
คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของกรดแลกติก

คุณสมบัติทางกายภาพ

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

น้ำหนักโมเลกุล	90.08
จุดหลอมเหลว	16.8 °C
จุดเดือด	82 °C ที่ความดัน 0.5 mm.Hg 122 °C ที่ความดัน 14 mm.Hg
ค่าคงที่ของการแตกตัว (Ka ที่อุณหภูมิ 25C)	1.37×10^{-4}
ค่าความร้อนของการเผาไหม้	1361 KJ/mole
ค่าความร้อนจำเพาะ	190 J/mole/C

ที่มา : Niju และคณะ 2004



รูปที่ 2.1 สูตร โครงสร้าง โมเลกุลของกรดแลกติก

ที่มา : www.chemistry.bd.psu.edu

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติทางเคมี

กรดแลกติกมีชื่อทางเคมีว่า 2- hydroxypropanoic acid หรือ 2- hydroxypropionic acid สูตรโมเลกุล $C_3H_5O_3$ กรดแลกติกมี 2 ไอโซเมอร์ ดังรูป



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ L(+)-Lactic acid และ D(-)-Lactic acid

ที่มา Nijju และคณะ 2004

การเปลี่ยนรูปของ L(+)-Lactic acid และ D(-)-Lactic acid ซึ่งเกิดจากการหมุนของเอทิลีนออกไซด์บริดจ์ (ethylene oxide bridge) ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่หนึ่ง และอะตอมที่สอง โดยเกิด tautomeric shift ของไฮดรอกซิลกรุป (hydroxyl group) บนคาร์บอนอะตอมที่สองไปเป็นคาร์บอนิลกรุป (carbonyl group) ของคาร์บอกซิล (carboxyl) กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสี กรดแลกติกสามารถละลายน้ำ เอทานอล อะซีโตน อีเทอร์ และไม่สามารถละลายในคลอโรฟอร์มบีโตรีเอียมอีเทอร์ และคาร์บอนซัลไฟด์ กรดแลกติกที่เกิดเป็นไซคลิกพอลิเมอร์ (cyclic polymers) เช่น lactide (3,6-dimethylp-dioxane-2,5-dione) ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติก

กรดแลกติกที่สังเคราะห์ได้จะมีปริมาณความเข้มข้นต่ำ โดยกรดแลกติกความเข้มข้นสูงเป็นอันตรายต่อร่างกายทั้งภายนอก และภายใน เมื่อกรดสัมผัสกับผิวหนังจะเหมือนถูกไฟลวก เมื่อกรดถูกดวงตาสามารถทำให้ตาบอดได้ ในกรณีที่กรดถูกดวงตาหรือผิวหนังควรล้างออกด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง

2.2 ความสำคัญของกรดแลกติก

การใช้ประโยชน์จากกรดแลกติก

1. ทางด้านเครื่องสำอาง

- Moisturizers
- Skin-lightening agents
- Skin-rejuvenating agents

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- pH regulators
- anti-acne agents
- humectant
- anti-tartar agent

2. ทางด้านอุตสาหกรรมเคมี

- pH regulators
- Neutralizers
- Chiral intermediates
- Green solvents
- Cleaning agents
- Slow acid release agents
- Metal complexing agents

3. ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร

- Acidulants
- Preservatives
- Flavours
- pH regulators
- Improving microbial quality
- Mineral fortification

4. เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารต่างๆ

- Propylene oxide
- Acetaldehyde
- Acrylic acid
- Propanoic acid
- 2,3-pentanedione
- Ethyl lactate
- Dilactide
- Poly (lactic acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



lactic acid methanol methyl lactate



methyl lactate lactic acid methanol

2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกมี 2 ชนิด คือ ไฮโมแลกติกแบคทีเรีย และเฮเทอโรแลกติกแบคทีเรีย ซึ่งขั้นตอนในการผลิตแลกติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงดังสมการที่ 5 และ 6



Glucose lactic acid

สมการที่ 5 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลกติกของไฮโมแลกติกแบคทีเรีย



Glucose lactic acid ethanol carbon dioxide

สมการที่ 6 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลกติกของเฮเทอโรแลกติกแบคทีเรีย

นอกจากนี้กรดแลกติกยังสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดอื่น ฟังไจ และยีสต์ซึ่งสามารถหมักได้แบบกะ กึ่งกะและแบบต่อเนื่อง ปัจจัยที่สำคัญในการผลิตคือ แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ ทีเอช อุณหภูมิ อากาศ (Anders และ Mikael, 2002)

Roukas และKotzckidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus lactis* พบว่าการหมักแบบกะโดยเลี้ยงเซลล์แบบอิสระ *Lactobacillus casei* ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 30 กรัมต่อลิตร *Lactobacillus lactis* ให้ปริมาณกรด 25 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงแบบเซลล์ผสมปริมาณกรดแลกติกจะสูงถึง 45 กรัมต่อลิตร

Paul และ Fitzpatrick (2002) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และมีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งไนโตรเจนสังเคราะห์ที่มีราคาแพง โดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด และ สารสกัดจากมอลต์ลงไป แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ได้จากโรงงานผลิตมอลต์เปรียบเทียบกับยีสต์สกัด โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้ให้ผลผลิตเทียบเท่ากับยีสต์สกัดแต่มีข้อเสียคือ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิต ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะไม่มีความบริสุทธิ์ และต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการที่ทำให้ผลผลิตมีความบริสุทธิ์

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กากโคส ฟรุคโตส มอลโตส กาแลกโตส กลีเซอรอล ไซโตส เวย์ และแป้ง โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงเมื่อใช้กากโคส ฟรุคโตส และมอลโตสเป็นสารตั้งต้น

Bulut และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ได้แก่ ซูโครส กากโคส โมลาส ฟักถั่ว และรำสาลี โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงขึ้นเมื่อใช้กากโคสเป็นสารตั้งต้น

Wee และคณะ (2004) ได้นำโมลาสซึ่งมีซูโครสเป็นองค์ประกอบมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาเป็นสารตั้งต้นนำการผลิตกรดแลกติก *Enterococcus faecalis* พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 95.7 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 94.9

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูงประมาณ 0.85-0.92 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงเท่าๆ กัน

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

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตกรดแลกติก

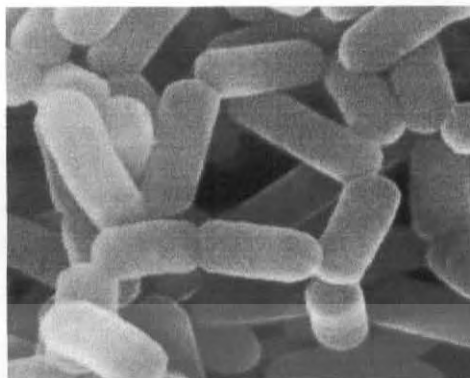
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก เรียกว่า แลกติกแอซิกแบคทีเรีย ความหมายของแลกติกแอซิกแบคทีเรียหมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติก และมีความสามารถในการหมักนมให้เกิดตะกอนได้ นอกจากนี้ยังรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วยต่อมาได้พบว่าแบคทีเรียแบคทีเรียแลกติกมีเพียงแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น จึงได้มีการแยกกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มออกจากนั้นได้ให้ความหมายของแบคทีเรียแลกติกว่า ต้องเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะสำคัญ คือ ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างสปอร์มีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดแลกติก มีรูปร่างเป็นทรงกลม และแท่ง

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งยาว บางครั้งพบเป็นแท่งโค้ง ถ้าเป็นแท่งสั้นมักเป็น coryneform coccobacilli บางทีต่อกันเป็นสายโซ่บางครั้งเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สามารถย้อม

คิดตีแกรมบวกเป็นพวกเฟอร์เมนเททีฟแบคทีเรีย ที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วผลตกกรดแลกติก แต่จะมีผลพลอยได้จากการหมัก คือ อะซิเตด เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ ฟอร์เมดหรือ ซัคซินเนต แบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่สภาพที่มีอากาศเล็กน้อย ไม่มีการวิวัฒนาการในเครดไม่สลายเจลาติน และเคซีน ไม่สร้างอินโดน และไฮโดรเจนซัลไฟด์ รวมทั้งไม่สร้างเอนไซม์อะคาเลส แต่จะมีบางสายพันธุ์ที่สามารถสลายเปอร้ออกไซด์ ได้ด้วยเอนไซม์ซูโคอะคาเลส และปฏิกิริยาต่อเบนซิลีน นั้นจะให้ผลลบ บางเชื้อสามารถสร้างรงควัตถุสีเหลือง ส้ม สนิมเหล็ก หรือสีแดงอิฐ เป็นพวกที่ต้องการอาหารซับซ้อน ทั้งกรดอะมิโนเปปไทด์ อนุพันธุ์กรดนิวคลีอิก วิตามิน เกลือแร่ กรดไขมันหรือ เอสเทอร์ของกรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีความจำเพาะต่อความต้องการอาหารที่แตกต่างกัน สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 2-53 องศาเซลเซียส แต่การเจริญเติบโตได้ดี และเหมาะสมที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 5.5- 6.5 แต่สามารถเจริญได้ดีที่พีเอชประมาณ 5.0 หรือต่ำกว่านี้ได้อัตราการเจริญจะลดลงที่สภาวะเป็นกลางหรือด่าง

Lactobacillus sp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบริเวณช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ เพศหญิง เป็น facultative หรือ strictly aerobe หรือ microaerophile การเพาะเลี้ยงเชื้อมักทำในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในบริเวณที่มีแบคทีเรียชนิดนี้เจริญอยู่ ปรับค่าความมเป็นกรดด่าง โดยผลิตกรดแลกติกออกมา และยังพบว่าเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อ ในมนุษย์ *Lactobacillus* sp. จัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ

1. กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลกติก โดยวิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ดังรูปที่ 2.5 จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ Fructose-1,6-bisphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase ดังนั้นจึงสามารถหมักน้ำตาลเพนโทส และกลูโคเนดไม่ได้
2. กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลกติกโดยวิธี (EMP) จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase ดังนั้นจึงสามารถหมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโตส
3. กลุ่ม Obligately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโตส ผ่านทางวิถี ฟอสโฟกลูโคเนดเป็นแลคเตด เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Lactobacillus casei*

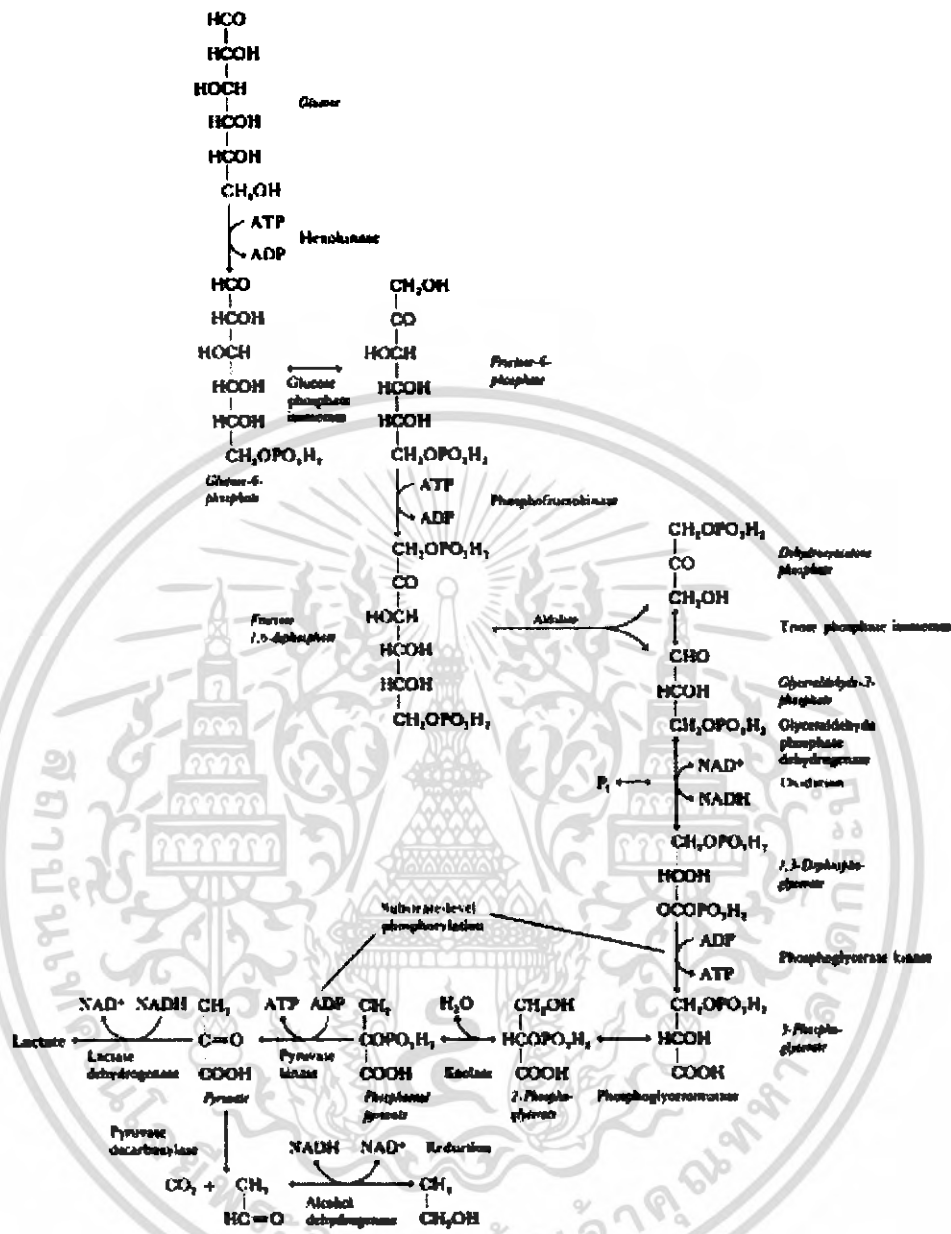
ที่มา : www.freddynietzsche.com



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะโคโคณีของเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่เกิดขึ้นบนอาหาร MRS Agar

ที่มา : www.service.merck.de

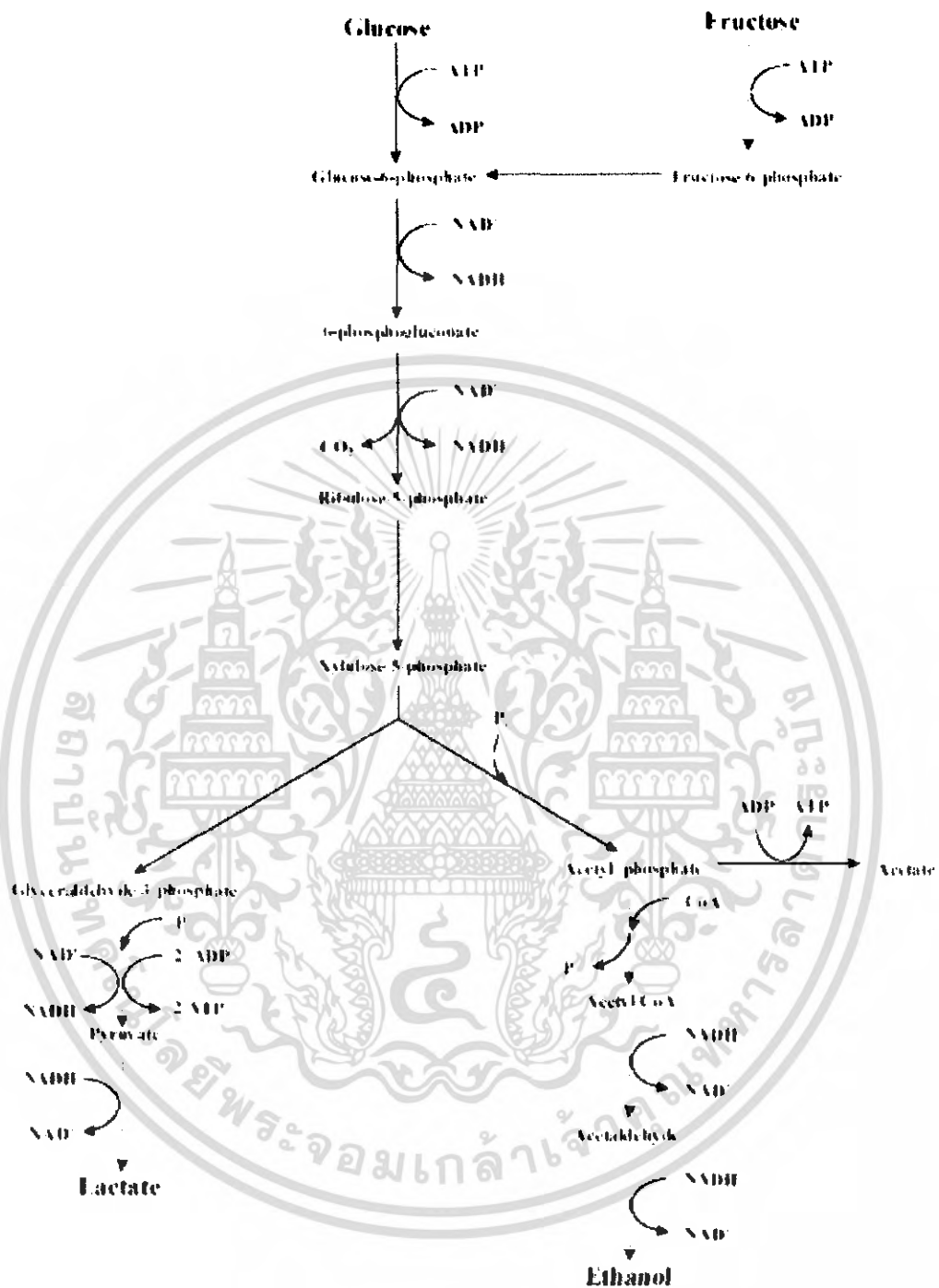
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 วิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลคติกของกลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli

ที่มา : www.brighton73.freeseve.co.uk

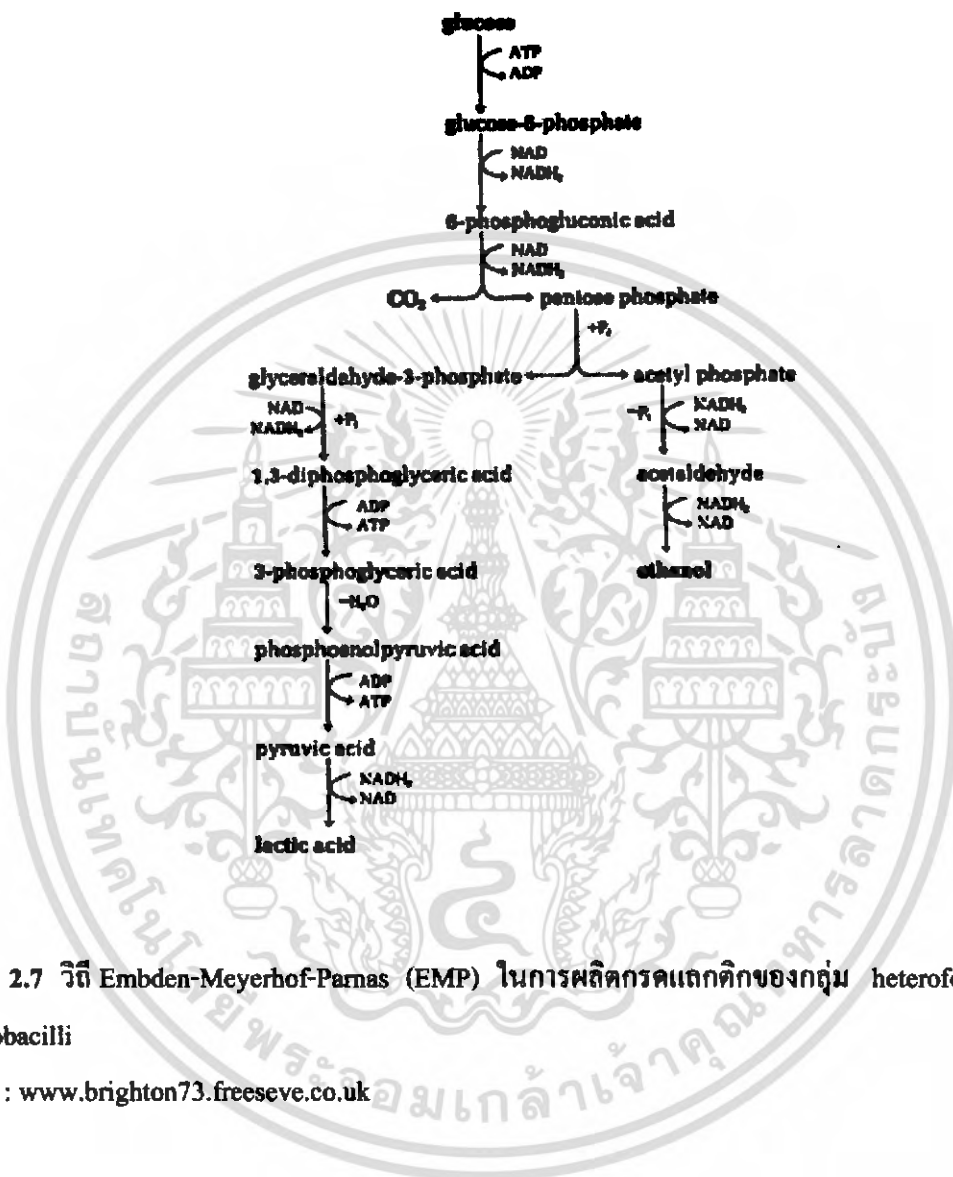
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 วิธีฟอสโฟกลูโคเนต

ที่มา : www.brighton73.freeseve.co.uk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 วิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของกลุ่ม heterofermentative lactobacilli

ที่มา : www.brighton73.freeseve.co.uk

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

แหล่งคาร์บอน

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าเมื่อนำเวย์มาเติมกลูโคสลงไป 20 กรัมต่อลิตรร่วมกับยีสต์สกัดประมาณ 20 กรัมต่อลิตร กรดแลกติกที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yun และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตกรดแลกติก จากเชื้อ *Enterococcus faecalis* RYK 1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกาแลกโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์และแป้ง พบว่าในน้ำน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลมอลโตส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 18.18, 17.95 และ 16.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลกาแลกโตส น้ำตาลแลกโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์ และแป้งจะให้ปริมาณกรดแลกติก 2.7, 1.26, 2.24, 1.68, 1.83 และ 1.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำ

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ โดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* RYK 1 ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อเซลล์เจริญในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลมอลโตส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณการผลิตจะอยู่ระหว่าง 5.2-6.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กรดแลกติกที่ได้คิดเป็น 0.96 กรัมต่อกรัมแหล่งคาร์บอน การผลิตกรดแลกติกจากกลูโคส ฟรุกโตส และมอลโตส โดย *Enterococcus faecalis* RYK 1 สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง

Bulet และคณะ (2004) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส โมลาส ฟักถั่ว และรำข้าวสาลี พบว่าน้ำน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียวให้กรดแลกติกในปริมาณที่สูง เช่นเดียวกับที่ใช้ น้ำตาลจากฟักถั่วให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 58 กรัมต่อลิตร

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากโมลาสในการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าที่ความเป็นกรดค่า 7.0 ให้ปริมาณกรดแลกติก 95.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94.9

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยใช้เชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่า ความเข้มข้นของแป้งที่ 20 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดค่าที่ 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดแลกติก 0.85-0.92 กรัมต่อสารตั้งต้น

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด โดยนำมาย่อยกับเอนไซม์ และจึงนำผลิตกรดแลกติก ด้วยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RYK 1 พบว่า เมื่อใช้ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลีเป็นสารตั้งต้นจะให้ปริมาณกรดแลกติกมากกว่า กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่ออาหารประกอบด้วยแป้งสาลีที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 200 กรัมต่อลิตร แป้งข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร ซีสต์สก็ค 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงถึง 5.36 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณเซลล์จะสูงถึง 14.08 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้แป้งสาลีเพียงอย่างเดียว

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กากโกส ฟรุคโตส ซูโครส แลคโตส กาแลกโตส ไฮโลส มอลโตส ที่สามารถให้ปริมาณกรดที่สูง โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่ากากโกสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเศษอาหารเหลือทิ้งจากโรงอาหาร โดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 19.5 กรัมต่อ 200 กรัมสารตั้งต้น

Takana และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกในรูป D-form จากรำข้าวซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้สูงถึง 9.2 กรัมต่อลิตร

Wee และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ปริมาณต่างๆ ได้แก่ 50, 75, 100 และ 125 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ปริมาณน้ำตาล 125 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด

แหล่งไนโตรเจน

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ถั่วเหลือง และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในเวย์ และกลูโคสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดี และเหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกได้แก่ ยีสต์สกัด

Kolozik และคณะ (1999) พบว่าเมื่อเติมยีสต์สกัดลงไปในเวย์จะทำให้ชีวมวล และปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นแต่เมื่อไม่เติมยีสต์สกัดการเจริญของเซลล์ และปริมาณกรดจะน้อย

Fitzpatrick และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของการเติม whey protein hydrolyse (WPH) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนลงไปใน whey permeate สำหรับการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus helveticus* พบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสในเวย์ให้เป็นกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงภายในระยะเวลา 30-40 ชั่วโมง

Nancib และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ยูเรีย corn steep และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เติมลงในน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีคือ ยีสต์สกัด

Altaf และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วเบงกอล ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และ baker's yeast ที่เติมลงในแป้งซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV6 พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้จะสูงถึงร้อยละ 92

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทรีปทิซอช ยูเรีย เปปโตน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัม พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด com steep liquor ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 89 กรัมต่อลิตร

แหล่งแร่ธาตุ

Fitzpatrick และคณะ(2001) ศึกษาอิทธิพลของแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่มีการเติมแมงกานีสในรูป $MnSO_4 \cdot H_2O$ ร่วมกับยีสต์สกัดลงในเวย์ พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดจะสั้นลง และเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตสได้ดี แต่เมื่อไม่มีการเติมแมงกานีสเวลาที่ใช้ในการผลิตจะนานขึ้น และเชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลแลกโตสไปใช้ได้เท่าที่ควร

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทรีปทิซอช ยูเรีย เปปโตน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัม พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงเมื่อมีการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้ง และเศษอาหารที่เหลือทิ้งจากโรงงานอาหาร โดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* 18011 พบว่า เมื่อเติมแมงกานีสลงไปปริมาณกรดแลกติกจะได้สูงกว่าเมื่อไม่เติมแมงกานีส

อุณหภูมิ

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

John และคณะ(2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติก

72.596

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นกรดเป็นด่าง

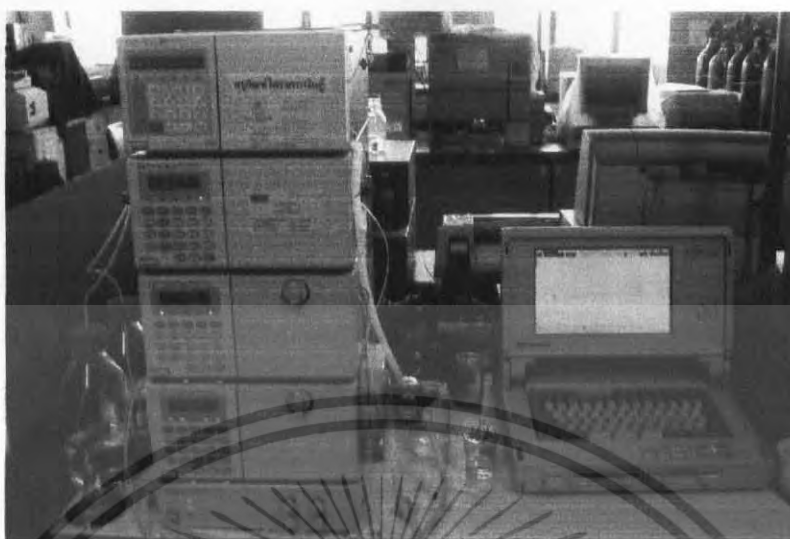
Wenge Fu และ A.P.Mathew (1999) ศึกษาอิทธิพลของพีเอช สารตั้งต้น และปริมาณออกซิเจน ในการผลิตกรดแลกติก จากน้ำตาลแลคโตส โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมของเชื้อในการผลิตกรดแลกติกอยู่ในช่วง 5-6 และการเลี้ยงแบบ anaerobic จะให้ผลผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่าการเลี้ยงแบบ aerobic 2.3 เท่า

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

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

2.6 หลักการของเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

High performance Liquid Chromatography หรือ HPLC เป็นเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์อย่างหนึ่ง ซึ่งจะใช้วิเคราะห์หาสารเคมีที่สนใจจากตัวอย่างที่เก็บมา เพื่อจะได้ทราบถึงส่วนประกอบของสารตัวอย่างที่เราสนใจว่า 1. มีอะไรบ้างอยู่ในนั้น (Qualitative Analysis) และ 2. อะไรที่ว่ามีอยู่ปริมาณเท่าใด (Quantitative Analysis) ในหลักการของ HPLC นั้น ตัวเครื่อง HPLC เองจะทำหน้าที่แยกสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ออกเป็นสารเคมีอิสระเพื่อที่จะได้ทราบถึงชนิดและปริมาณขององค์ประกอบ (แต่ไม่จำเป็นว่าจะต้องแยกองค์ประกอบออกมาได้ทั้งหมด) โดยทั้งนี้จะต้องมีอุปกรณ์ต่อเพิ่มอีกหนึ่งอย่าง เรียกว่า Detector เพื่อที่จะได้ทราบชนิด และปริมาณของสารที่สนใจ

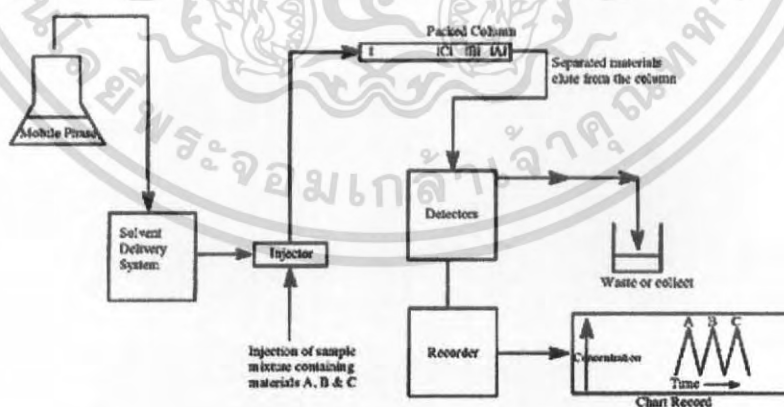


รูปที่ 2.8 เครื่อง HPLC (High-performance liquid chromatography)

ทฤษฎีและความรู้ทั่วไป

เทคนิควิธีโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง (HPLC) เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่นิยมกันอย่าง มาก เพราะว่าง่ายต่อการใช้งาน มีประสิทธิภาพวิธีที่สูง และไม่มีข้อจำกัดใดๆ ในเรื่องของภาวะหรือ ความเสถียรของสารประกอบตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

Block diagram showing the components of an HPLC instrument



รูปที่ 2.9 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติความเป็นมา

ก่อนทศวรรษ 1970 วิธีการ Chromatographic method ได้นำมาใช้ในการทำงานของนักวิทยาศาสตร์น้อยมาก ต่อมาในช่วงทศวรรษ 1970 กระบวนการการแยกสารเคมีมีวิธีการต่าง ๆ มากมาย เช่น open-column chromatography , paper chromatography และ thin-layer chromatography แต่วิธีการเหล่านี้ก็ยังไม่เพียงพอต่อการหาปริมาณ และการแยกสารประกอบที่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันได้ ในช่วงทศวรรษ 1970 นี้ วิธีการ Pressure liquid chromatography ได้นำมาใช้เพื่อลดช่วงเวลาการไหลผ่าน ดังนั้นการลดเวลาในการทำสารประกอบให้บริสุทธิ์ ถูกแยกโดย Column chromatography แต่อัตราการไหลไม่คงที่ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบกันว่าหากอัตราการไหลหรือความดันคงที่จะทำให้การแยกสารประกอบได้ผลที่ดีขึ้นหรือไม่ High pressure liquid chromatography ถูกพัฒนาขึ้นมาในกลางทศวรรษที่ 1970 และถูกพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็วพร้อมๆ กันกับการพัฒนาอุปกรณ์ที่นำมาใช้ทำเป็น Column และมีการเชื่อมต่อกับตัวตรวจวัด (Detector) ในปลายทศวรรษที่ 1970 วิธีการใหม่ๆ เช่น Reverse phase liquid chromatography มีความสามารถที่จะทำการแยกสารประกอบที่มีความคล้ายคลึงกันมากๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในช่วงทศวรรษที่ 1980 เทคนิควิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวความดันสูง ได้นำมาใช้โดยทั่วไปเพื่อการแยกสารประกอบเคมี ซึ่งวิธีการนี้ทำให้การแยก การจำแนก การทำให้บริสุทธิ์ และการหาปริมาณของสารประกอบได้ดีกว่าวิธีอื่นที่กล่าวมา มีระบบคอมพิวเตอร์และระบบกลไกอัตโนมัติทำให้เพิ่มความสะดวกต่อการใช้ เทคนิควิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวความดันสูงมากขึ้น ชนิดของ Column ก็ดีกว่า Column ที่ได้ผลิตขึ้นได้แก่ Micro-Column, Affinity Column

ทศวรรษที่ผ่านมา มีการดำเนินงานด้านการพัฒนา Micro-Column และ Column ชนิดพิเศษอื่นๆ กันอย่างกว้างขวาง โดยทั่วไปแล้ว HPLC column สามารถวัดความยาวได้เป็นหลักร้อยในหน่วยมิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางกลาง 3-5 มิลลิเมตร Micro-Column หรือ Capillary Column โดยทั่วไป มีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 3 -200 ไมโครเมตร (1/1000 มิลลิเมตร) ส่วน Fast HPLC จะใช้ Column ที่สั้นกว่าซึ่งมีความยาวของ Column ประมาณ 30 มิลลิเมตร และภายใน Column จะบรรจุด้วยเศษชิ้นส่วน (particles) ที่เล็กกว่า ในปัจจุบันนี้มีชนิดของ Column ให้เลือกได้มากมายเพื่อความเหมาะสมในการแยกสารประกอบเคมี และ Detector ก็มีหลายชนิดเช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่าเทคนิควิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวความดันสูงเป็นวิธีหนึ่งซึ่งช่วยในการตัดสินใจในงานวิจัยทางด้าน Biotechnological, Biomedical และ Biochemical ทางด้าน Pharmaceutical industry ก็มีการใช้ประมาณ 50 % ของผู้ใช้ HPLC ทั้งหมด แต่ปัจจุบันนี้ HPLC ได้ถูกนำมาใช้ทางด้าน Energy, Cosmetic, Food และ Environmental industries ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทฤษฎีการปฏิบัติ

1 Stationary phase

Stationary phase ใน HPLC หมายถึง ของแข็งที่บรรจุอยู่ใน Column ซึ่ง Mobile phase จะไหลผ่านอย่างต่อเนื่อง สารละลายตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าไปยัง Mobile phase ที่ไหลผ่าน injector port สารละลายตัวอย่างจะไหลไปพร้อม Mobile phase องค์ประกอบสารละลายที่แพร่ไป จะเกิดปฏิกิริยากับ Stationary phase แบบ non-covalent ปฏิกิริยาของ Stationary phase และตัวอย่าง + Mobile phase จะทำให้เกิดการแพร่หรือการแยกตัวขององค์ประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ Stationary phase มากกว่า ทำปฏิกิริยากับ Mobile phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกจาก Column ได้ช้ากว่า และมี retention time นานกว่า ตรงกันข้ามกับตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ Mobile phase มากกว่า Stationary phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกจาก Column ได้เร็วกว่า และมี retention time น้อยกว่า Stationary phase มีหลายชนิด ได้แก่

1.1 Liquid - Solid ใช้หลักการของคุณสมบัติการมีขั้ว สารประกอบ ที่มี Functional group เป็นแบบพันธะไฮโดรเจน จะยึดกันอย่างเหนียวแน่นกับ Stationary phase มากกว่า สารประกอบที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นสารประกอบที่มีขั้วน้อยกว่าจะหลุดออกจาก Column ได้เร็วกว่าสารประกอบที่มีขั้วสูงกว่า

1.2 Liquid - Liquid ใช้หลักการเดียวกันกับ Liquid - Solid แต่จะดีกว่าตรง ที่ Stationary phase ชนิดนี้ เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีความเป็นขั้วปานกลาง ซึ่งละลายได้ในตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วอ่อนๆ การแยกเกิดขึ้นได้โดยการเข้าคู่กันของความขั้วของตัวอย่าง และ Stationary phase และใช้ Mobile phase mark ความขั้วที่แตกต่างกัน

1.3 Size - Exclusion ใช้หลักการวิเคราะห์หาขนาด โมเลกุล Stationary phase ประกอบด้วย porous beads สารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่าจะหลุดออกจาก Column ก่อน ส่วนสารตัวอย่างที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าจะเข้าไปใน Bead และจะหลุดออกจาก Column ที่หลัง Column อาจจะใช้หรือไม่ใช้ Silica based ก็ได้ แต่ Size- Exclusion ที่เป็น anionic และ hydrophobic อื่นๆ จะไปเพิ่มความไม่สมบูรณ์แก่ Size - Exclusion ได้

1.4 Normal phase ใช้หลักการของ hydrophilicity และ Lipophilicity โดย ให้มีสมบัติความเป็นขั้ว และ Mobile phase ไม่มีสมบัติความเป็นขั้ว สารประกอบที่เป็น hydrophobic จะหลุดออกมาเร็วกว่าสารประกอบที่เป็น hydrophilicity

1.5 Reverse phase ใช้หลักการของ hydrophilicity และ Lipophilicity Stationary phase ประกอบด้วย Silica กับ n-alkyl ที่ต่อกันเป็นโซ่ตรงด้วยพันธะ Covalent เช่น C - 8 Octyl และ C - 18 Octadecyl ทำหน้าที่เป็นลิแกนด์ใน matrix แล้วลิแกนด์ที่อยู่บน matrix มีสมบัติเป็น hydrophobic จึงทำ

ให้ Column มีสมบัติเป็นแบบ hydrophobic ดังนั้นสารประกอบที่เป็น hydrophilic จะหลุดออกมาเร็วกว่า สารประกอบที่เป็นแบบ hydrophobic

1.6 Ion-Exchange ใช้หลักการของการเลือกแลกเปลี่ยนไอออนกัน ระหว่างตัวอย่างกับ ตัวแลกเปลี่ยนไอออนของ Stationary phase Ion-Exchange ทำมาจากการบรรจุ Column ด้วย charge-bearing functional group ร่วมกับ Polymer matrix Functional group ถูกยึดไว้อย่างถาวรกับ Column แต่ ละตัวจะมีตัวแลกเปลี่ยน ไอออนรวมอยู่ด้วย ตัวอย่างจะถูกจับไว้โดยไอออนของตัวแลกเปลี่ยนไอออน ของ Stationary phase ตัวอย่างจะหลุดออกมาจาก Column ได้โดยการเปลี่ยนคุณสมบัติของ Mobile phase ให้สามารถเข้าไปแทนที่ไอออนของตัวอย่างที่ Stationary phase

1.7 Affinity ทำได้โดยการใช้ immobile biochemical ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับสารประกอบ ตัวอย่างที่เราสนใจ การแยกเกิดขึ้นได้โดย Mobile phase และสารตัวอย่าง แพร่ผ่าน Stationary phase สารประกอบตัวอย่างหรือสารประกอบที่เราสนใจที่ถูกเก็บไว้ที่ยังไม่บริสุทธิ์ เมื่อ Mobile phase แพร่ ผ่านมา แล้วสารประกอบจะหลุดจาก Column ออกมาโดยการเปลี่ยนแปลงสภาพของ Mobile phase

รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะภายนอกของคอลัมน์ HPLC

ที่มา : www.il5.ebayimg.com

2 Mobile phase

Mobile phase ใน HPLC หมายถึง ตัวทำละลายที่จะใช้กับ Column หรือ Stationary phase อย่างต่อเนื่อง Mobile เปรียบเสมือนตัวพาสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสารละลายตัวอย่างถูกฉีดเข้าไปยัง Mobile phase ผ่าน ไปยัง injector port สารละลายตัวอย่างจะไหลผ่าน Column ไปพร้อมๆ กันกับ Mobile phase องค์ประกอบของสารละลายที่แพร่ผ่านไปจะทำปฏิกิริยากันแบบ non-covalent กับ Column ปฏิกิริยาทางเคมีของ Mobile phase + ตัวอย่าง กับ Column เป็นการควบคุมการแพร่ และการแยกตัวของ องค์ประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างที่มีปฏิกิริยาที่รุนแรงกับ Mobile phase มากกว่า Stationary phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกมาจาก Column เร็วกว่า และมี retention time สั้นกว่า แต่ถ้าตัวอย่าง

เกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงกับ Stationary phase มากกว่า Mobile phase จะทำให้ตัวอย่างหลุดออกจาก Column ได้ช้ากว่า และมี retention time นานกว่า Mobile phase สามารถเปลี่ยนได้เพื่อควบคุมการเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่าง และ Stationary phase ซึ่ง Mobile phase มีหลายชนิดได้แก่ Isocratic, gradient และ polytypic

2.1 Isocratic elution compound เป็น Mobile phase ซึ่งเมื่อหลุดออกจาก Column แล้ว ยังคงมีองค์ประกอบคงที่ การแยกสารประกอบ อธิบายได้ด้วยสมการต่างๆ ดังนี้ สารประกอบทั้งหมดจะแพร่ผ่าน Column ที่ติดตั้งไว้ อัตราการแพร่ผ่านจะ แคลต่าง มีช้าบ้าง เร็วบ้าง รูปแบบของการหลุดออกมามีทั้งแบบง่าย ๆ และแบบซับซ้อน แต่การแยกสารประกอบบางอย่าง ยังมีปัญหาอยู่ และการหลุดของสารประกอบก็ยังไม่สัมพันธ์กับเรื่องเวลา

2.2 Gradient elution different compound เป็นการนำพาออกมาได้ โดยการเพิ่มความแรงของตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวอย่างที่ติดเข้าไปขณะที่ Mobile phase ยังอ่อน ตัวอย่างจะถูกเปลี่ยนเข้าไปในระบบ ต่อเมื่อได้เพิ่มความแรงของ Mobile phase โดยการเพิ่มตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งก็ทำให้เกิดการหลุดออกมาของสารตัวอย่าง โดยทั่วไปใช้ทำใน Stepwise หรือ linear fashion มีหลายสมการที่ใช้อธิบาย gradient elution

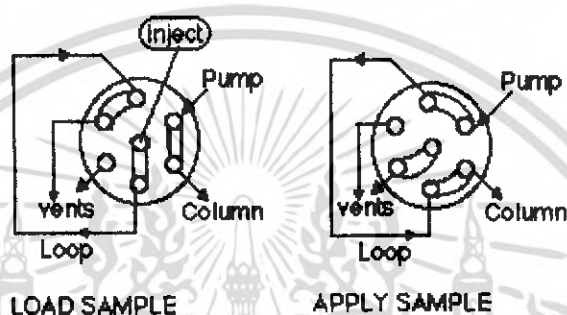
2.3 Polytypic Mobile Phase บางทีหมายถึง mixed-mode chromatography คือ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีโดยใช้ Chromatography หลายๆ ชนิด หรือหลายๆ หน้าที่ แต่สามารถได้ Column อันเดียวกันได้ ซึ่งภายใน Column จะบรรจุด้วย rigid macroporous hydrophobic resin covalent bonded กับ hydrophilic organic layer. SEC, IEC ,hydrophobic หรือ affinity เป็นตัวอย่างหนึ่งที่จะสามารถนำมาใช้ได้

คุณสมบัติที่ดีของเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ใน HPLC ควรมีลักษณะดังนี้

1. มีความบริสุทธิ์สูง
2. ละลายสารตัวอย่างได้ดี
3. มีความหนืดต่ำ
4. ปราศจากฝุ่น ผง และอนุภาคที่จะทำให้ระบบอุดตัน
5. เหมาะสมกับเครื่องวัดสัญญาณ (Detector)
6. ไม่ทำปฏิกิริยากับเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase)
7. ปัจจัยอื่นๆ ที่ควรคำนึงถึง คือ ความเป็นพิษ จุดเดือด การติดไฟ และราคา

3 Injector for HPLC

ตัวอย่างที่ถูกเข้าไปใน HPLC จะผ่านเข้าไปใน injection port โดยทั่วไป injection port ใน HPLC นั้นประกอบด้วย injection valve และ Sample loop ตัวอย่างจะถูกละลายใน Mobile phase ก่อนที่จะถูกฉีดเข้าไปใน Sample loop ผ่านทาง injection valve การหมุนรอบของ valve จะเป็นการปิด-เปิด เพื่อฉีดตัวอย่างเข้าไปยัง Mobile phase ที่ไหลอยู่ปริมาตรของ loop ประมาณ 10 ไมโครลิตรถึงมากกว่า 500 ไมโครลิตร สำหรับ HPLC ที่มีความทันสมัยการฉีดตัวอย่างเข้าไปจะใช้ระบบกลไกอัตโนมัติ



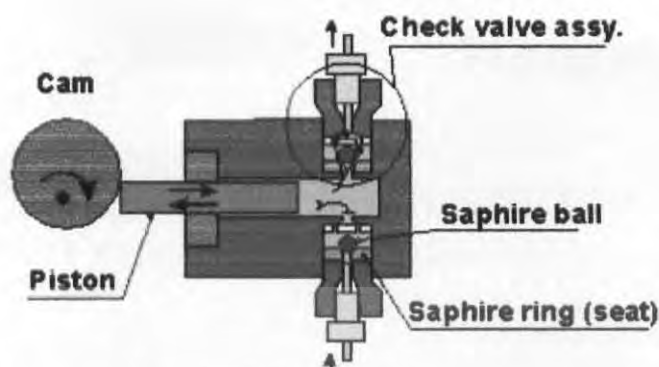
รูปที่ 2.11 แสดงกลไกการทำงานของ Injector for HPLC

ที่มา : www.resonancepub.com/images/section403.gif

4 HPLC pumps

Pump มีหลายชนิดสำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC เช่น

4.1 Reciprocating piston pumps ประกอบด้วย motor เล็กๆ สำหรับดันลูกสูบให้เคลื่อนที่ไปหน้า - หลัง อย่างรวดเร็ว มีห้อง hydraulic ปริมาตร 35-400 ไมโครลิตร จังหวะที่ถูกสูบถูกดึงมาด้านหลัง the separate column valve จะถูกปิด แล้วลูกสูบจะดูดตัวทำละลายจากที่เก็บ Mobile phase ในจังหวะที่ถูกสูบดันไปข้างหน้า pump จะดันสารตัวทำละลายออกสู่ Column จากที่เก็บ ช่วงของอัตราการไหลสามารถเปลี่ยนได้โดยการเปลี่ยนจังหวะปริมาตรของลูกสูบแต่ละรอบ หรือเปลี่ยนจังหวะความถี่ pump ชนิดที่มีสองหรือสามหัว ประกอบด้วยห้องสูบเหมือนกัน ซึ่งทำให้มีมุมต่างกัน 180 หรือ 120 องศา ระบบ pump นี้มีการปั๊มได้อย่างสม่ำเสมอ เพราะว่าเมื่อปั๊มรอบหนึ่งเต็มปั๊มรอบต่อไปจะส่งรอบต่อ



รูปที่ 2.12 กลไกการทำงานของ Reciprocating piston pumps

ที่มา : hplc.chem.shu.edu/.../pmp_recip.html

4.2 Syring Type Pumps มีการใช้กันมากกับ Column ที่มีขนาดเล็ก เพราะว่า pump ชนิดนี้ส่ง Mobile phase ได้จำกัดในปริมาณหนึ่งเท่านั้น pump มีปริมาตรระหว่าง 250 - 500 มิลลิลิตร pump นี้ทำงานได้โดยการหมุนกลับไปกลับมาของ motor สามารถที่จะส่ง Mobile phase สู่ Column ได้คงที่ อัตราการส่งควบคุมได้โดยการเปลี่ยนแปลงความดันไฟฟ้าของ motor

4.3 Constant Pressure Pumps Mobile phase ถูกส่งเข้าไปยัง Column โดยใช้ความดันจากกระบอกแก๊ส

5 Detector

Detector สำหรับ HPLC คือ องค์ประกอบหนึ่งที่ตอบสนองต่อสารประกอบตัวอย่างที่หลุดออกมาและให้ peak ปรากฏบน Chromatograph ในภายหลัง detector จะอยู่ตรงตำแหน่งที่ถัดจาก Stationary phase เพื่อคอยตรวจสอบสารประกอบที่หลุดออกมาจาก Column ความกว้าง และความสูงของ peak โดยทั่วไปสามารถปรับให้มีความหนาแน่นละเอียดได้ และพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบก็สามารถควบคุมได้ detector มีหลายชนิดได้แก่

5.1 Refractive Index (RI) detector ใช้หลักการตรวจวัดการ เลี้ยวเบนหรือการหักเหของแสงของ โมเลกุลของสารตัวอย่าง เป็นคุณสมบัติของแต่ละโมเลกุลหรือของแต่ละสารประกอบ ซึ่งเรียกว่าดัชนีการหักเหของแสง RI detector จะให้กำเนิดแสงส่องทะลุผ่าน Bi-modula flow-cell ผ่านไปยัง photodetector ช่องหนึ่งของ flow-cell จะตรงกับ Mobile phase ที่กำลังผ่าน Column ส่วนอีกช่องหนึ่งจะตรงกับ Mobile phase เท่านั้น การตรวจวัดจะเกิดขึ้นได้เมื่อแสงที่ถูกกำหนดขึ้น โคนี้เข้าหาตัวอย่างกำลัง หลุดออกจาก Column และอ่านค่าความแตกต่างระหว่าง 2 ช่อง

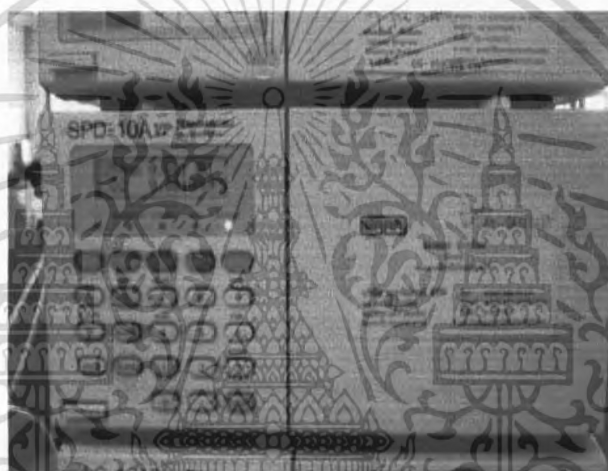
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 Ultra - Violet (UV) detector เป็นการวัดการดูดกลืนแสงของ ตัวอย่าง โดยการใช้ความยาวคลื่นหนึ่งช่วงคลื่น หรือ หลาย ๆ ช่วงคลื่น เช่น

1. Fixe wavelength เป็นการตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่นเพียงคลื่นเดียว โดยทั่วไปนิยมใช้ 254 นาโนเมตร

2. Variable wavelength เป็นการตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่นเดียวต่อการวัดหนึ่งครั้ง แต่สามารถเปลี่ยนยาวคลื่นได้

3. Diode Aray เป็นการตรวจวัด spectrum ของความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน UV detector ตอบสนองได้ดีต่อตัวอย่างที่มีปริมาณ 10^{-8} หรือ 10^{-9} กรัมต่อมิลลิตร



รูปที่ 2.13 แสดง Ultra - Violet (UV) detector

5.3 Fluorescent detector เป็นการตรวจวัดความสามารถของสารประกอบที่จะดูดกลืนแสงและปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นที่เฉพาะออกมา ซึ่งสารประกอบแต่ละตัวจะมี Fluorescent เฉพาะตัว เมื่อสารประกอบที่อยู่ในภาวะถูกกระตุ้นผ่าน Flow - cell กับ photodetector ขณะนั้น monochromator จะตรวจวัดการแพร่กระจายความยาวคลื่น เครื่องตรวจวัดนี้ตอบสนองได้ดีต่อสารตัวอย่างที่มีปริมาณ 10^9 ถึง 10^{11} กรัมต่อมิลลิตร

5.4 Radiochemical detector เป็นการตรวจวัดที่เกี่ยวข้องกับการใช้อุปกรณ์ที่สามารถแผ่รังสีซึ่งมักจะใช้ tritium (^3H) หรือ carbon-14 (^{14}C) ทำการได้โดย ตรวจวัด Fluorescent ร่วมกับ beta-particle ionization และเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิจัยเกี่ยวกับ สารถูกเปลี่ยนแปลงโดยขบวนการภายในร่างกาย เครื่องตรวจวัดมี 2 ชนิดคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Homogeneous มีการเติม scintillation fluid เข้าไปใน Column เพื่อให้เกิด Fluorescent

2. Heterogeneous มี Lithium silicate และ Fluorescent เกิด ขึ้นโดย beta-particle ทำปฏิกิริยากับ detector cell detector ชนิดนี้ตอบสนองได้ดีกับตัวอย่างที่ปริมาณ 10^9 ถึง 10^{10} กรัมต่อมิลลิลิตร

5.5 Electrochemical detector เป็นการตรวจวัดสารประกอบจากการ เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ มักตรวจวัดปริมาณที่เพิ่มหรือหายไปของ electron จากการที่ตัวอย่างแพร่ผ่าน electrode เครื่องวัดชนิดนี้ตอบสนองได้ดีกับตัวอย่างที่มีปริมาณ 10^{-12} ถึง 10^{-13} กรัมต่อมิลลิลิตร

5.6 Mass spectroscopy (MS) detector สารประกอบหรือโมเลกุล ของสารประกอบถูกทำให้เป็นไอออน เมื่อแพร่ผ่าน mass analyzer และ ไอออนที่เกิดขึ้นก็จะถูกตรวจสอบ มีวิธีการมากมาย สำหรับการทำให้เกิดไอออน เช่น

1. Electron Impact (EI) เป็นการทำให้เกิด electron โดยการใช้ไฟฟ้าแรงสูงกับสารตัวอย่างที่ หลุดออกมาจาก Column

2. Fast Atom Bombardment (FAB) เป็นการ ใช้อะตอม Xenon วิ่งด้วยความเร็วสูง เพื่อให้เกิด การแตกตัวของไอออนของตัวอย่างที่หลุดออกมาจาก Column detector ชนิดนี้ตอบสนองได้ดีต่อ ตัวอย่างที่มีปริมาณ 10^3 ถึง 10^{10} กรัมต่อมิลลิลิตร

5.7 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) detector รู้กันอยู่ว่า nuclei กับ odd-numbered mass เช่น ^1H และ ^{13}C มีการ spin ของแกนแบบสุ่ม เมื่อนำไปวางไว้ระหว่างขั้วแม่เหล็กที่แรงมีการ spin ของ แกนเป็นทั้งแบบ parallel และ anti-parallel กับสนามแม่เหล็ก การ spin แบบ parallel ทำให้มันมี พลังงานต่ำ nuclei จึงแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่ดูดกลืนไว้ แล้วทำให้ตัวมันเองอยู่ในสถานะที่มีพลังงานสูง กว่า เนื่องจากเป็น resonance ส่วน H หรือ C จะผลิต spectra แตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งหรือการอยู่ ใกล้ชิดกันของโมเลกุลหรือธาตุที่เป็นองค์ประกอบ เพราะว่า nuclei ทั้งหมดในโมเลกุลถูกล้อมรอบด้วย หมอกอิเล็กตรอนที่เปลี่ยนแปลงสนามแม่เหล็กที่ล้อมรอบ และเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนพลังงาน

5.8 Light-Scattering (LS) detector เมื่อแหล่งกำเนิดปล่อยเป็นลำแสง ออกไปพุ่งเข้าหาอนุภาค ที่อยู่ในสารละลาย แสงบางส่วนจะสะท้อนกลับ บางส่วนถูกดูดกลืน บางส่วนทะลุผ่าน หรือบางส่วนก็ กระจัดกระจายไป การตรวจวัดด้วยวิธีนี้ใช้ 2 ลักษณะ ที่เกิดขึ้น คือ

5.8.1 Nephelometry เป็นการตรวจวัดหาแสงที่กระจัดกระจายไปโดยสารละลาย ซึ่ง สามารถตรวจวัดได้หลายมุม การตรวจวัดวิธีนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการที่ไม่มีแสงปกติ หรือที่กระจัดกระจายของ แสงที่ทำการตรวจสอบนั้นเกิดขึ้นที่ความมืดหรือไม่มีแสงปกติ

5.8.2 Turbidimetry เป็นการตรวจหาปริมาณของแสงที่ลดลงขณะผ่านเข้าไปใน สารละลายที่กำหนด เพราะฉะนั้นจึงเป็นการตรวจหาปริมาณของแสงที่เหลืออยู่

5.9 Near - Infrared detector เป็นการตรวจวิเคราะห์สารประกอบใน spectrum จาก 700 - 1100 นาโนเมตร

6 Degaser

Degaser เป็นอุปกรณ์ที่สำคัญสำหรับทำลายแก๊สที่เกิดขึ้นใน Mobile phase เพราะแก๊สที่เกิดขึ้นมีผลต่อการ Detect และทำให้ Column เสื่อมหาย

การประยุกต์ใช้ HPLC

- 1) Preparative HPLC หมายถึงการใช้ HPLC ในการทำสารประกอบให้บริสุทธิ์ แยกเป็นสารเดี่ยวๆ ที่สำคัญคือ ระดับความบริสุทธิ์ของสารละลาย ซึ่งเป็นจำนวนของสารประกอบที่ถูกผลิตขึ้นต่อหน่วยเวลา สิ่งที่จะได้จากการวิเคราะห์ HPLC คือ ข้อมูลเกี่ยวกับ สารประกอบตัวอย่าง ซึ่งข้อมูลเหล่านั้นได้แก่ ชนิด ปริมาณ และการแยกออกจากกันของสารประกอบ
- 2) Chemical Separations ในการแยกสารเคมีสามารถใช้ HPLC ทำได้ โดยอาศัยประโยชน์จากคุณสมบัติของสารประกอบที่มีอัตราการแพร่ภายใน Column และ Mobile phase ที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถแยกสารประกอบเคมีหลายๆ ชนิดออกจากกันได้ และในการใช้ HPLC ในการแยกสารประกอบเคมีนี้ สิ่งที่เป็นตัวควบคุมหรือมีอิทธิพลต่อการแยกของสารเคมี คือ การเลือกใช้ Stationary phase และ Mobile phase
- 3) Purification หมายถึง ขบวนการแยกหรือขบวนการสกัดสารประกอบเคมีที่เราต้องการออกจากสารประกอบอื่นหรือสิ่งเจือปนต่าง ๆ สารประกอบแต่ละตัวจะมีลักษณะของ peak ภายได้เงื่อนไขของ Chromatographic ที่จะสามารถรับรู้ได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับว่าสารประกอบที่จะทำการแยกคืออะไร และสัมพันธ์กับสารตัวอย่างอย่างไร Chromatographer อาจต้องเลือกเงื่อนไข เลือกคุณสมบัติของ Mobile phase ติดตามกระบวนการแยก ตลอดจนกระทั่งสารประกอบที่ต้องการมีการรวมกันและหลุดออกจาก Stationary phase การแพร่ของสารประกอบ และสารปนเปื้อนอื่นๆ จะแพร่ผ่าน Column แยกต่างหากเพื่อที่จะได้สารประกอบที่ต้องการมีความบริสุทธิ์ได้
- 4) Identification การจำแนกชนิดของสารประกอบโดยใช้ HPLC นั้น เป็นขั้นตอนหนึ่งของการตรวจสอบด้วย HPLC ในการจำแนกสารประกอบใดๆ ก็ตาม สิ่งที่เราควรเลือกเป็นอันดับแรกคือ Detector เมื่อเลือกมาแล้วก็มาติดตั้งไว้ในตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะทำการตรวจสอบ พารามิเตอร์ของขบวนการตรวจสอบนี้ จะให้ peak ของสารประกอบตัวอย่างอย่างชัดเจน ซึ่งสังเกตได้จาก peak ที่ปรากฏบน Chromatograph การจำแนก peak จะใช้ retention time และใช้ peak ที่แยกออกจาก peak ที่ไม่ต้องการ

ซึ่งขบวนการตรวจสอบจะแสดงออกมา การเปลี่ยนแปลง retention time ของสารประกอบ พารามิเตอร์หลาย ๆ ตัวสามารถตรวจจับได้ การจำแนกชนิดของสารประกอบโดยใช้ HPLC กระทำได้โดยการค้นคว้าจากหนังสือ วารสาร และการลงมือทดลองดู ตัวอย่างของ สารประกอบที่เราทราบแล้วว่าเป็นอะไรจะเป็นประโยชน์ต่อการจำแนกชนิดของสารประกอบที่เรายังไม่ทราบได้ การจำแนกชนิดของสารประกอบเพื่อยืนยันความถูกต้องนั้นควรใช้วิธีการตรวจสอบตั้งแต่ 2 วิธีขึ้นไปประกอบกัน

5) Quantification การหาปริมาณของสารประกอบโดยใช้ HPLC เป็นกระบวนการเปรียบเทียบสารประกอบที่ไม่ทราบความเข้มข้นกับสารละลายที่ทราบความเข้มข้น มีวิธีทำคือ ฉีดชุดของสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนเข้าไปใน HPLC เพื่อทำการตรวจสอบ Chromatograph จะแสดง peak ของชุดของข้อมูลที่สำคัญกับความเข้มข้นของสารละลายที่ฉีดเข้าไป ใช้สูตรการหาพื้นที่รูปสามเหลี่ยม คำนวณหาพื้นที่ใต้ peak แต่ละ peak นำข้อมูลมาทำเป็น calibration curve โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสามารถใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทำได้ เช่น โปรแกรม Excel หรือ Cricket graph จากโปรแกรมสร้างกราฟจะได้กราฟเส้นตรง พร้อมสมการเส้นตรง $y = mx + b$ เรียกว่าสมการ calibration curve สมการเส้นตรงนี้สามารถนำมาใช้ในการหาตัวอย่างที่นักวิทยาศาสตร์ฉีดตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้นเข้าไปใน HPLC ให้เป็น แกน X แล้ว peak ที่ปรากฏบน chromatograph ให้เป็นแกน Y ถ้า Y นี้ได้มาจากสมการเส้นตรง calibration ดังนั้นจึงสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างได้โดยการแก้สมการ หาค่า x

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กับเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) การหาน้ำตาลกลูโคส คูในภาคผนวก

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ของบริษัท Shimadzu

รุ่น C-R7 Ao plas

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMAZU รุ่น LIBROR EB-40000H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200S

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

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องอบรวมลมร้อน ของบริษัท Binder

ตู้บ่มปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT123

เครื่องเขย่าของ บริษัท Gallenkamp

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX[®]

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX[®]

กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท PYREX[®]

บีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท PYREX[®]

คีมเวด (แก้ว)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิเปตต์ (pipette)
 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
 เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)

3.2 สารเคมี

ยีสต์สกัด (yeast extract)
 เปปโตเน (peptone)
 แลคโตส (lactose)
 อาหารสำเร็จรูป เอ็มอาร์เอส (MRS)
 ฝรั่ง (agar)
 น้ำกลั่น
 ยูเรีย (urea)
 โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)
 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)
 สารละลายฟีนอล 5 %
 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
 กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4)
 เมรทานอล
 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
 ไฮโดรคลอริก (HCl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ

เชื้อที่ใช้ในการศึกษาโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.1.1 การเก็บรักษาเชื้อในการวิจัย

ใช้เข็มเย็บเชื้อ (Needle) เย็บเชื้อจำนวน 1 รูป เย็บเชื้อ streak ลงในอาหารแข็ง (MRS agar) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันทับปิดปากหลอดทดลองให้สนิท เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อหรือลงในอาหารใหม่ (Subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.3.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อจำนวน 2 รูปลงในอาหารเหลว (MRS broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษา มีองค์ประกอบดังนี้

สารสกัดยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลแลคโตส	40	กรัมต่อลิตร
Minor element ซึ่งประกอบด้วย		
ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.1	กรัมต่อลิตร

นำอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้ว ไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.3.3 การศึกษาผลของแร่ธาตุปริมาณน้อยต่อการผลิตกรดแลกติก ของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

วิธีการดำเนินงาน

ศึกษาแหล่งแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยใช้อาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ

3.3.2

ศึกษาประมาณของแมงกานีสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

โดยใช้สูตรอาหารที่ทำให้เชื้อผลิตกรดแลกติกได้จากข้อ 3.3.2 โดยทำการผันแปรปริมาณแร่ธาตุแมงกานีสที่เติมลงไปในการอาหารดังนี้

สูตรที่ 1 สูตรอาหารซึ่งใช้อาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ 3.3.2 โดยเติมแมงกานีส 0.01 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 2 สูตรอาหารซึ่งใช้อาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ 3.3.2 โดยเติมแมงกานีส 0.02 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 สูตรอาหารซึ่งใช้อาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ 3.3.2 โดยเติมแมงกานีส 0.03 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 สูตรอาหารซึ่งใช้อาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ 3.3.2 โดยเติมแมงกานีส 0.04 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 สูตรอาหารซึ่งใช้อาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ 3.3.2 โดยเติมแมงกานีส 0.05 กรัมต่อลิตร

เตรียมอาหารแต่ละสูตรแล้วใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรปริมาณ 190 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที โดยให้ปริมาตรของอาหาร และหัวเชื้อรวมกันคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรพลาสติก (เติมอาหาร 190 มิลลิลิตร รวมกับหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.2.1.2 ประมาณ 10 มิลลิลิตร แต่ละสูตรอาหารทำการเตรียม 3 พลาสติก อาหารในพลาสติกใบแรกใช้ในการทำตัวเปรียบเทียบ (Blank) ส่วนอีก 2 พลาสติกทำการเติมหัวเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง (Stationary stage) โดยในขณะที่ทำการทดลองให้ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 96 วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกโดย HPLC และวัดปริมาณน้ำตาลโดยวิธีการวิเคราะห์ของ Dubois

ศึกษาปริมาณของแมกนีเซียมที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

โดยใช้สูตรอาหารที่ทำให้เชื้อผลิตกรดแลกติกได้จากข้อ 3.3.2 โดยทำการผันแปรปริมาณแร่ธาตุแมกนีเซียมที่เติมลงไปในการอาหารดังนี้

สูตรที่ 1 สูตรอาหารซึ่งใช้อาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ 3.3.2 โดยเติมแมกนีเซียม 0.025 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 2 สูตรอาหารซึ่งใช้อาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ 3.3.2 โดยเติมแมกนีเซียม 0.05 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 สูตรอาหารซึ่งใช้อาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ 3.3.2 โดยเติมแมกนีเซียม 0.1 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 สูตรอาหารซึ่งใช้อาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ 3.3.2 โดยเติมแมกนีเซียม 0.15 กรัมต่อลิตร

เตรียมอาหารแต่ละสูตรแล้วใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรปริมาณ 190 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที โดยให้ปริมาตรของอาหาร และหัวเชื้อรวมกันคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรพลาสติก (เดิมอาหาร 190 มิลลิลิตร รวมกับหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1.2 ประมาณ 10 มิลลิลิตร) แต่ละสูตรอาหารทำการเตรียม 3 พลาสติก อาหารในพลาสติกใบแรกใช้ในการทำตัวเปรียบเทียบ (Blank) ส่วนอีก 2 พลาสติกทำการเติมหัวเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง (Stationary stage) โดยในขณะที่ทำการทดลองให้ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 96 วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกโดย HPLC และวัดปริมาณน้ำตาลโดยวิธีการวิเคราะห์ของ Dubois

การวิเคราะห์ผล

1. วัดชีวมวลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร
2. วัดชีวมวลโดยน้ำหนักแห้ง โดยนำน้ำหนักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสออกแล้วนำตะกอนที่อยู่ในหลอดเซนติฟิวจ์ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำใส่โถดูดความชื้น (Desicator) ทิ้งให้เย็น วัดน้ำหนักมวลชีวภาพที่ได้
3. การวัดปริมาณกรดแลกติกโดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยน้ำหนักที่ได้จากการเก็บตัวอย่างชั่วโมงต่างๆ มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลาครึ่งชั่วโมงจากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกโดย นำส่วนใสไปกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใช้ Inersil C8-3 column ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช3.0) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

วิเคราะห์ทางสถิติ

แต่ละการทดลองเป็นแบบสุ่มอิสระโดยสมบูรณ์ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ค่าทางสถิติใช้ SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) การเปรียบเทียบใช้การทดสอบของ LSD (Least significant different) สำหรับการเปรียบเทียบจำนวนมาก ทดสอบที่ $P \leq 0.05$ ในการพิจารณาว่ามีความสำคัญทางสถิติหรือไม่

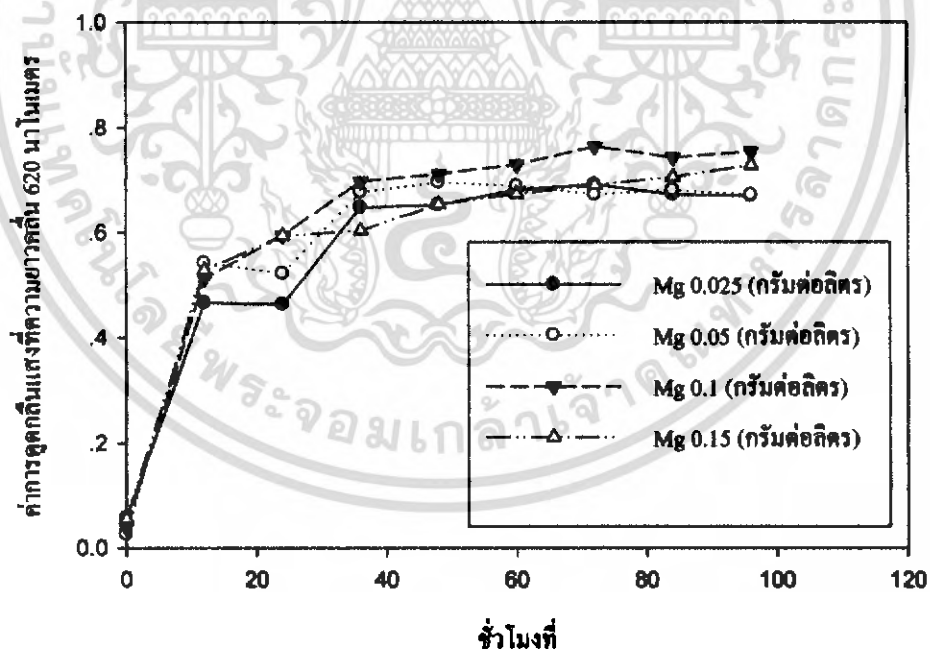
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

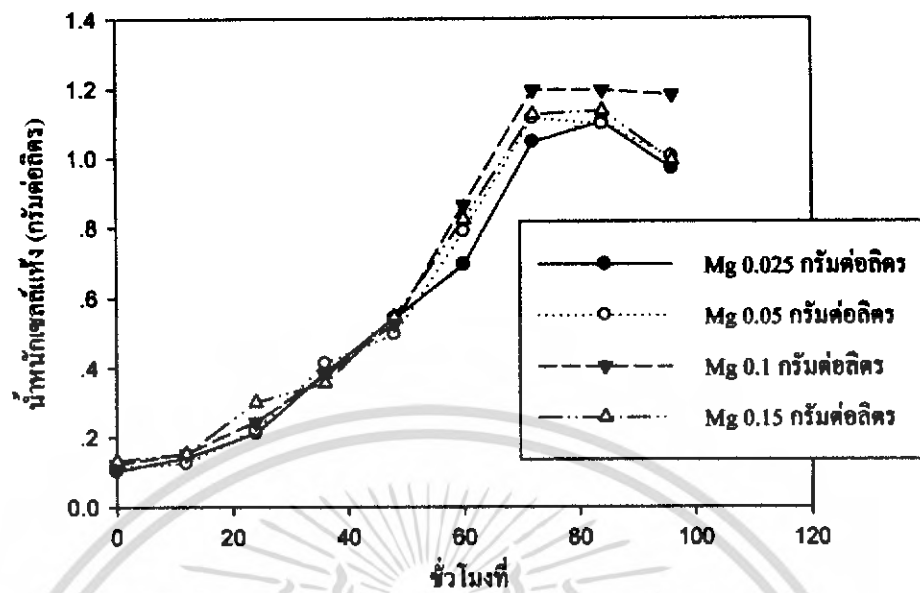
4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

4.1.1 การศึกษาผลของแร่ธาตุแมกนีเซียมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยใช้อาหารสังเคราะห์ ทำการหมักที่สถานะนิ่ง โดยใช้อุณหภูมิในการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อทำการศึกษาผลของแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า กราฟการเจริญของเชื้อในแต่ละความเข้มข้นมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งผลของค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และผลของน้ำหนักแห้ง โดยเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 72 และมีการเจริญเติบโตไปเรื่อยๆ จนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 96 ดังแสดงในรูปที่ 4.1



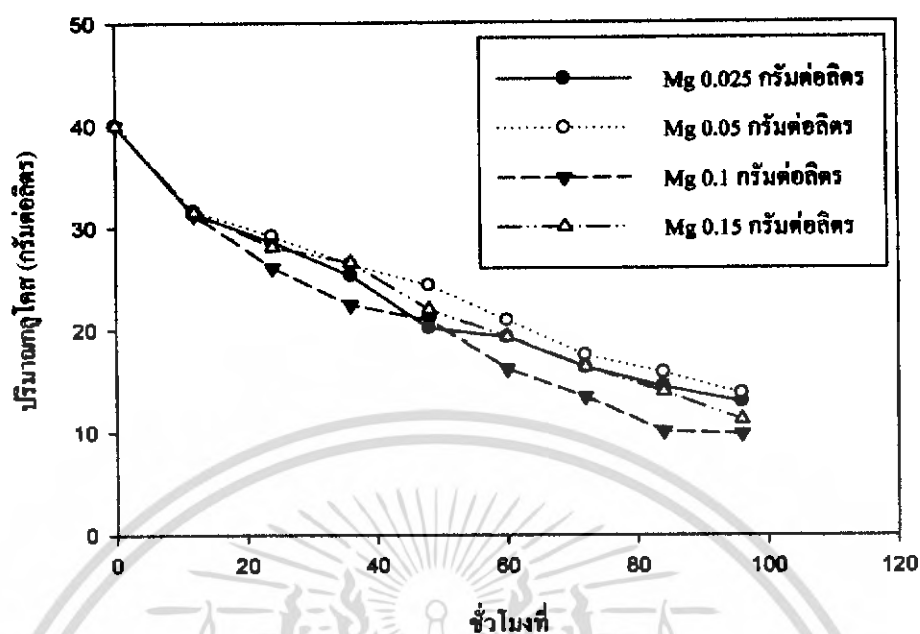
รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร



รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง โดยวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

สำหรับการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น จากกราฟจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นมีค่า 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะลดลงเรื่อยๆ โดยจะลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 12 และจะลดลงเรื่อยๆ จนกว่าจะสิ้นกระบวนการหมักที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลือน้อยที่สุด พบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ 0.1 กรัมต่อลิตรเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 จะสามารถใช้ น้ำตาลกลูโคสได้มากที่สุดโดยเหลือน้ำตาลกลูโคสในอาหารเพียง 9.82 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 75.45 ของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น แสดงว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0.1 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี ดังรูปที่ 4.3

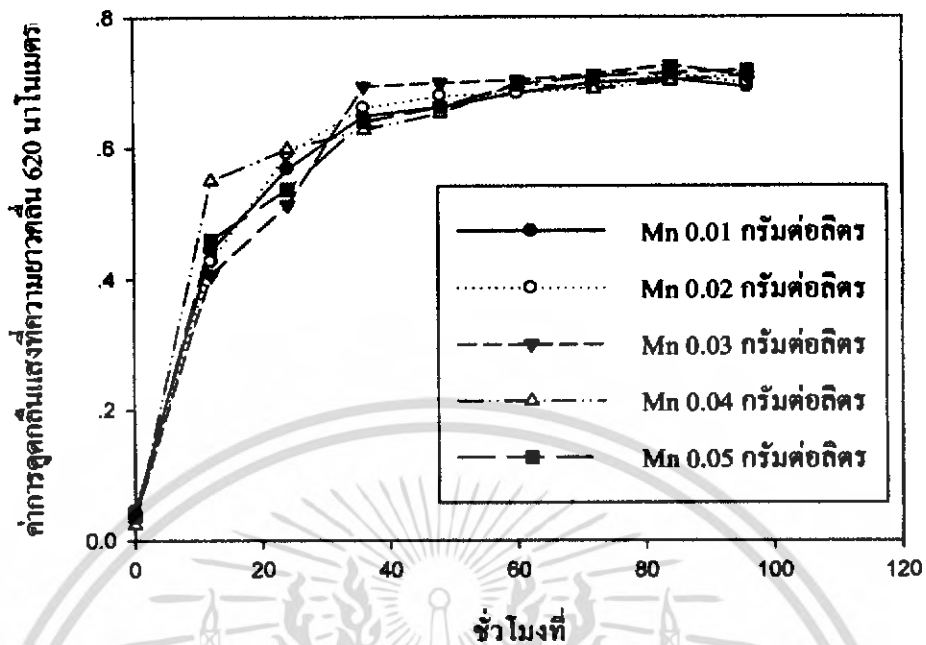
Motoyoshi Hongo และคณะ (1986) ทำการศึกษาการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลกติกโดยใช้แมกนีเซียมที่ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวส่งผลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลกติกได้โดยตรง



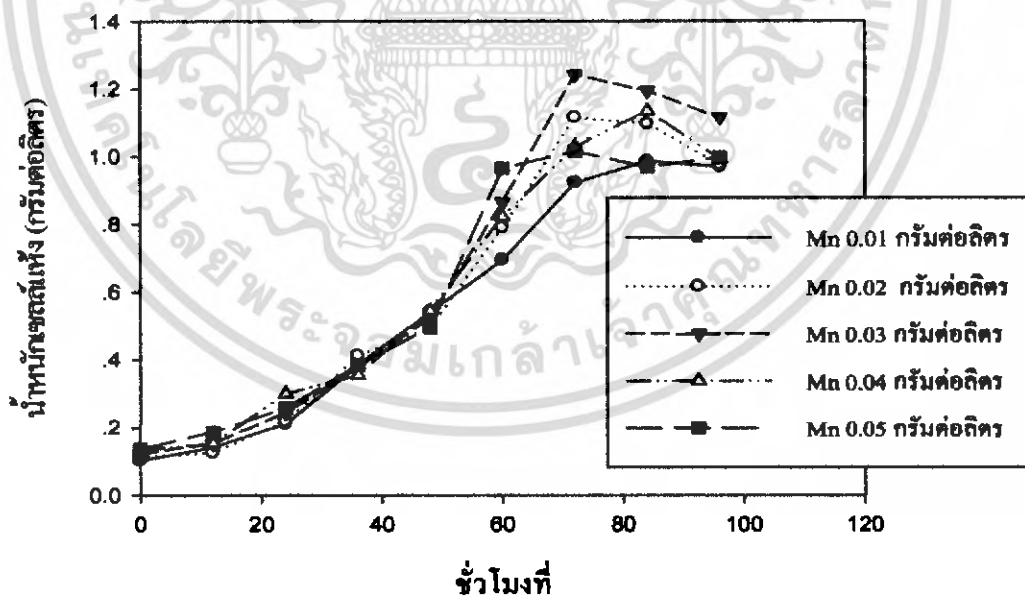
รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อทำการศึกษาผลของแมกนีเซียมที่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.15 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง

4.1.2 การศึกษาผลของแร่ธาตุแมกนีเซียมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

การศึกษากการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยจะทำการศึกษาผลของแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในแต่ละความเข้มข้นของแมกนีเซียมมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งผลของค่าการดูดกลืนแสง และผลของน้ำหนักแห้ง โดยเชื้อจะมีช่วงการเจริญสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลของการเจริญเติบโตเมื่อทำการศึกษาผลของแร่ธาตุแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีการเจริญเติบโตไปเรื่อยๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 96



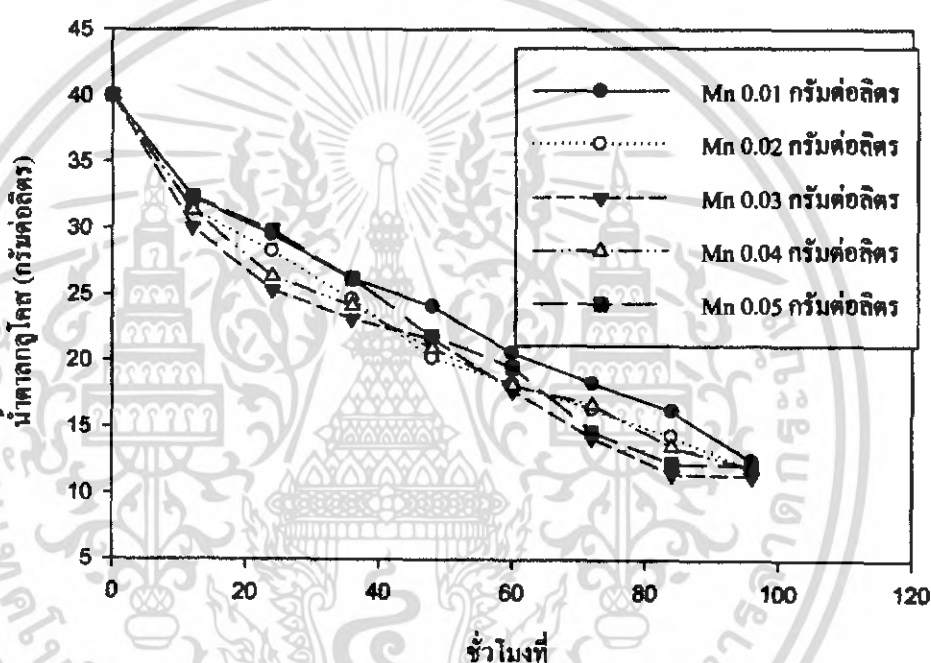
รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแมงกานีสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร



รูปที่ 4.5 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแมงกานีสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง โดยวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น จากกราฟจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นมีค่า 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะลดลงเรื่อยๆ โดยจะลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาที่ 12 และจะลดลงเรื่อยๆ จนกว่าจะสิ้นกระบวนการหมักที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลือน้อยที่สุด พบว่าความเข้มข้นของเมฆกานีสที่ 0.03 กรัมต่อลิตร เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 จะสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้มากที่สุดโดยเหลือน้ำตาลกลูโคสในอาหารเพียง 11.32 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 71.70 ของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น แสดงว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของเมฆกานีส 0.03 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกเหลือ เมื่อทำการศึกษาผลของเมฆกานีสที่มีความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

Y.Ohkouchi และ Y.Inoue(2006) ได้ศึกษาผลของแร่ธาตุเมฆกานีสที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* ATCC 18011 โดยพบว่าแหล่งอาหารที่มีการเติมแร่ธาตุเมฆกานีสเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าในแหล่งอาหารที่ไม่เติมเมฆกานีส การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 จากการทดลองเมื่อศึกษาความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียม และเมฆกานีส ผลการทดลองที่ได้ทั้งค่าการดูดกลืนแสง ผลของน้ำหนักแห้ง และผลการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เปลี่ยนแปลงไปมีค่าสอดคล้องกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักทำได้โดย การหาค่าความเข้มข้นของแมกนีเซียม และแมงกานีสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ แล้วทำการปรับสภาวะต่างๆที่ใช้ในการศึกษาซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

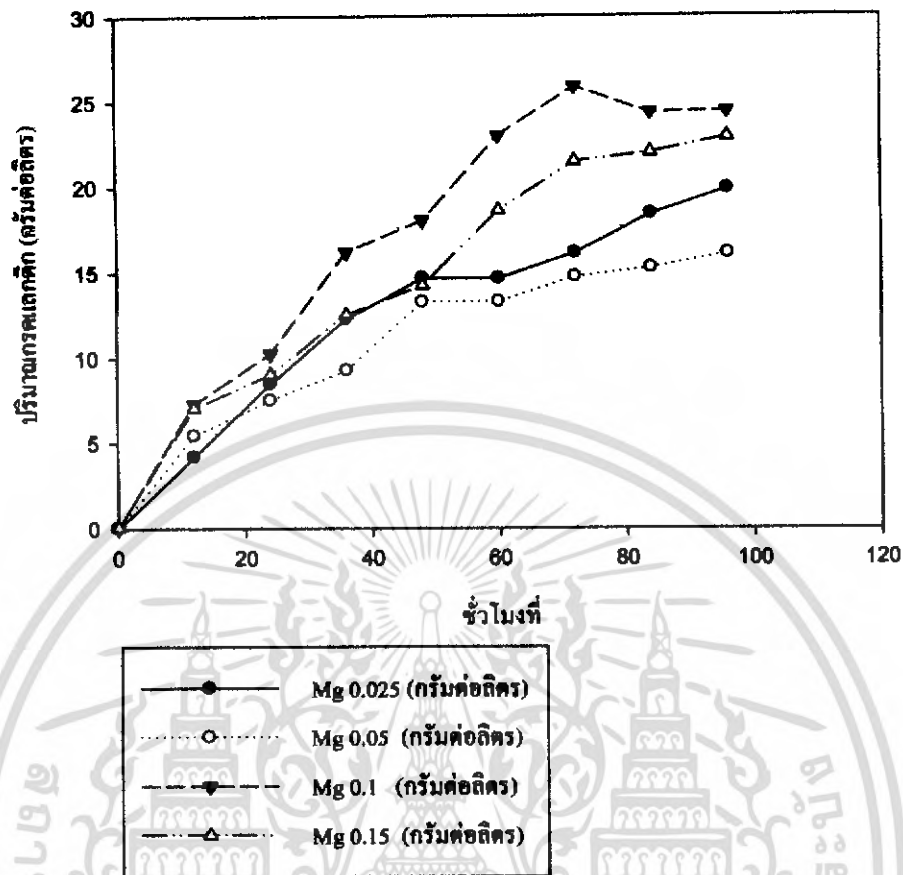
4.2.1 ผลของแร่ธาตุแมกนีเซียมที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียมที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียมที่ใช้คือ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.15 กรัมต่อลิตร โดยทำการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกโดยใช้เครื่อง HPLC ผลการวิเคราะห์พบว่าที่ความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียม 0.1 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดคือ 26.54 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 อัตราการผลิต 0.359 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตกรดแลกติก 0.973 กรัมต่อกรัมซับสเตรท ดังรูปที่ 4.7

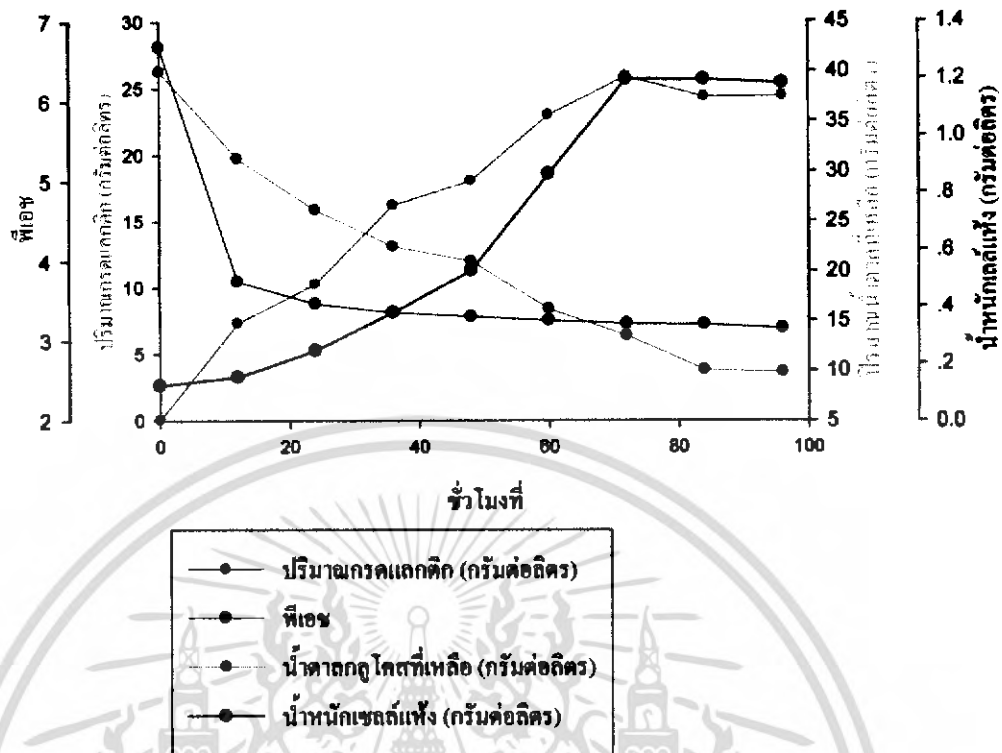
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณผลผลิตกรดแลกติก อัตราการผลิต และผลผลิตกรดแลกติก ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียม 0.1 กรัมต่อลิตรจะสูงกว่าในอาหารที่มีความเข้มข้นอื่นๆ คือ 0.025, 0.05 และ 0.15 กรัมต่อลิตรสำหรับระยะเวลาในการผลิตกรดแลกติกคือสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งต่างจากอาหารที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียมอื่นๆ โดยจะผลิตกรดได้สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 96

เมื่อสังเกตจากกราฟการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อให้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 จะพบว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียมในทุกความเข้มข้น จะมีค่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างกระบวนการหมัก โดยในชั่วโมงที่ 12 พีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ และเกือบคงที่ในระยะสุดท้ายของกระบวนการหมัก

จากผลการทดลองนี้ได้นำปริมาณกรดแลกติกไปเปรียบเทียบกับค่าทางสถิติพบว่า ที่ความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียม 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.15 กรัมต่อลิตร นั้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ซึ่งการทดลองที่เกี่ยวข้องกับผลการทดลองนี้ได้มีรายงานของ Chin-Fa Hwang และคณะ (2005) สนับสนุนการใช้แหล่งแร่ธาตุปริมาณน้อยมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus* sp. ซึ่งที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมต่างๆ ดังนี้ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.15 กรัมต่อลิตร มีผลต่อปริมาณกรดแลกติก โดยผลของปริมาณกรดแลกติกที่ดีที่สุด แสดงดังตารางที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดแลกติกเมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียม เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่สภาวะความดัน 100 กิโลพาสกาล (Kgf.) อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดแลกติก พีเอช น้ำหนักซอลต์แห้ง และปริมาณน้ำตาถกดูโคสที่เหลือ โดยเกิดจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยใช้แหล่งอาหารที่มีแร่ธาตุแมกนีเซียม 0.1 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดลอง พิเศษของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลิตของกระบวนการหมักเมื่อทำการศึกษาผลของ Mg ที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.15 กรัมต่อลิตร

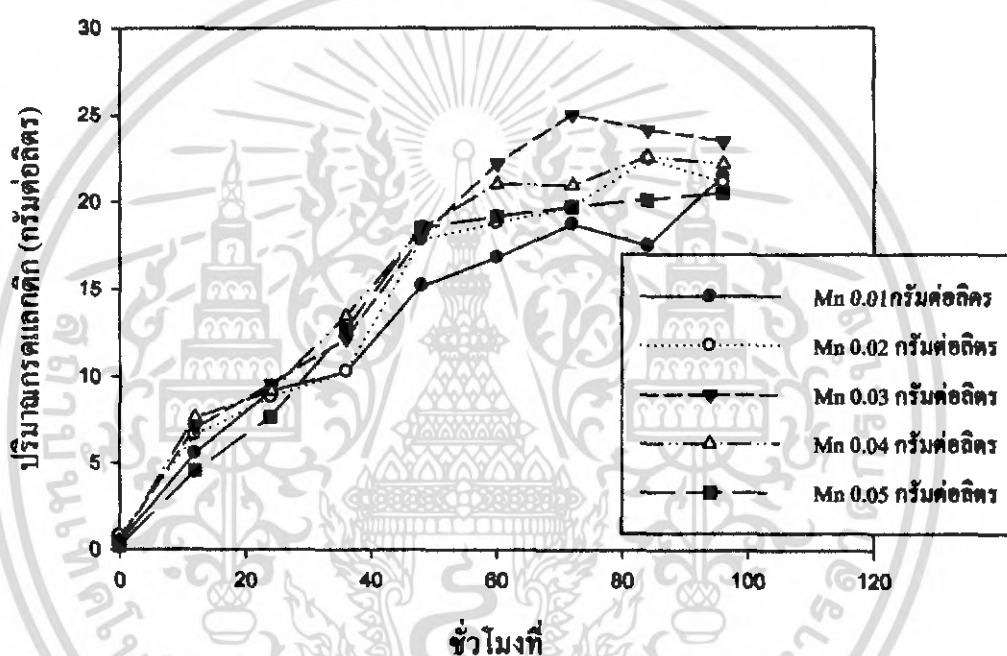
ความเข้มข้นของ Mg	ชั่วโมงการหมัก	พิเศษ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	% น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อชั่วโมง)	ผลผลิตกรดแลกติก (กรัมต่อกรัม)
0.025	96	3.2	0.85	27.06	67.65	19.82	0.206	0.732
0.05	96	3.17	0.88	26.25	65.625	16.05	0.167	0.611
0.1	72	3.21	0.94	26.54	66.35	25.83	0.358	0.973
0.15	96	3.15	0.89	28.79	71.97	22.83	0.237	0.793

หมายเหตุ : ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลของแร่ธาตุแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นของแร่ธาตุแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยความเข้มข้นของแร่ธาตุแมงกานีสที่ใช้คือ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 กรัมต่อลิตร โดยทำการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกโดยใช้เครื่อง HPLC ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่า ที่ความเข้มข้นของแร่ธาตุแมงกานีส 0.03 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดคือ 25.00 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 อัตราการผลิต 0.347 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตกรดแลกติก 0.969 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง

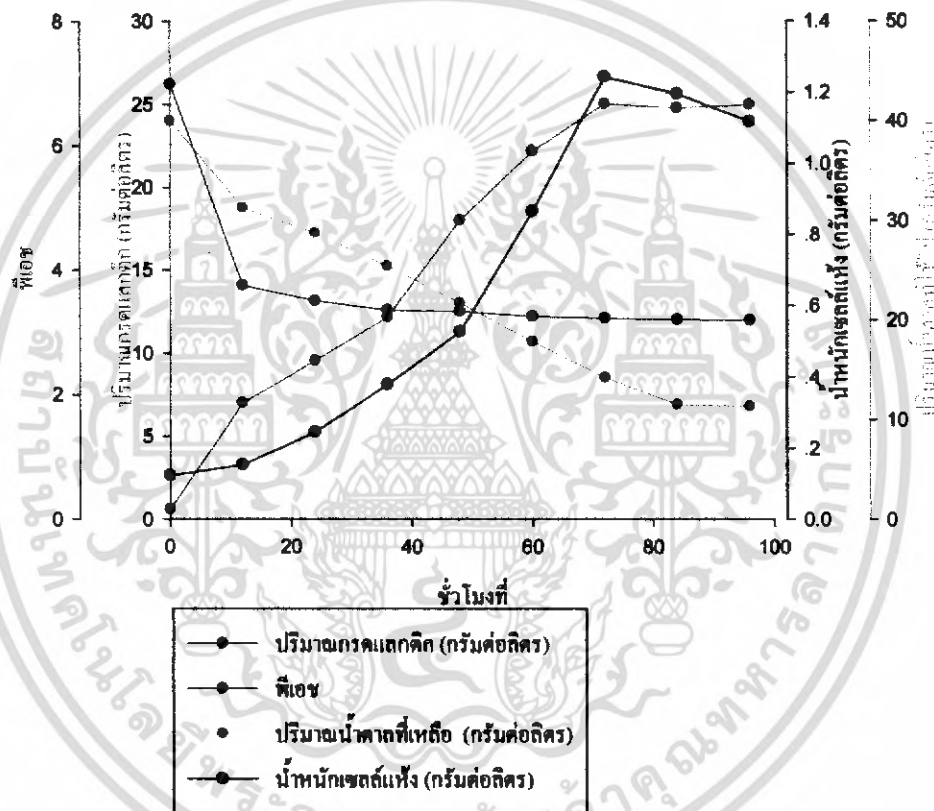


รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดแลกติกเมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแร่ธาตุแมงกานีส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่สภาวะความดัน 100 กิโลพอร์ส (Kgf.) อุณหภูมิคอกัลมันน์ 40 องศาเซลเซียส ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณผลผลิตกรดแลกติก อัตราการผลิต และผลผลิตกรดแลกติก ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุแมงกานีส 0.03 กรัมต่อลิตร จะสูงกว่าในอาหารที่มีความเข้มข้นอื่นๆ คือ 0.01, 0.02, 0.04 และ 0.05 กรัมต่อลิตร รวมทั้งระยะเวลาในการผลิต

กรดแลกติกก็ลดลงคือ สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งต่างจากอาหารที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุแมงกานีสอื่นๆ โดยจะผลิตกรดได้สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 96

เมื่อสังเกตจากกราฟการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อให้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 จะพบว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุแมงกานีสในทุกความเข้มข้น จะมีค่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างกระบวนการหมัก โดยในชั่วโมงที่ 12 พีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ และเกือบคงที่ในระยะสุดท้ายของกระบวนการหมัก



รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณกรดแลกติก พีเอช น้ำนํกซลต์แห้ง และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ โดยเกิดจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยใช้แหล่งอาหารที่มีแร่ธาตุแมงกานีส 0.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนี้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดลอง ทีเอชของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลกุกโคสที่ใช้ ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลิต ของกระบวนการหมักเมื่อทำการศึกษผลของแมงกานีสที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ Mn	ชั่วโมงการหมัก	ทีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกุกโคสที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	% น้ำตาลกุกโคสที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อชั่วโมง)	ผลได้ของผลผลิต (กรัมต่อกรัม)
0.01	96	3.15	0.97	28.25	70.625	21.47	0.224	0.760
0.02	96	3.17	0.98	28.16	70.4	21.10	0.231	0.749
0.03	72	3.22	1.12	25.79	64.475	25.00	0.347	0.969
0.04	96	3.15	0.99	28.31	70.775	22.15	0.231	0.782
0.05	96	3.13	0.99	29.35	73.375	20.47	0.232	0.758

หมายเหตุ : ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองนี้ได้นำไปเปรียบเทียบค่าทางสถิติพบว่า ที่ความเข้มข้นของแร่ธาตุแมงกานีส 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 นั้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ซึ่งการทดลองที่เกี่ยวข้องกับผลการทดลองนี้ได้มีรายงานของ Y. Ohkouchi และ Y. Inoue (2006) ได้ศึกษาผลของแร่ธาตุแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ใช้กากอาหารเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* ATCC 18011 โดยพบว่าแหล่งอาหารที่มีการเติมแร่ธาตุแมงกานีสจะให้ผลผลิตของกรดแลกติกมากกว่าแหล่งอาหารที่ไม่มีการเติมแมงกานีส

Fitzpatrick JJ. และคณะ (2001) ศึกษาผลของแร่ธาตุแมงกานีสซึ่งเติมในรูปในรูป $MnSO_4 \cdot H_2O$ มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่า การเติมแมงกานีสที่ความเข้มข้น 0.03 กรัมต่อลิตร ช่วยทำให้การผลิตกรดแลกติกสูงขึ้น

Fitzpatrick และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่มีการเติมแมงกานีสในรูป $MnSO_4 \cdot H_2O$ ร่วมกับยีสต์สกัดลงไปในเวย์ พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดจะสั้นลง และเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสได้ดี แต่เมื่อไม่มีการเติมแมงกานีสเวลาที่ใช้ในการผลิตจะนานขึ้น และเชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ได้เท่าที่ควร

4.3 การเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับ ฟอสฟอรัสขนาด 2 ลิตร ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

4.3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหารสำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

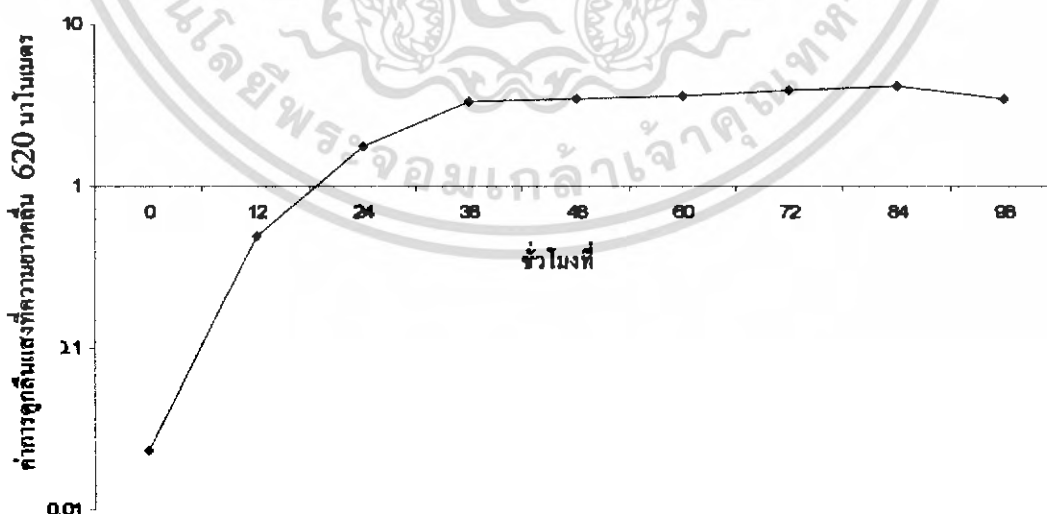
จากการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ซึ่งจากการศึกษาพบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (อัมตिका และคณะ 2007) ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ผสมกับเปปโตน 10 กรัมต่อลิตร แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กลูโคส 40 กรัมต่อลิตร (เสกสรรค์ และอรรรณพันธ์ , 2007) แหล่งของแร่ธาตุที่เหมาะสม คือ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) 0.03 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.1 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.5 (เชิดศักดิ์ และคณะ, 2007) ความเร็วรอบที่เหมาะสม คือ สภาวะนิ่ง

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์

ยีสต์สกัด (Yeast Extract)	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Peptone)	10	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (Glucose)	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร

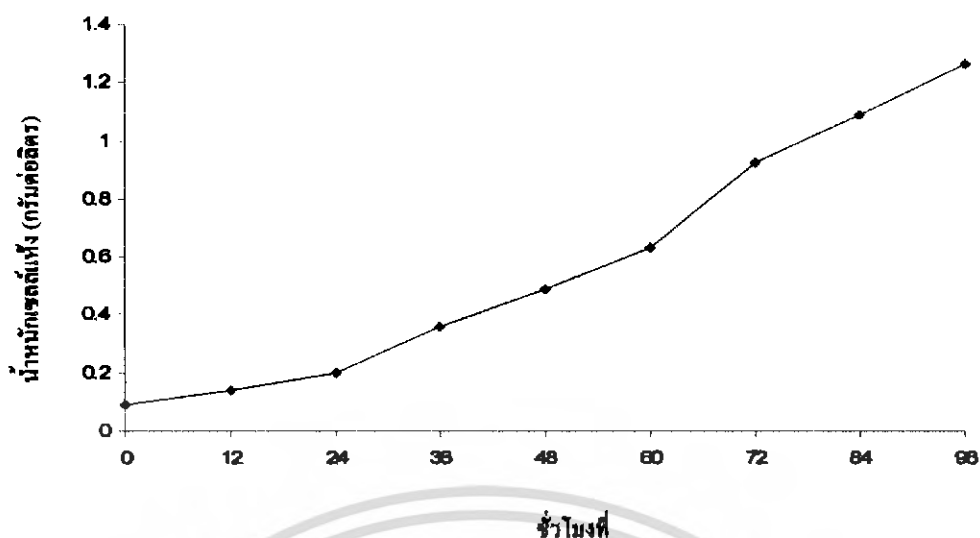
4.3.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ระดับ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยทำการเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อทำการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเชื้อในแต่ละช่วงเวลาพบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลานานขึ้น มีระยะการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 84 วัดการเจริญเติบโตของเซลล์โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เท่ากับ 4.130 หลังจากชั่วโมงที่ 84 เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 มีการเจริญเติบโตลดลงเนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดมากขึ้น เช่นเดียวกับน้ำหนักเซลล์แห้งจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลานานขึ้น เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้งได้เท่ากับ 1.262 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลของการเจริญเติบโตของเซลล์ดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสอดคล้องกันดังแสดงในรูปที่ 4.11 และรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.11 ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรของ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

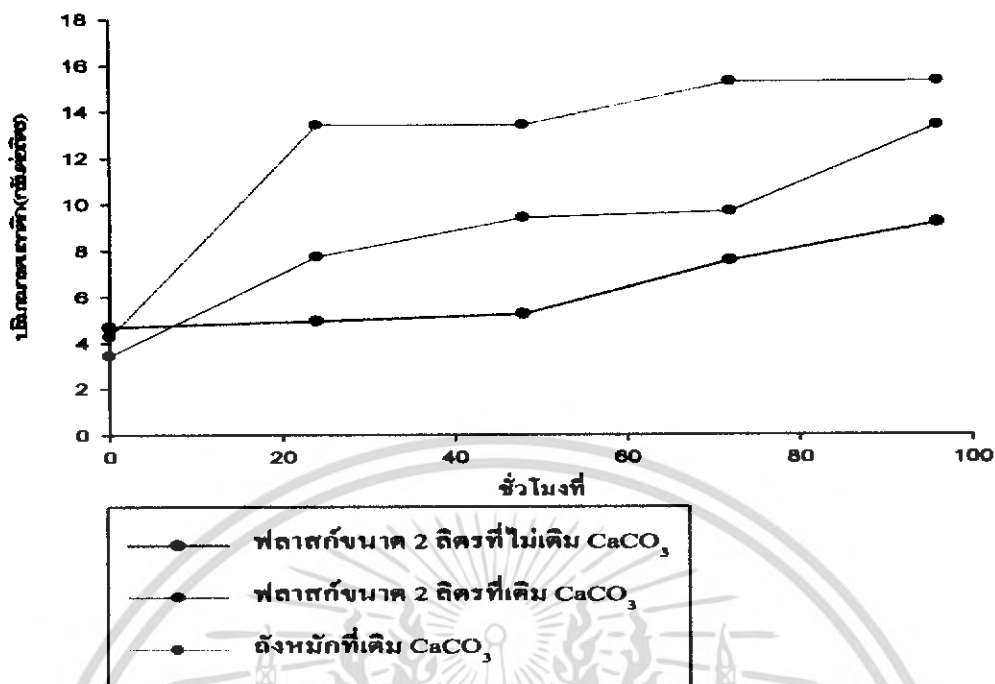
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ค่าน้ำหนักกรดที่ห่างของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

4.3.3 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ใน ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

จากการศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ทั้งที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าความสามารถในการผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ เชื้อที่เจริญในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต โดยมีการผลิตกรดแลกติกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 ปริมาณกรดแลกติกที่สูงสุดได้เท่ากับ 15.27 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.719 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.159 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคือเชื้อที่เจริญในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต โดยมีการผลิตกรดแลกติกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 ปริมาณกรดแลกติกที่สูงสุดได้เท่ากับ 13.35 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.66 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.139 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเชื้อที่เจริญในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตสามารถผลิตกรดแลกติกได้ต่ำสุด โดยมีการผลิตกรดแลกติกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 72 ถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 ปริมาณกรดแลกติกที่สูงสุดได้เท่ากับ 9.16 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.558 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.095 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง



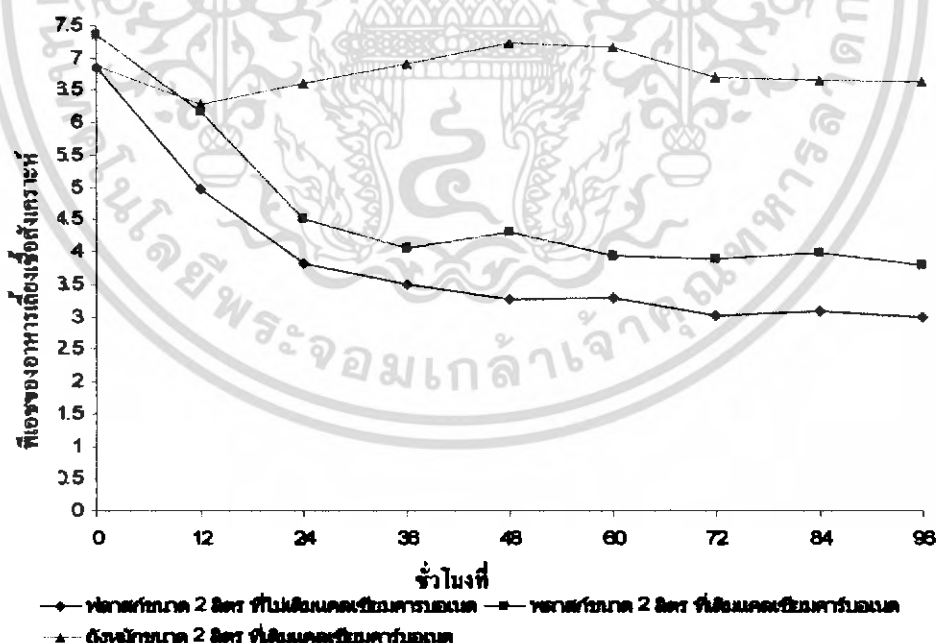
รูปที่ 4.13 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาคซ์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

จากรูปที่ 4.13 จะเห็นได้ว่าเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่เจริญในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด ทั้งนี้เนื่องมาจากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักสามารถควบคุมความเร็วรอบของใบพัดกวนในอัตราเร็วที่เหมาะสมได้ซึ่งในการทดลองนี้กำหนดให้ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ทำให้เชื้อสามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึงและในถังหมักสามารถควบคุมค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ได้ การเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปเพื่อให้แคลเซียมคาร์บอเนตแตกตัวจะเกิดเป็นแคลเซียมแลคเตท และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งเป็นตัวสะเทิน (neutralizer) ในระหว่างการหมัก แต่เมื่อ แคลเซียมคาร์บอเนตมีความเข้มข้นมากถึง 10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ของแคลเซียมแลคเตทได้ยาก ทำให้การสกัดสารละลายแลคเตท ยากตามไปด้วย (Ohkouchi และ Inoue, 2006)

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่เจริญในถังหมัก จะมีช่วงเวลาของการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดมากกว่า ดังนั้นจึงเห็นว่าการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีประโยชน์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

4.3.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อธัญเคราะห์ ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับฟอสเฟตขนาด 2 ลิตรที่เต็ม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับธัญหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

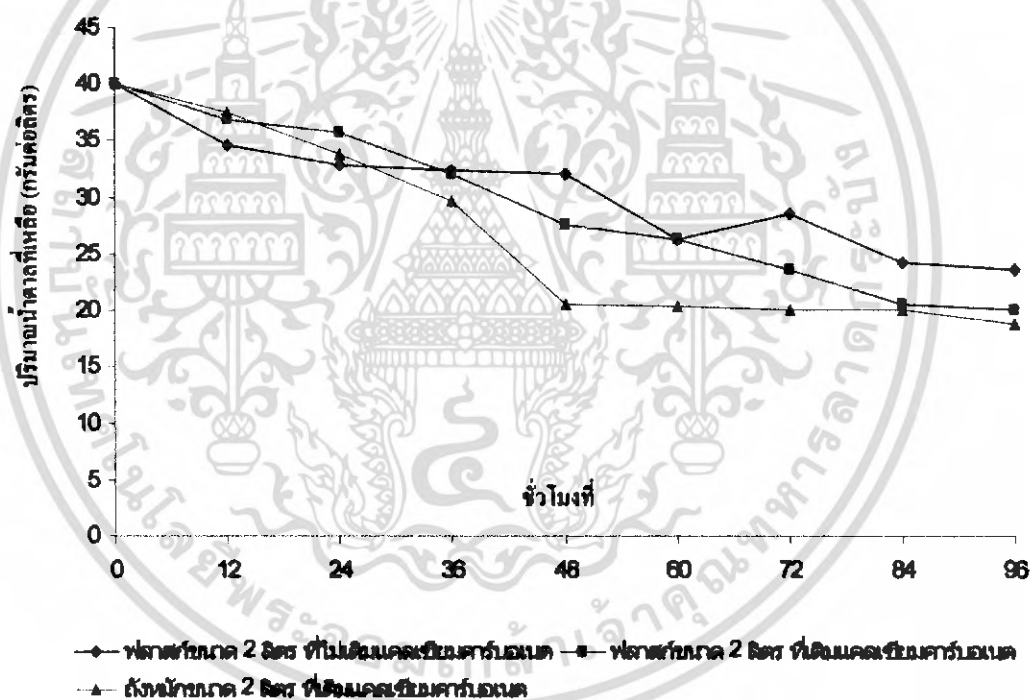
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในฟอสเฟตขนาด 2 ลิตรที่เต็ม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต และในธัญหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโต เชื้อจะมีการผลิตกรดแลกติกออกมาโดยสังเกตุจากค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีค่าลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้น ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อธัญเคราะห์ในฟอสเฟตขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.85 พีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาที่ 12 เท่ากับ 4.98 หลังจากนั้นค่าพีเอชจะลดลงอย่างคงที่จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 96 พีเอชเท่ากับ 3.00 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อธัญเคราะห์ในฟอสเฟตขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.36 พีเอชจะลดลงอย่างช้าๆ ในช่วงเวลาที่ 12 เท่ากับ 6.17 หลังจากนั้นพีเอชจะลดลงจนกระทั่งคงที่ เมื่อถึงชั่วโมงที่ 96 พีเอชเท่ากับ 3.80 และค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อธัญเคราะห์ในธัญหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงจากค่าพีเอชเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.88 และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ชั่วโมงที่ 96 พีเอชเท่ากับ 6.63 จากการทดลองจะสังเกตเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อธัญเคราะห์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นค่าพีเอชของอาหารจะมีค่าลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงนั้นแสดงได้ดังรูปที่ 4.14



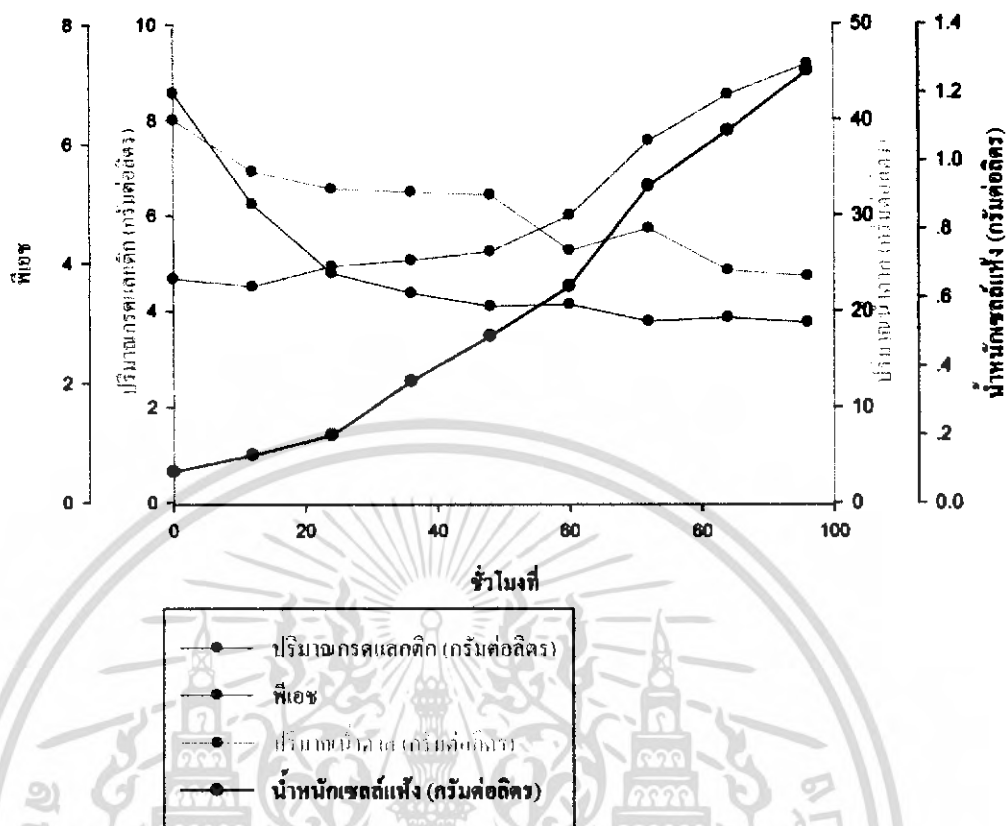
รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อธัญเคราะห์ใน ฟอสเฟตขนาด 2 ลิตรที่เต็ม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับธัญหมักขนาด 2 ลิตร โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

4.3.5 การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

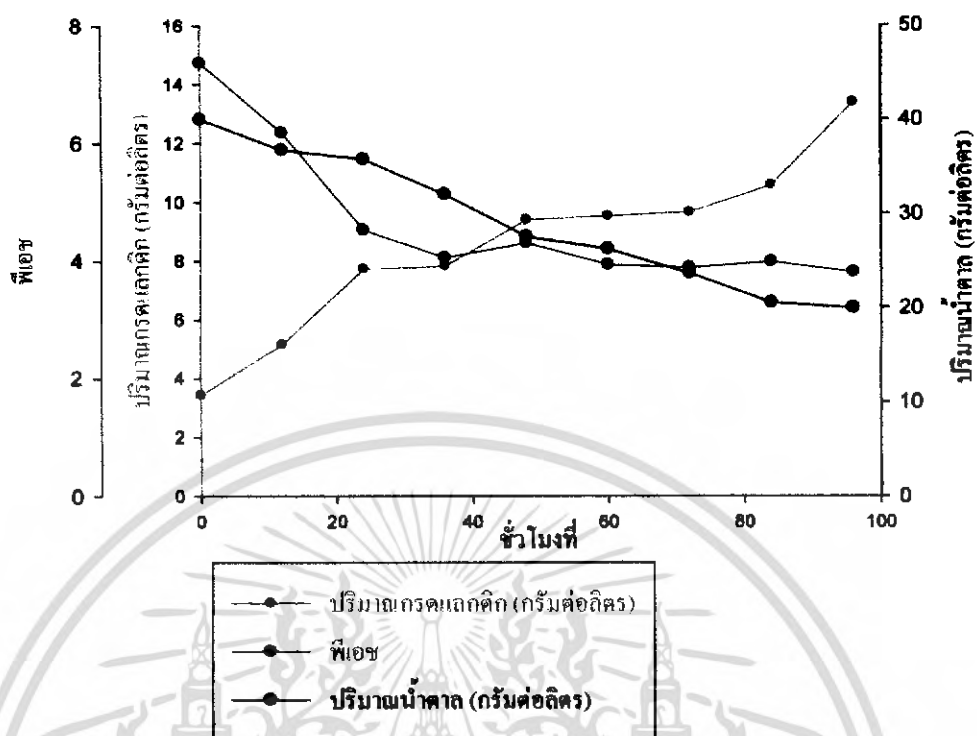
จากการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 40.0 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองที่ได้พบว่าในชั่วโมงที่ 96 เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในถังหมักแบบไบโพลกวนขนาด 2 ลิตร มีการใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือเท่ากับ 18.78 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 19.94 กรัมต่อลิตร ส่วนในฟลาสก์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 23.58 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.15



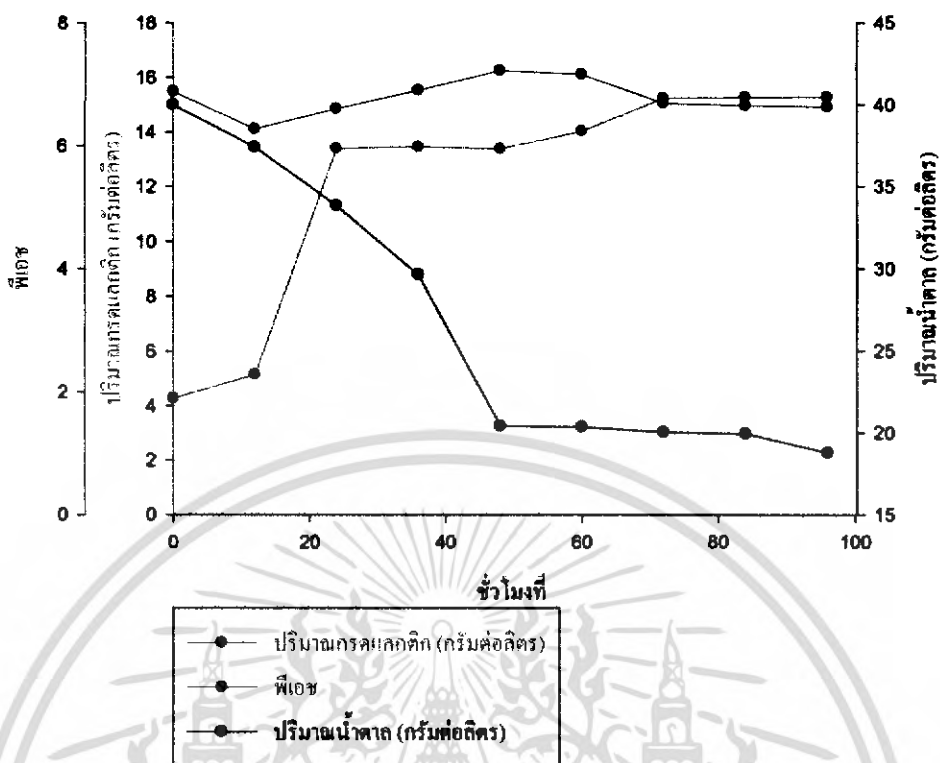
รูปที่ 4.15 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863



รูปที่ 4.16 แสดงปริมาณกรดแลกติก พีเอช น้ำหนักซอลต์แห้ง และปริมาณน้ำคอลลอยด์ที่เหลือ ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยทำการบ่มในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง



รูปที่ 4.17 แสดงปริมาณกรดแลกติก พีเอช และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยทำการบ่มในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง



รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณกรดแลกติก พีเอช และปริมาณน้ำตาตกลูโคสที่เหลือ ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยทำการบ่มในถังหมักที่มีใบพัดกวนที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดลอง พิเศษของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลิต เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการหมักแบบ ฟลากส์ 2 ลิตร กับถังหมักขนาด 2 ลิตร

การทดลอง	ชั่วโมง ที่	พิเศษ	น้ำหนัก เซลล์ แห้ง (กรัม ต่อ ลิตร)	น้ำตาล กลู โคสที่ ถูกใช้ ไป (กรัม ต่อ ลิตร)	ร้อยละ ของ น้ำตาล กลู โคสที่ ถูกใช้ ไป	ปริมาณ กรด แลก ติก (กรัม ต่อ ลิตร)	อัตรา การผลิต (กรัมต่อ ลิตรต่อ ชั่วโมง)	ผลได้ ของ ผลิต (กรัม ต่อ กรัม)
ฟลากส์ขนาด 2 ลิตร ไม่เติม สารละลาย CaCO_3	96	3.00	1.256	16.42	41.05	9.16	0.095	0.558
ฟลากส์ขนาด 2 ลิตร เติม สารละลาย CaCO_3	96	3.8	-	20.06	50.15	13.50	0.141	0.666
ถังหมักขนาด 2 ลิตร เติมสารละลาย CaCO_3	96	6.63	-	21.22	53.05	15.27	0.159	0.720

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร โดยเป็นกรดที่จำเป็นต่ออุตสาหกรรมอาหารอย่างมากโดยสามารถนำไปใช้เป็นสารช่วยเพิ่มกลิ่นรสในอาหาร รวมทั้งยังช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหารให้นานขึ้น โดยช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ซึ่งกรดแลกติกนี้สามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป แต่ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการทางชีวภาพซึ่งกรดแลกติกที่ได้จะมีความปลอดภัย และสามารถทำการสกัดได้ง่าย รวมทั้งราคาค่อนข้างต่ำในการผลิตที่ต่ำกว่าคั่ว

สำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ เชื้อที่ใช้จะเป็นพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทิฟ คือ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ทั้งจากการทดลองเมื่อศึกษาผลของแร่ธาตุแมกนีเซียม และแมงกานีส ข้อมูลที่ได้จากผลของค่าการดูดกลืนแสง ผลของน้ำหนักแห้ง ผลจากการวัดปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป ได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันคือ มีช่วงการเจริญสูงสุดอยู่ที่ 72 ชั่วโมง และสามารถใช้น้ำตาลได้สูงสุดถึงร้อยละ 71.70 ของสารตั้งต้น

และจากการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC พบว่า สภาวะที่เหมาะสมของแร่ธาตุที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดแลกติก คือ แมกนีเซียมที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 25.83 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 อัตราการผลิต 0.358 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลได้ของผลผลิต 0.973 กรัมต่อกรัมซับสเตรท และแมงกานีสที่ความเข้มข้น 0.03 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 25.00 ณ ชั่วโมงที่ 72 อัตราการผลิต 0.347 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลได้ของผลผลิต 0.969 กรัมต่อกรัมซับสเตรท

เมื่อได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแล้วจึงทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์ และระดับถังหมัก ในขั้นแรกจะเป็นการเปรียบเทียบระหว่างฟลาสก์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตกับฟลาสก์ที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตพบว่า ฟลาสก์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่า คือ 13.50 กรัมต่อลิตร ส่วนฟลาสก์ที่ไม่เติมได้ปริมาณกรดแลกติกเพียงแค่ 9.16 กรัมต่อลิตร เป็นเช่นนี้ก็เนื่องมาจากแคลเซียมคาร์บอเนตที่เติมลงในอาหารสามารถแตกตัวได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และแคลเซียมแลกเตท ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น จะทำให้สภาวะในกระบวนการหมักเป็นแบบไร้อากาศมากยิ่งขึ้น (สภาวะ reduction) ทำให้สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณมาก จากนั้นทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่างฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตกับถังหมักที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีอัตราการกวน และมีการควบคุมพีเอชของน้ำหมักด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากถั่วงอกหมักมีปริมาณมากกว่าในฟลาสก์ คือ ในถั่วงอกสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากถึง 15.27 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 แต่ในฟลาสก์ผลิตได้ 13.35 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 สาเหตุเนื่องมาจากในถั่วงอกมีระบบควบคุมกระบวนการหมักที่ดีกว่า มีการควบคุมด้วยใบพัดเพื่อให้อาหารเข้ากับเชื้อได้ดี เชื้อจึงสามารถใช้อาหารได้เต็มที่ มีการควบคุมพีเอชระหว่างกระบวนการหมักด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้พีเอชในอาหารไม่ต่ำเกินไป เพราะถ้าพีเอชต่ำเกินไปจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตหรือความสามารถในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ได้

ในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยการนำผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรม เช่น เวช โมลาส เป็นต้น พบว่าโรงงานอุตสาหกรรมเนยแข็งได้ผลิตผลพลอยได้ออกมา คือ เวช ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส น้ำ โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ (Roukas, 1997) เหมาะแก่การนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติก ซึ่งถือเป็นการทดลองที่ต่อยอดจากการศึกษาเดิม และยังเป็นการนำผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์ด้วย



บทที่ 6

เอกสารอ้างอิง

- ชลัท ศานติวารังคณา. 2534. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเครื่องคั้นจากเวย์ ปัญหาพิเศษ ภาควิชาอุตสาหกรรม คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ถัญจกร จันทร์อุคม, สุกัญญา จันทร์ชุม และอรัญ หันหงส์กิตติกุล. 2548. การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิตแคเทอรีโอซินจาก *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11. *Songklanakarin J.Sci.Technol* Vol 27 (3). 817-824.
- วนปรีศ ภัทวารพงษ์, ศิริวรรณ พูลพันธุ์, วิทยา ปิ่นสุวรรณ และอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2545. การเจริญและการสร้างสารให้กลิ่นรสของแบคทีเรียแลคติกในหางนมจากนมแข็ง การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28 กรุงเทพฯ. 565.
- วรรณมา ตั้งเจริญชัย. 2532. เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการนม และผลิตภัณฑ์นม ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
- ศิวาพร ศิวเวช. 2546. วัตถุประสงค์อาหาร เล่ม 1. นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ
- ศูนย์พัฒนาฝึกอบรม และวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ. 2526. การผลิตผลิตภัณฑ์นม และการจัดการเอกสารการฝึกอบรมเกี่ยวกับเทคโนโลยีอาหารนม ชุดที่ 3 สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์. เชียงใหม่
- Bulut, S. Elibol, M. Ozer, Dursum. 2004. Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal* 21 :33-37.
- Dailey, O. D., Dowd, M.K. and Mayorga, J.C. 2000. Influences of lactic acid on the solubilization of protein during steeping. *J. Agric Food Chem.*48 :1352-1357.
- Food and Drug Administration. 1998. Code of Federal Regulations, U.S. Government Printing Office, Washington.
- Fitzpatrick, J. J. Ahrens, M. Smith, S. 2001. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. *Process Biochemistry* 36 : 671-675.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Fitzpatrick, J. J. and O'Keeffe, U. 2001. Influence of whey proteinhydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Process Biochemistry* 37 : 183-186.
- Fitzpatrick, J. J. Murphy, C. Mota, F. M. Pauli, T. 2003. Impurity and cost consideration for nutrient supplementation of whey permeate fermentation to produce lactic acid for biodegradable plastics. *International Dairy Journal* 13 :575-580.
- Gardner, W. H. 1972. Acidulants in food processing. Hand book of food additive 2nd ed. Vol 1:225-270.
- Huang ,L. P. Jin, B. Lant, P. Zhou, J. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal* 23 : 265-276.
- 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 *L. delbrueckii*. *Process Biochemistry* 41 :1117-1123.
- Kadam, S. R. Patil, SS. Bastawde, KB. Khire, J. M. and Gokhale, D.V. 2006. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry* 41 :120-126.
- Kulozik, U. and Wilde, J. 1999. Rapid lactic acid production high cell concentrations in whey ultrafiltration by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme and Microbial Technology* 24 :297-302.
- Muller, V. 2001. Bacterial fermentation. Encyclopedia of life Science : 1-7.
- Nancib, N. Nancib, A. Boudjelal, A. Benslimane, C. Blanchard, F. Boudrant, J. 2001. The effect of supplementation by different nitrogen source on the production of lactic acid a from date juice by *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus*. *Bioresource Technology* 78 : 149-153.
- Nancib, A. Nancib, N. Meziane Cherif, D. Boubendir, A.Fick, M. Boudrant, J. O, Seph. 2005. Joint effect of on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus*. *Bioresource Technology* 96 :63-67.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Narayanan, N. Roychoudhury, P. K. Srivastava, A. 2004. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* Vol.7 No2 :167-179.
- Oh, H. Wee, Y. J. Yun, J. S. Han, S. H. Jung, S. Ryu, H. W. 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology* 96 : 1492-1498.
- Ohkouchi, Y., Inoue, Y., 2006. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. *Bioresource Technology* 97, 1554-1562.
- Pauli, T and Fitzpatrick, J. J. 2002. Malt combing nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. *Process Biochemistry* 38 :1-6.
- Roukas, T and kotzekidou, P. 1998. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* cell using fedbatch culture. *Enzyme and Microbial Technology* 22 : 199-204.
- Salminen, S. Wright, A. V. and Ouwehand, A. 1998. Lactic acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. 2nd ed. New York: Marcel dekker. Inc.
- Senthuran, A. Senthuran, V. Hatti-Kaul, R. Mattiasson, B. 1999. Lactic acid production by Immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reator : a step towards optimization. *Journal of Biotechnology* 73 :61-70.
- Sodergard, A. and Stolt, Milael. 2002. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Prog. Polym. Sci* 27 : 1123-1163.
- Tanaka, T. Hoshina, M. Tanabe, S. Sakai, K. Ohtsubo, S. and Taniguchi, M. 2006. Production of D-latic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology* 97: 211-217.
- www.raritanval.edu/departments/science/molecules.html
- www.technica.net/NF/NF3/biodegradable.htm
- www.brighton73.freemove.co.uk/.../phd-intr.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

Meat extract	10	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (Peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมอะซิเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.05	กรัม

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

Meat extract	10	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (Peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมอะซิเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.05	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมี

สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 3 เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (โดยชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยตวงกรดฟอสฟอริก 3.4 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำหนักธาตุโคส วิธีฟินอล-ซัดฟิวริก (Dobols, 1956)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. ทิวเวคแก้ว
3. ปิเปต
4. Stirrer

สารเคมี

1. กรดซัดฟิวริก (reagent grade 95.5% , specific gravity 1.84)
2. ฟินอล 5% โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟินอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 400ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (400 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	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

วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมฟินอล 5% ลงไป 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงที่ผิวหน้าของของเหลว โครงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่า และนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตรากราฟเชิงจาง})}{(\text{ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน}) \times 1,000}$$

2. น้ำหนักเซลล์แห้ง

วิธีการ

1. เตรียมหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่อบแห้ง และทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. คุ้ดตัวอย่างสารแขวนลอยของเซลล์ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนลอยที่เข้มข้นเก็บไว้สำหรับการวิเคราะห์ค่าปริมาณน้ำตาล และกรดแลกติก
4. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 1-2 ครั้ง
5. รินส่วนลอยน้ำทิ้ง นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
6. ทิ้งให้เย็นในเคซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
7. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งจาก

$$C_x \text{ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดทดลอง และเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดทดลอง (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$

ภาคผนวก ค

การใช้เครื่อง HPLC

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วยเครื่อง HPLC

1.1 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

1. Power เครื่องทุกเครื่องของ HPLC
2. ยก Sinker ใส่นิวคลของ Mobile phase
3. เปิด Drain ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ให้สังเกตว่าในสายของ Sinker มีฟองอากาศอยู่รึเปล่า ถ้ายังมีอยู่ให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
5. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอกจน Pump หยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน
6. ปิด Drain valve ที่ Pump
7. ตั้ง Flow rate , P max และ P min ที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับ Pump (P max ดูจาก Pressure maximum ของ Column)
8. ตั้งอุณหภูมิที่ต้องการไว้ที่ CTO (ถ้ามี)
9. ตั้ง Parameter ให้กับ Detector
10. ตั้งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.2 ขั้นตอนการเปลี่ยน MOBILE PHASE

1. ปิด Pump HPLC
2. เท Mobile phase ใหม่ลงในบีกเกอร์
3. เปิด Drain ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ยก Sinker ออกจาก Mobile phase แล้วจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มี Mobile phase ใหม่อยู่
5. รอกจน Pump ดูด Mobile phase ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20-30 มิลลิลิตร
6. ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของ Sinker ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาดแล้วนำ Sinker จุ่มลงในนิวคลของ Mobile phase ใหม่
7. ในระหว่างขั้นตอนที่ 1-6 ถ้า Pump หยุดทำงาน ให้กดปุ่ม Purge อีกครั้ง
8. ให้สังเกตว่าสายของ Sinker มีฟองอากาศอยู่รึเปล่า ถ้ายังมีให้กด Purge ให้ Pump ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
9. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอกจน Pump หยุดทำงานเองหรือให้กด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน

10. ปิด Drain valve ที่ Pump แล้วตั้งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์
หมายเหตุ : การเปลี่ยน Mobile phase ต้องคำนึงถึงด้วยว่า Mobile phase เก่า และใหม่เข้ากันหรือ
เปล่า ถ้าไม่สามารถเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันได้ต้องใช้สารอื่นเป็นตัวเชื่อมกลางโดย run mobile phase
ตัวเชื่อมกลางอย่างน้อย 20 นาที

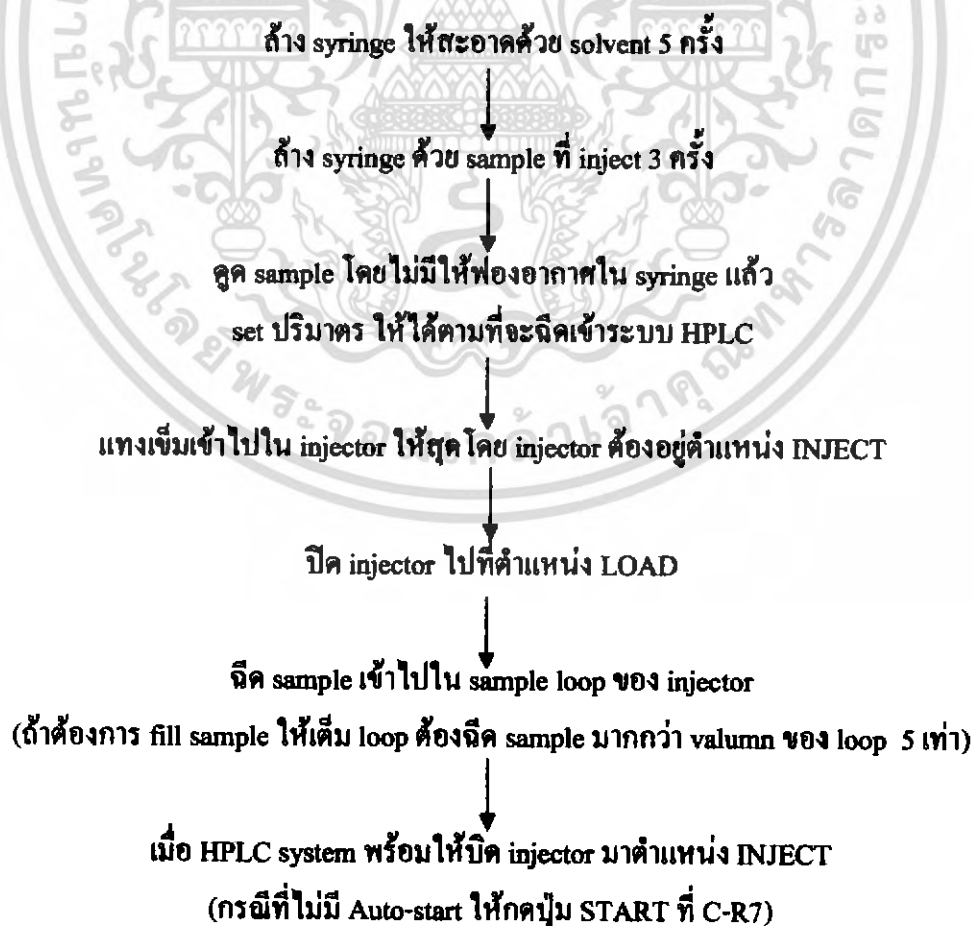
ตัวอย่าง 1.) Buffer Solution → น้ำกลั่น HPLC → Polar Original Solvent

2.) Non Polar Solvent → Iso-propanol Polar → Original Solvent

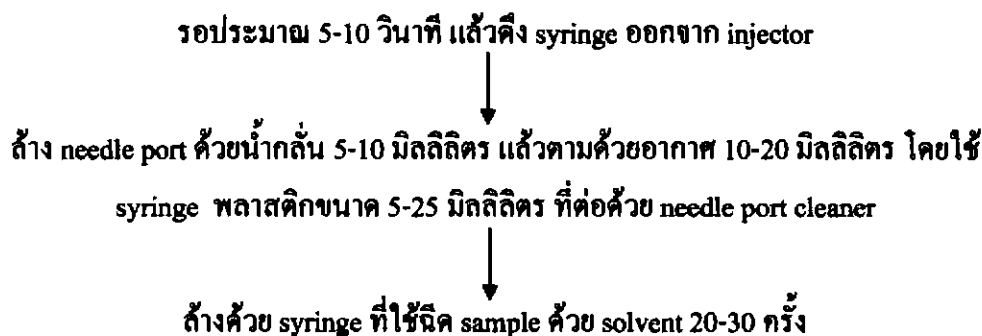
1.3 ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง

1. ตรวจสอบให้แน่ใจว่า LC อยู่ในสถานะ Ready
2. ตรวจสอบให้แน่ใจว่า Detector และ Autosampler อยู่ในสถานะ Ready
3. รอจน Baseline ค่อนข้างนิ่ง
4. ถ้าต้องการให้เครื่องคำนวณ Slope ให้เลือกกด S
5. ถ้า Baseline นิ่งอยู่ที่ตำแหน่งสูงกว่าศูนย์เล็กน้อย สามารถตั้งศูนย์อัตโนมัติกด Z
6. ทำการ Inject Sample

6.1 Rheodyne Manual Injector



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



1.4 ขั้นตอนการปิดเครื่อง

1. หลังจาก inject sample สุดท้ายเสร็จแล้วให้ run mobile phase ต่ออีกประมาณ 30 นาที
2. ตั้ง OFF pump
3. ปิด power ของ HPLC units แล้วยก Sinker ให้พ้น Mobile phase

หมายเหตุ : กรณีที่จะหยุดใช้ เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

1.5 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

1. Run Mobile Phase ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run Mobile Phase ที่ใช้เก็บ Column 30 นาที
3. ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

1.6 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)

1. Run Mobile Phase ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run Mobile Phase ที่ใช้เก็บ Column 1 ชั่วโมง
3. หยุด Pump แล้วถอด column ออกจากระบบแล้วต่อ pipe เปล่าแทนที่ และปิด column ด้วย plug ให้แน่น
4. เปลี่ยน mobile phase เป็น 70% NaOH แล้ว run เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง
5. off pump แล้วปิดเครื่องทุก unit
6. ยก sinker ออกจากขวด mobile phase แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

1.7 ขั้นตอนการใช้งาน

1. กดปุ่มเปิด Power ที่เครื่อง C-R7A ในกรณีที่มี 2 Drive ให้ใส่แผ่น System disk ใน Drive 1 และแผ่นเก็บข้อมูลใน Drive 2 ในกรณีที่มี Board สำหรับเชื่อม HPLC กับ C-R7A ให้ทำการเชื่อมต่อสัญญาณระหว่างเครื่องทั้งสองโดยพิมพ์ OPEN TRS 7 และ ENTER หลังจากปรากฏหน้าจอ
2. กด WIN 1 จะปรากฏหน้าจอ Menu ของ WIN 1 เลือกหัวข้อ 2 แล้วตามด้วย ENTER จะปรากฏ

เลือก L เพื่อเรียก Analysis File ในกรณีเคยสร้าง File เก็บไว้

E ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูกโหลดขึ้นมาใช้งาน

R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่าใน Analysis File ที่โหลดขึ้นมาใช้งานอยู่

A ในกรณีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File กับทุก ๆ ครั้งของการฉีด

การสร้าง Analysis File ใหม่

- เลือก E จะปรากฏหน้าจอของ Analysis File
- แก้ไข Parameter ดังต่อไปนี้ WIDTH 5
DRIFT(uV/min) 0
และ T.DBL(min) 1000
- กด EXIT เพื่อออกจากหน้าจอ จะปรากฏคำถาม Save FILE? Y: yes N:no กด Y จะปรากฏ

Part 1:	
File Name 2:	

- กำหนด Drive และชื่อ Analysis File ตามที่ต้องการตรงตำแหน่ง File Name ตามด้วย ENTER เช่น

Part 1:	
File Name 2:	ALCOHOL

หลังจากการ save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN 1

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

Chromatogram Storage Mode [S:set R:reset C:cancel latest A:auto-]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือก S เมื่อต้องการตั้งชื่อ File สำหรับ Save จะปรากฏ

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

กำหนด Drive และ File ตามด้วย “.C00” และ ENTER จำนวน Chromatogram ที่ต้องการ Save ในชื่อเดียวกันนี้ (สูงสุด 99) และ ENTER เช่น

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

เลือก R เมื่อต้องการยกเลิกการตั้งชื่อข้างต้น

C ยกเลิกการ Save ของ Chromatogram ชุดท้าย

A เมื่อต้องการให้เครื่อง Save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

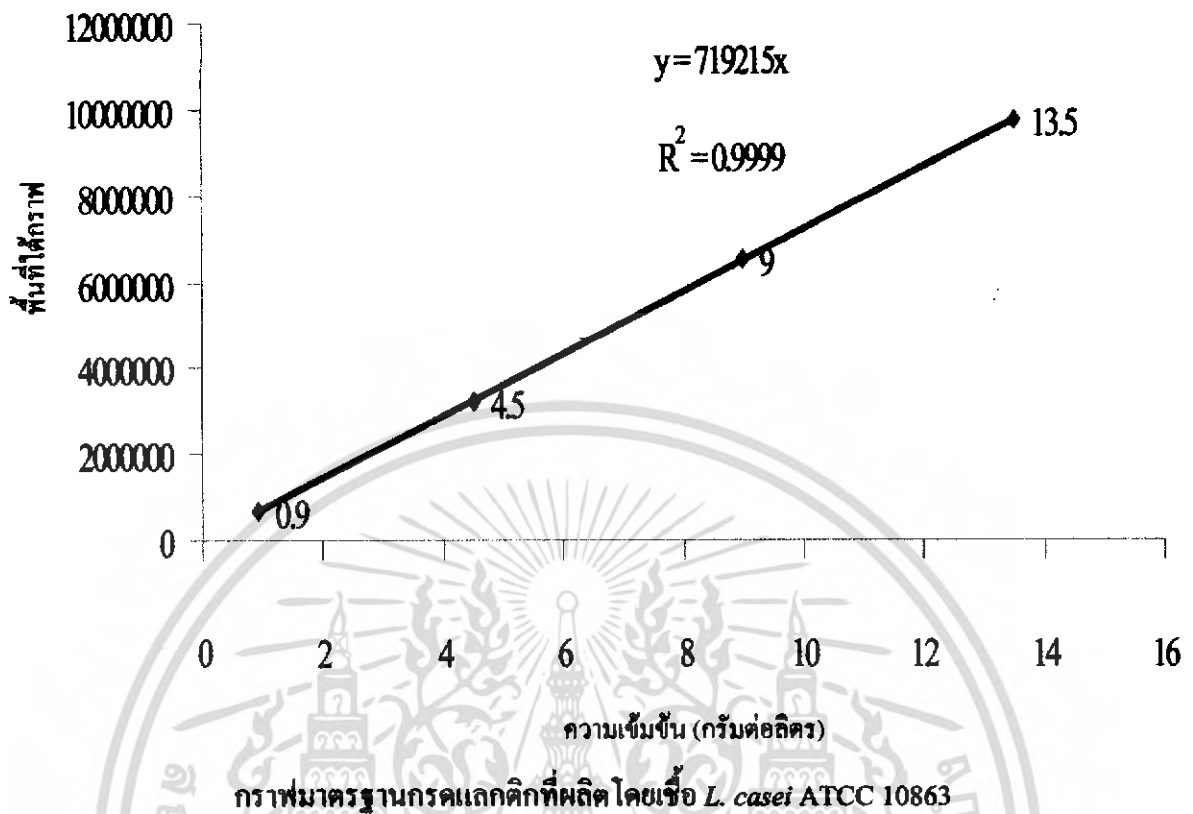
4. เลือกข้อ 1 จากหน้าจอ Menu ของ WIN1 จากนั้นรอสังเกตเห็นเส้น Baseline ค่อนข้างเรียบ จากนั้นทำการ Zero สัญญาณจาก Detector โดยปรับปุ่ม Zero ที่ Detector จนกว่าจะสามารถ Set 0 ที่ Detector ได้

5. ทำการ Test slope ของสัญญาณที่ส่งมาโดยการกด S ที่เครื่อง C-R7A เครื่องจะใช้เวลาทดสอบประมาณ 10 เท่าของค่า Width ที่ตั้งไว้ใน Analysis File หลังจากการทดสอบสิ้นสุดค่า Slope ที่ได้จะถูก Save ใน Analysis File อัตโนมัติถ้าต้องการแก้ไขให้กลับเข้าสู่หน้า

6. Menu ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis File

7. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณ และให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START

ในกรณีที่เครื่อง C-R7A สามารถเชื่อมต่อและควบคุมการทำงานของ HPLC ได้จะสามารถขอลูค่าต่าง ๆ ของเครื่อง HPLC ผ่านเครื่อง C-R7A ได้จากหน้า Menu ของ WIN1 โดยเลือก 7:LC Monitor ตามด้วย ENTER



2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	140.309	3	46.770	1816.298	.000
Within Groups	.206	8	.026		
Total	140.515	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DATA

Duncan

lactic	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Mg 0.05	3	16.2300			
Mg 0.025	3		19.8200		
Mg 0.15	3			21.4500	
Mg 0.1	3				25.7500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28.183	4	7.046	68819.514	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	28.184	14			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

DATA

Duncan

lactic	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
2.00	3	21.1013				
1.00	3		21.4707			
4.00	3			22.1501		
5.00	3				22.2690	
3.00	3					25.0009
Sig.		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
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	59.301	2	29.650	296503.000	.000
Within Groups	.001	6	.000		
Total	59.301	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

DATA

Duncan

lactic	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1.00	3	9.1600		
2.00	3		13.5000	
3.00	3			15.2700
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (OD_{620}) ของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณความเข้มข้นของแมงกานีสต่างๆดังนี้ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 กรัมต่อลิตรในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะนิ่ง

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของแมงกานีส (กรัมต่อลิตร)				
	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
0	0.045	0.036	0.037	0.024	0.036
12	0.444	0.427	0.407	0.550	0.460
24	0.568	0.591	0.513	0.598	0.537
36	0.648	0.661	0.694	0.627	0.639
48	0.662	0.679	0.699	0.652	0.662
60	0.684	0.683	0.703	0.698	0.697
72	0.699	0.691	0.712	0.689	0.709
84	0.705	0.712	0.726	0.701	0.714
96	0.692	0.698	0.709	0.711	0.718

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (OD_{620}) ของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณความเข้มข้นของแมกนีเซียมต่างๆดังนี้ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.15 กรัมต่อลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะนิ่ง

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของแมกนีเซียม (กรัมต่อลิตร)			
	0.025	0.05	0.1	0.15
0	0.058	0.026	0.04	0.056
12	0.467	0.542	0.513	0.528
24	0.464	0.522	0.594	0.593
36	0.648	0.677	0.698	0.603
48	0.653	0.696	0.712	0.654
60	0.682	0.689	0.730	0.674
72	0.692	0.673	0.764	0.691
84	0.673	0.681	0.743	0.706
96	0.670	0.672	0.754	0.728

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงค่าฟิเชอเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียม และแมงกานีสต่างๆ โดยอาหารที่ใช้จะมีทั้งหมด 9 สูตร ทำการบ่มในพลาสติกขนาด 250 ml ในสถานะนิ่ง อุณหภูมิ 37 °C

ชั่วโมงที่	ฟิเชอ								
	Mg0.025 กรัมต่อ ลิตร	Mg0.05 กรัมต่อ ลิตร	Mg0.1 กรัมต่อ ลิตร	Mg0.15 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.01 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.02 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.03 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.04 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.05 กรัมต่อ ลิตร
0	6.70	6.67	6.68	6.71	7.03	7.04	6.99	6.69	7.02
12	3.76	6.67	3.74	3.73	3.75	3.74	3.75	3.72	3.73
24	3.51	3.71	3.46	3.48	3.50	3.51	3.50	3.43	3.47
36	3.31	3.37	3.35	3.34	3.33	3.50	3.35	3.37	3.31
48	3.33	3.34	3.30	3.30	3.31	3.47	3.33	3.29	3.29
60	3.21	3.25	3.25	3.26	3.23	3.32	3.25	3.27	3.21
72	3.22	3.29	3.21	3.21	3.19	3.24	3.22	3.20	3.19
84	3.20	3.21	3.20	3.19	3.17	3.19	3.20	3.18	3.16
96	3.20	3.17	3.15	3.15	3.15	3.17	3.19	3.15	3.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียม และแมงกานีสต่างๆ โดยอาหารที่ใช้จะมีทั้งหมด 9 สูตร ทำการบ่มในพลาสติกขนาด 250 ml ในสภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 37 °C

ชั่วโมง ที่	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)								
	Mg0.025 กรัมต่อ ลิตร	Mg0.05 กรัมต่อ ลิตร	Mg0.1 กรัมต่อ ลิตร	Mg0.15 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.01 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.02 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.03 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.04 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.05 กรัมต่อ ลิตร
0	0.42	0.52	0.46	0.25	.45	.81	.55	.46	.21
24	12.94	13.75	9.82	11.21	9.15	8.77	9.55	9.15	7.65
48	16.29	17.45	13.46	16.34	15.18	17.81	12.13	18.45	18.48
72	20.16	24.36	20.95	21.98	18.68	19.66	25.00	20.94	19.69
96	28.61	29.18	26.12	28.15	21.47	21.10	23.45	22.15	20.47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหาร
 สังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุแมกนีเซียม และแมงกานีสต่างๆ โดยอาหารที่ใช้
 จะมีทั้งหมด 9 สูตร ทำการบ่มในพลาสติกขนาด 250 ml ในสถานะนิ่ง อุณหภูมิ 37 °C

ชั่วโมง ที่	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)								
	Mg0.025 กรัมต่อ ลิตร	Mg0.05 กรัมต่อ ลิตร	Mg0.1 กรัม ต่อ ลิตร	Mg0.15 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.01 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.02 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.03 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.04 กรัมต่อ ลิตร	Mn0.05 กรัมต่อ ลิตร
0	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
12	31.36	31.68	31.28	31.56	32.31	31.36	30.05	31.35	32.36
24	28.61	29.18	26.12	28.15	29.52	28.24	25.32	26.34	29.82
36	25.34	26.42	22.45	26.59	26.19	24.61	23.17	24.16	26.19
48	20.16	24.36	20.95	21.98	24.10	20.17	21.64	20.91	21.84
60	19.24	20.89	16.16	19.27	20.59	18.26	17.79	18.16	19.53
72	16.29	17.45	13.46	16.34	18.34	16.37	14.21	16.72	14.67
84	14.42	15.77	10.05	13.95	16.22	14.29	11.48	13.52	12.25
96	12.94	13.75	8.72	11.21	12.46	11.84	11.32	11.87	12.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 คำนำน้หนักเซลล์แห้งของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ใน
 ฟลาสก์ ขนาด 2 ลิตร ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) และในถังหมัก
 แบบไบโพดกวอนขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	ฟลาสก์ 2 ลิตร ที่ไม่เติม แคลเซียมคาร์บอเนต	ฟลาสก์ 2 ลิตร ที่เติม แคลเซียมคาร์บอเนต	ถังหมักแบบไบโพดกวอน ขนาด 2 ลิตร
0	0.090	-	-
12	0.138	-	-
24	0.197	-	-
36	0.355	-	-
48	0.486	-	-
60	0.631	-	-
72	0.925	-	-
84	1.087	-	-
96	1.262	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (OD_{620}) ของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และในถังหมักแบบไบโพลกวนขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร		
	พลาสติก 2 ลิตรที่ไม่เติม แคลเซียมคาร์บอเนต	พลาสติก 2 ลิตรที่เติม แคลเซียมคาร์บอเนต	ถังหมักแบบไบโพลกวน ขนาด 2 ลิตร
0	0.023	-	-
12	0.491	-	-
24	1.760	-	-
36	3.355	-	-
48	3.460	-	-
60	3.640	-	-
72	3.940	-	-
84	4.130	-	-
96	3.450	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) และในถังหมักแบบไบโพดกวขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง		
	พลาสติก 2 ลิตร ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	พลาสติก 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	ถังหมักแบบไบโพดกวขนาด 2 ลิตร
0	6.85	7.36	6.88
12	4.98	6.17	6.27
24	3.82	4.52	6.60
36	3.49	4.05	6.90
48	3.27	4.30	7.22
60	3.30	3.93	7.16
72	3.02	3.88	6.69
84	3.08	3.98	6.65
96	3.00	3.80	6.63

ตารางที่ 10 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) และในถังหมักแบบไบโพดกวขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)		
	พลาสติก 2 ลิตร ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	พลาสติก 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	ถังหมักแบบไบโพดกวขนาด 2 ลิตร
0	4.6678	3.4294	4.2595
24	4.9270	7.7172	13.3898
48	5.2267	9.3800	13.3784
72	7.5532	9.6462	15.2333
96	9.1623	13.3504	15.2726

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในพลาสติกขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) และในถังหมักแบบไบโพดกวนขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		
	พลาสติก 2 ลิตร ที่ไม่เติม แคลเซียมคาร์บอเนต	พลาสติก 2 ลิตร ที่เติม แคลเซียมคาร์บอเนต	ถังหมักแบบไบโพดกวน ขนาด 2 ลิตร
0	40.00	40.00	40.00
12	34.58	36.76	37.42
24	32.76	35.78	33.82
36	32.40	32.06	29.64
48	32.10	27.56	20.42
60	26.24	26.22	20.36
72	28.56	23.62	20.04
84	24.18	20.50	19.94
96	23.58	19.94	18.78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้