สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

นายเชิดศักดิ์ ณ วิเชียร
นายเทิดศักดิ์ บัวสุดตา
นายสุวัฒน์ บุญจารุเนตร

ปพ.
T56w
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72575
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

1769331
b.1176518
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of pH and Temperature on Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei ATCC 10863*

Mr.Cherdsak Nawichian

Mr.Therdsak Buasudta

Mr.Suwat Boonjarunet

A special Project Submitted in Partial of Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ	ผลของพีเอช และอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863
นักศึกษา	นายเชิดศักดิ์ ณ วิเชียร รหัส 46050455
	นายเทิดศักดิ์ บัวสุดตา รหัส 46050461
	นายสุวัฒน์ บุญจารุเนตร รหัส 46050493
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.สุขใจ ชูจันทร์
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์	
กรรมการ	ผศ.ลินจง สุขลำภู	
กรรมการ	รศ.สุขใจ ชูจันทร์	

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ	การศึกษาสภาวะของพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863
นักศึกษา	นายเชิดศักดิ์ ณ วิเชียร นายเทิดศักดิ์ บัวสุดตา นายสุวัฒน์ บุญจารุเนตร
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

การผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยการศึกษาพีเอชต่างๆดังนี้ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 จากนั้นได้มีการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ อุณหภูมิห้อง, 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากการศึกษาสภาวะทั้งหมดพบว่าที่พีเอช 6.5 และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสม และสามารถให้ผลผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงที่สุด ซึ่งได้ปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 25.19 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเท่ากับ 0.262 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.806 กรัมต่อกรัมซับสเตรท ณ เวลาในการหมักที่ 96 ชั่วโมง การเปรียบเทียบผลของการผลิตกรดแลคติกระหว่างฟลาสก์ 2 ลิตร ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าฟลาสก์ 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลคติกสูงกว่าในฟลาสก์ 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต และเมื่อทำการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในถังหมัก 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่า ถังหมักขนาด 2 ลิตรสามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 15.27 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเท่ากับ 0.159 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีผลได้ผลผลิตเท่ากับ 0.719 กรัมต่อกรัมซับสเตรท ณ เวลาในการหมักที่ 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Effect of pH and Temperature on Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei* ATCC 10863
Name	Therdsak Buasudta Cherdsak Nawichian Suwat Boonjarunet
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Sukjai Choojun

ABSTRACT

Lactic acid producing by *Lactobacillus casei* ATCC 10863 which analyzed the quantity of lactic acid by HPLC machine. Study on effect of pH to lactic acid production that specific to optimize the growing of lactic acid by varies pH as 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0 . Study on the temperature in the incubation time which effected to the growing of Lactobacillus casei ATCC 10863 by varies Temperature as 30, 35, 37, and 40 °C. The experiment found that pH 6.5 and 37°C suitable high quantity of lactic acid that can produce lactic acid in the maximum quantity is 25.19 g/L, productivity rate is 0.262 ghr^{-1}/L and yield of lactic acid is 0.806 g/g substrate at the 96 hr. of fermentation. Compare the result of lactic acid production between flask 2 L one calciumcarbonate ($CaCO_3$) were added the other is not found that flask 2 L were added calciumcarbonate had more proficiency than flask 2 L were not added calciumcarbonate. Study on lactic acid production in Fermenter tank 2 L were added calciumcarbonate found that Fermenter tank 2 L produced lactic acid 15.276 g/L, productivity rate is 0.159 ghr^{-1}/L and yield is 0.719 g/g substrate at the 96 hr of fermentation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้นเนื่องจากได้รับความสนับสนุน ความช่วยเหลือ ความร่วมมือ กำลังใจ ตลอดจนคำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อผู้จัดทำ คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ ที่ให้คำปรึกษา และแนวทางการปฏิบัติ และข้อเสนอแนะต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงงานนี้ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานทำให้โครงงานนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ ประธานกรรมการ และผศ. ลินจง สุขลำภู กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติๆที่คอยให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษเสมอมา ขอขอบพระคุณพี่ๆเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อใช้ในการทำโครงงานพิเศษ แม่บ้าน รวมถึงพี่ปริญญาโท เพื่อนๆ และน้องๆทุกท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้จัดทำใคร่ขอถือโอกาสนี้ขอบพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนาม และไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย หากโครงงานพิเศษนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่อง ผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณความดีที่ปรากฏในโครงงานพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นคุณความดีของผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นายเชิดศักดิ์ ณ วิเชียร
นายเทิดศักดิ์ บัวสุดตา
นายสุวัฒน์ บุญจารุเนตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงาน.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ.....1

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....3

2.1 คุณสมบัติของกรดแลคติก.....3

2.2 ความสำคัญของกรดแลคติก.....5

2.3 กระบวนการผลิตกรดแลคติก.....7

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตกรดแลคติก.....9

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก.....17

2.6 การใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....21

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....24

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ.....24

3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน.....25

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์.....29

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863.....29
ที่สภาวะต่างๆ

4.2 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863.....32

4.3 การศึกษาการเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ.....38
Lactobacillus casei ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร
ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และการศึกษาการ
ผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและเสนอแนะ.....44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

เอกสารอ้างอิง.....46

ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ.....49

ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส วิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dobis, 1956).....51

ภาคผนวก ค. วิธีวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง.....53

ภาคผนวก ง. การใช้เครื่อง HPLC.....54

ภาคผนวก จ. ข้อมูลการทดลอง.....61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกรดแลคติก.....4

2.2 ลักษณะความแตกต่างของ *Lactobacill* sp.....12

4.1 แสดงผลการทดลอง พีเอชของอาหาร น้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ.....34
ปริมาณน้ำตาลกลูโคสใช้ ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต
และผลได้ของผลผลิตของกระบวนการหมัก เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชต่างๆ

4.2 แสดงผลการทดลอง พีเอชของอาหาร น้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ.....37
ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้.ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต
และผลได้ของผลผลิตของกระบวนการหมัก เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิการบ่มต่างๆ

4.3 แสดงผลการทดลองพีเอชของอาหารน้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้.....41
ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลิตเมื่อเปรียบเทียบ
กระบวนการหมักแบบ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

4.4 แสดงผลการทดลองพีเอชของอาหารน้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้.....43
ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลผลิตของ
ถังหมักขนาด2ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

1 การเจือจางสารละลายกลูโคส ที่ระดับความเจือจางต่างๆ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน.....51

2 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่พีเอช5.0.....62

3 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกที่พีเอช 5.5.....62

4 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกที่พีเอช 6.0.....63

5 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกที่พีเอช 6.5.....63

6 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกที่พีเอช 7.0.....64

7 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่อุณหภูมิห้อง.....64

8 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....65

9 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....65

10 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

11 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....66

12 ผลของฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก.....67

13 ผลของฟลาสก์ขนาด2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก.....68

14 ผลของถังหมักขนาด2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก.....68

15 การวิเคราะห์ ANOVAและ Duncan เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสม.....69
ของกรดแลคติก

16 การวิเคราะห์ ANOVA และ Duncan เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสม.....70
ที่มีต่อน้ำหนักแห้ง

17 การวิเคราะห์ ANOVA และ Duncan เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมที่มีต่อปริมาณ.....71
น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป

18 การวิเคราะห์ ANOVA และ Duncan เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมที่มีต่อ.....72
อัตราการผลิตกรดแลคติก

19 การวิเคราะห์ ANOVA และ Duncan เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมที่มีต่อ.....73
ผลได้ของผลผลิตกรดแลคติก

20 การวิเคราะห์ ANOVA และ Duncan เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม.....74
ที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก

21 การวิเคราะห์ ANOVA และ Duncan เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม.....75
ที่มีต่อน้ำหนักแห้ง

22 การวิเคราะห์ ANOVA และ Duncan เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม.....76
ที่มีต่อน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป

23 การวิเคราะห์ ANOVA และ Duncan เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม.....77
ที่มีต่ออัตราการผลิตกรดแลคติก

24 การวิเคราะห์ ANOVA และ Duncan เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม.....78
ที่มีต่อผลได้ของผลผลิตกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ **หน้า**

2.1 สูตรโครงสร้างของกรดแลคติก....3
2.2 กลไกลการเกิดกรดแลคติกด้วยวิถีไกลโคไลซิส....10
2.3 กลไกลการเกิดกรดแลคติกแอซิกกลุ่ม Heterofermentative....11
2.4 วิถี Ebden- Meyerhof- Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลคติกของกลุ่ม....12
Obligately homofermentative lactobacilli
2.5 วิถี Ebden – Meyerhof - Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลคติกของ....14
กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli
2.6 วิถีฟอสโฟกลูโคเนต....15
2.7 รูป*Lactobacillus casei* ขนาด 2 ไมครอน โดยกล้องจุลทรรศน์ส่องผ่าน....16
4.1 ผลของพีเอชต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่อุณหภูมิ....29
37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า
4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปของเชื้อ*Lactobacilluscasei*ATCC 10863....30
ที่พีเอชต่างๆ หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
ไม่มีการเขย่า
4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863....31
หมักที่พีเอช 6.5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า
4.4 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่างๆ 31
ของเชื้อ*Lactobacillus casei* ATCC 10863 หมักที่พีเอช 6.5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
ไม่มีการเขย่า
4.5 แสดงปริมาณผลผลิตกรดแลคติกที่พีเอชต่างๆของเชื้อ*Lactobacilluscasei*ATCC 10863....32
ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า
4.6 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ*Lactobacilluscasei*ATCC 10863 การเปลี่ยนแปลง....33
ของพีเอช กับปริมาณผลผลิตกรดแลคติก เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชที่ค่าพีเอช 6.5
ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า
4.7 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อ*Lactobacillus casei*....33
ATCC 10863 หมักที่ 37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.8 แสดงปริมาณผลผลิตกรดแลคติกที่อุณหภูมิต่างๆของเชื้อ*Lactobacillus casei*.....35
ATCC 10863 ทำการหมักที่พีเอช 6.5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

4.9 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อ*Lactobacillus casei*.....36
ATCC 10863 เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชที่อุณหภูมิต่างๆ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
ไม่มีการเขย่า

4.10 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ*Lactobacillus casei* ATCC 10863.....36
การเปลี่ยนแปลงของพีเอช กับปริมาณ ผลผลิตกรดแลคติค เมื่อทำการศึกษา
ผลของอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทำการหมักที่พีเอช6.5
ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

4.11 ปริมาณผลผลิตกรดแลคติกที่ผลิตได้โดยเชื้อ*Lactobacilluscasei*ATCC 10863.....39
ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ในระดับ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติม
แคลเซียมคาร์บอเนต ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ไม่มีการเขย่า

4.12 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมักของอาหารสังเคราะห์ใน.....40
ระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต
สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร
ไม่มีการเขย่า

4.13 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปในการเจริญเติบโตของเชื้อ*Lactobacillus casei*.....40
ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติม
แคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5
ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

4.14 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863.....42
การเปลี่ยนแปลงของพีเอช กับปริมาณผลผลิตกรดแลคติก เมื่อทำการศึกษา
ผลของอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักที่พีเอช 6.5 ในถังหมัก
แบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

1 กราฟมาตรฐานกลูโคส.....51

2 แสดงพีคของกรดมาตรฐานแลคติก ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.....61

3 แสดงกราฟมาตรฐานกรดแลคติกเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.....61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงาน

กรดแลคติกเป็นสารเคมีที่มีประโยชน์เป็นอย่างมาก และมีการผลิตกรดแลคติกเป็นจำนวนมากในแต่ละปี กรดแลคติกเป็นอินทรีย์กรดที่พบมากในธรรมชาติ และมีการใช้ในอาหาร จะต่างกับกรดอื่นๆ คือมีลักษณะหนืดและเป็นของเหลวที่ไม่มีกลิ่น สำหรับ food – grade D, L- lactic acid ที่ขายทั่วไปจะเป็นสารละลายที่ไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะตัวและมีความเข้มข้น ร้อยละ 50 และ ร้อยละ 80 กรดแลคติก เป็นกรดอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ช่วยเพิ่มรสชาติและช่วยป้องกัน การเสื่อมในอาหารหมักดองและในผลิตภัณฑ์นม โดยทั่วไปสามารถพบกรดแลคติกในร่างกายของคน สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ได้ตามธรรมชาติ

กรดแลคติกสามารถผลิตได้ทั้งขบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตกรดแลคติกโดยใช้วิธีทางเคมีเป็นวิธีที่ใช้ค่าใช้จ่ายสูง และมีกระบวนการทำให้กรดบริสุทธิ์นั้นมีความยุ่งยากซับซ้อน ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการผลิตกรดแลคติกทางชีวภาพ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นไม่มีความเป็นพิษ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถใช้กับอุตสาหกรรมอาหารได้ นิยมใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร ส่วนกระบวนการทางชีวภาพสามารถผลิตกรดแลคติกโดยใช้โฮโมแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เนื่องจากการผลิตกรดแลคติกสามารถใช้สารตั้งต้นร่วมกับโฮโมแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้หลายชนิด จึงได้มีการศึกษาหาวิธีที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณมากและเสียค่าใช้จ่ายในการลงทุนที่ต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะและองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมเป็นต้น การทดลองนี้เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการคิดค้นสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่สภาวะของพีเอช, อุณหภูมิต่างๆ

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

- ศึกษาสภาวะพีเอชที่เหมาะสมในผลิตกรดแลคติก
- ศึกษาสภาวะ อุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก

1.2.3 ศึกษาการเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ศึกษาสภาวะ อุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก

1.2.3 ศึกษาการเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากอาหารสังเคราะห์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกได้แก่ พีเอช และอุณหภูมิ ในการเพิ่มผลผลิตกรดแลคติก และศึกษาการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์ และในถังหมักขนาด 2 ลิตร และวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของเซลล์ กรดแลคติก ก่อนและหลังทำการหมัก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการทางชีวภาพจาก เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ได้

1.4.2 ทราบถึงสภาวะพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

1.4.3 เป็นแนวทางการศึกษาของการผลิตกรดแลคติก เพื่อประยุกต์ไปสู่การผลิตทางด้านอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

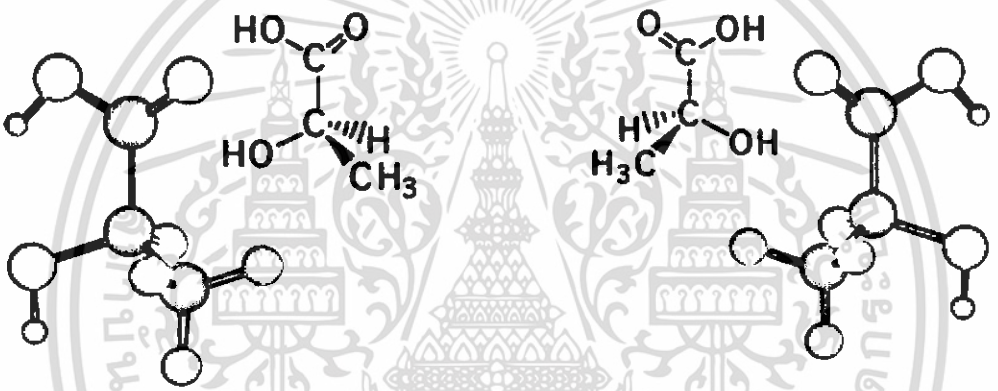
2.1 คุณสมบัติของกรดแลคติก

2.1.1 ชื่อสาร : กรดแลคติก (Lactic acid)

2.1.2 ชื่อพ้องอื่นๆ : กรดไฮดรอกซีโพรพาโนอิค (2-Hydroxypropanoic acid)

2.1.3 สูตรโมเลกุล : $C_3H_6O_3$

2.1.4 สูตรโครงสร้าง



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

รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของกรดแลคติก

ที่มา : www.chemistry.bd.psu

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 คุณสมบัติทางกายภาพ และทางเคมี

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของกรดแลคติก

คุณสมบัติทางกายภาพ และทางเคมี	กรดแลคติก
สถานะ	ของเหลว ผลึกของแข็ง
สี	ใสหรือเหลืองอ่อน
จุดเดือด	122 °C ที่ความดัน 14 mm.Hg
ค่าคงที่ของการแตกตัว (Ka ที่อุณหภูมิ 25°C)	1.37×10^{-4}
ค่าความร้อนของการเผาไหม้	1361 KJ/mole
ค่าความร้อนจำเพาะ	190 J/mole/C
น้ำหนักโมเลกุล	90.08
จุดหลอมเหลว	16.8 °C
ความถ่วงจำเพาะ	1.2
กลิ่น	ฉุน
การละลาย	ละลายได้
สารที่เข้ากันไม่ได้	กรดไฮโดรฟลูออริก หรือกรดกัดแก้ว กรดไนตริก สารออกซิไดซ์ ไอโดไดด์
สภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง	ความร้อน สารที่เข้ากันไม่ได้
สารเคมีอันตรายที่เกิดจากการสลายตัว	คาร์บอนไดออกไซด์และคาร์บอนมอนนอกไซด์
สารนี้เป็นสารไวไฟ	เกิดการเผาไหม้เมื่อได้รับความร้อนจากเปลวไฟ
อันตรายจากการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์	ไม่เกิดขึ้น
ความคงตัวทางเคมี	สารนี้มีความเสถียรภายใต้สภาวะปกติของการใช้และการเก็บ
ความสามารถในการละลายน้ำที่(กรัม/100 มล.)	ละลายได้
ความถ่วงจำเพาะ (น้ำ=1)	1.2

ที่มา : www.msds.pcd.go.th/searchName.aspvID=742

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ความสำคัญของกรดแลคติก

2.2.1 การใช้ประโยชน์จากกรดแลคติก

กรดแลคติกหรือกรดนมเป็นกรดอินทรีย์ที่มีการนำมาให้ในอาหาร พบตามธรรมชาติในนมเปรี้ยว ผักดองชนิดต่างๆ เนยแข็ง เป็นต้น (Gardner; 1972) กรดแลคติกได้มีการค้นพบครั้งแรกโดย Scheele นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดนในปี ค.ศ 1780 ในนมเปรี้ยว และได้ตั้งชื่อว่า Mjolksyra เป็นกรดชนิดแรกๆ ที่นิยมใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร มีความจำเป็นต่อวงการอุตสาหกรรมมาก เพราะ กรดแลคติกที่เติมลงไปในอาหารนั้นจะเป็นตัวช่วยเพิ่มกลิ่นและรสของอาหาร ช่วยควบคุมความเป็นกรดด่าง ยืดอายุการเก็บของอาหาร ช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์และการงอกของสปอร์ ช่วยเสริมประสิทธิภาพการป้องกันการหืนและช่วยปรับปรุงลักษณะเนื้อของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เป็นต้น (ศิวาพร, 2546) กรดแลคติกยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทำพลาสติกในรูปของพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Fitzpatrick, 2003)

สำหรับแคลเซียมแลคเตต มีการใช้ในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพ็กติน ทำให้ผักและผลไม้มีความคงตัวมากขึ้น ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสีและกลิ่นรสของผักและผลไม้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป โดยการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะที่ปนเปื้อนมา ช่วยทำให้เกิดเจลดีขึ้นในผลิตภัณฑ์ขนม ช่วยปรับปรุงคุณภาพนมผง นมข้น (Hansen,1951) และสำหรับแคลเซียมแลคเตตนี้นอกจากจะใช้เพื่อวัตถุประสงค์ที่กล่าวข้างต้นยังใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมสำหรับผู้ป่วยที่ขาดแคลเซียมด้วย โดยอาจเสริมในนม หรือน้ำผลไม้หรืออาหารอื่น หรือจะบริโภคในรูปแคลเซียมแลคเตตเลย โดยอาจจะเสริมด้วยเฟอรัสแลคเตต (ferrous lactate) ซิงค์แลคเตต (Zinc lactate) และแมกนีเซียมแลคเตต(Magnesium lactate) สำหรับในผลิตภัณฑ์ปลาเนื้อและสัตว์ปีก มีการใช้แลคติกหรือเกลือแลคเตตช่วยในการยืดอายุการเก็บด้วย (Dailey และคณะ,2000)

อนุพันธ์ของกรดแลคติก เช่น แลคทีเลตโมโนและไดกลีเซอไรด์ของกรดไขมัน (lactylated mono-and diglyceride of fatty acid) มีการนิยมใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ โดยเฉพาะแป้งเค้กสำเร็จรูปและเนยขาว เป็นต้น ส่วนแคลเซียมสเตียริล-2-แลคทีเลต (Calcium stearyl-2-lactaylate) นิยมใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมปัง (FDA,1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2การนำกรดแลกติกมาประยุกต์ใช้

Lactic acid
($CH_3CHOHCOOH$)

Cosmetic industry

- Skin-lightening agents
- Skin-rejuvenating agents
- pH regulators
- anti-acne agents
- humectant
- anti-tartar agent

Food industry

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

Pharmaceutical industry

- Dialysis solution
- Mineral preparation
- Tabletting
- Prosheses
- Surgical sututes
- Controlled drug delivery system
- Parenteral/I V solution

Chemical industry

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

Chemical feedstock

- Propylene oxide
- Acetaldehyde
- Acrylic acid
- Propanoic acid
- 2,3-pentanedione
- Ethyl lactate
- Dilalactide
- Pol

ที่มา : ดัดแปลงจาก Wee และคณะ(2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 กระบวนการผลิตกรดแลคติก

2.3.1 การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางเคมี แบ่งได้ 4 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 นำ hydrogen cyanide ทำปฏิกิริยากับ acetaldehyde ได้ lactonitrile ทำปฏิกิริยาที่ความดันบรรยากาศ ดังสมการที่ 1

$$CH_3CHO + HCN \longrightarrow CH_3CHOHCN \quad \text{.....(1)}$$

Acetaldehyde hydrogen cyanide lactonitrile

ขั้นตอนที่ 2 นำ lactonitrile มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟูริกจะได้ กรดแลคติกและเกลือแอมโมเนียมซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง ดังสมการที่ 2

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

Lactonitrile sulphuric acid lactic acid ammonium salt

ขั้นตอนที่ 3 นำกรดแลคติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ คือเมทิลแลคเตต นำเมทิลแลคเตตมากลั่นและย่อยจะได้กรดแลคติก ส่วนเมทานอล hydrogen cyanide และสารปนเปื้อนอื่นๆ จะถูกกำจัดออกโดยนำมาผ่านถ่านกัมมันต์ และการทำ ionexchange ดังสมการที่ 3 และ 4

$$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOCOOCH_3 + H_2O \quad \text{.....(3)}$$

lactic acid methanol methyl lactate

$$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \quad \text{.....(4)}$$

methyl lactate lactic acid methanol

2.3.2 การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกมี 2 ชนิด คือ โฮโมแลคติกแบคทีเรียและเฮเทอโรแลคติกแบคทีเรีย ซึ่งขั้นตอนในการผลิตแลคติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงดังสมการที่ 5 และ 6

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CHOCOOH \quad \text{.....(5)}$$

Glucose lactic acid

สมการที่ 5 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติกของโฮโมแลคติกแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + C_2H_5OH + CO_2$ .....(6)

Glucose lactic acid ethanol carbon dioxide

สมการที่ 6 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติกของเฮเทอโรแลคติกแบคทีเรีย

นอกจากนี้กรดแลคติกยังสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดอื่น ฟังไจ และยีสต์ซึ่งสามารถหมักได้แบบกะ กึ่งกะและแบบต่อเนื่อง ปัจจัยที่สำคัญในการผลิตคือ แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ พีเอช อุณหภูมิ อากาศ (Anders และ Mikael, 2002)

Roukas และKotzckidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus lactis* พบว่าการหมักแบบกะโดยเลี้ยงเซลล์แบบอิสระ *Lactobacillus casei* ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 30กรัมต่อลิตร *Lactobacillus lactis*ให้ปริมาณกรด 25 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงแบบเซลล์ผสมปริมาณกรดแลคติกจะสูงถึง 45 กรัมต่อลิตร

Paul และ Fitzpatrick (2002) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมและมีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งไนโตรเจนสังเคราะห์ที่มีราคาแพง โดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัดและสารสกัดจากมอลต์ลงไป แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตมอลต์เปรียบเทียบกับยีสต์สกัด โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้ให้ผลผลิตเทียบเท่ากับยีสต์สกัด แต่มีข้อเสียคือเมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิต ผลผลิตที่ได้จะไม่มีความบริสุทธิ์และต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการที่ทำให้ผลผลิตมีความบริสุทธิ์

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส กาแลคโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์ และแป้ง โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะสูงเมื่อใช้กลูโคส ฟรุกโตส และมอลโตสเป็สารตั้งต้น

Bulut และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ได้แก่ ซูโครส กลูโคส โมลาส ฝักถั่วและรำสาลี โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะสูงขึ้นเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น

Wee และคณะ(2004) ได้นำโมลาสซึ่งมีซูโครสเป็นองค์ประกอบมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาเป็นสารตั้งต้นนำการผลิตกรดแลคติก *Enterococcus faecalis* พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกได้สูงถึง 95.7 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 94.9

Huang และคณะ(2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตกรดแลคติกในปริมาณสูงประมาณ 0.85-0.92 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น

Oh และคณะ(2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลีและข้าวโพด โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จะสูงเท่าๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตกรดแลคติก

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก เรียกว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ความหมายของแลคติกแอซิดแบคทีเรียหมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกและมีความสามารถในการหมักนมให้เกิดตะกอนได้ นอกจากนี้ยังรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย ต่อมาได้พบว่าแบคที่เรียแบคทีเรียแลคติกมีเพียงแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น จึงได้มีการแยกกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มออก จากนั้นได้ให้ความหมายของแบคทีเรียแลคติกว่า ต้องเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะสำคัญ คือ ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างสปอร์มีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดแลคติก มีรูปร่างเป็นทรงกลม และแท่ง

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งยาว บางครั้งพบเป็นแท่งโค้ง ถ้าเป็นแท่งสั้นมักเป็น coryneform coccobacilli บางที่ต่อกันเป็นสายโซ่บางครั้งเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สามารถย้อมติดสีแกรมบวกเป็นพวกเฟอร์เมนเททีฟแบคทีเรีย ที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วผลิตกรดแลคติก แต่จะมีผลพลอยได้จากการหมัก คือ อะซิเตต เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ ฟอร์เมตหรือซัคซิเนต แบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่สภาพที่มีอากาศเล็กน้อย ไม่มีการรีดิวซ์ไนเตรต ไม่สลายเจลาตินและเคซีน ไม่สร้างอินโดล และไฮโดรเจนซัลไฟด์ รวมทั้งไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส แต่จะมีบางสายพันธุ์ที่สามารถสลายเปอร์ออกไซด์ ได้ด้วยเอนไซม์ซูโดคะตาเลส และปฏิกิริยาต่อเบนซิลีน นั้นจะให้ผลลบ บางเชื้อสามารถสร้างรงควัตถุสีเหลือง ส้ม สนิมเหล็กหรือสีแดงอิฐ เป็นพวกที่ต้องการอาหารซับซ้อน ทั้งกรดอะมิโนเปปไทด์ อนุพันธุ์กรดนิวคลีอิก วิตามิน เกลือแร่ กรดไขมันหรือ เอสเทอร์ของกรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีความจำเพาะต่อความต้องการอาหารที่แตกต่างกัน สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 2 - 53 องศาเซลเซียส แต่การเจริญเติบโตได้ดีและเหมาะสมที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 5.5- 6.5 แต่สามารถเจริญได้ดีที่พีเอชประมาณ 5.0 หรือต่ำกว่านี้ได้ อัตราการเจริญจะลดลงที่สภาวะเป็นกลางหรือด่าง ในปี 1991 Orla-Jensen เป็นผู้เริ่มจัดอนุกรมวิธานแลคติกแอซิดแบคทีเรียอย่างเป็นระบบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสแบ่งได้ 2 ชนิด ดังนี้

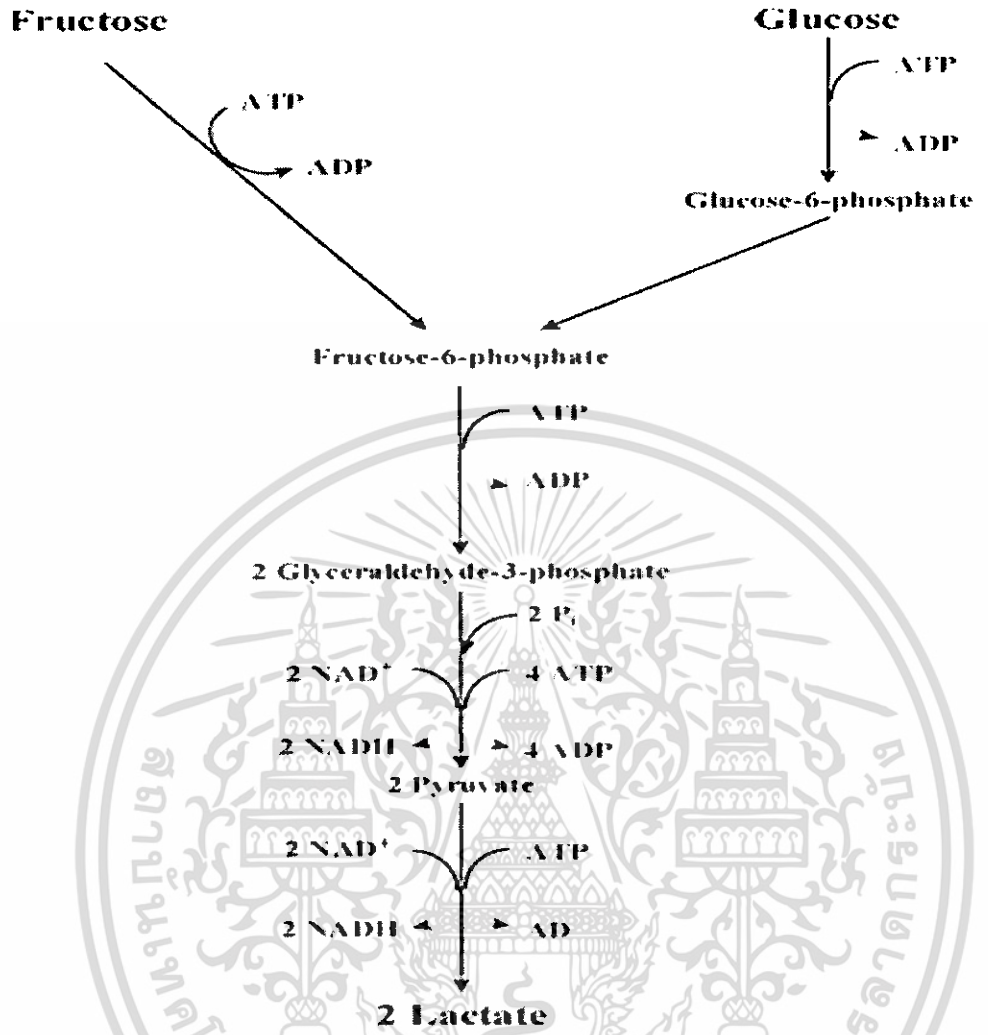
โฮโมแลคติกเฟอร์เมนเตชั่น (Homolactic fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (homofermentative) ดังสมการที่ 7 โดยกลไกการเกิดกรดแลคติกคือการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูวิกแอซิด (pyruvic acid) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ด้วยวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) แล้วเปลี่ยนไพรูวิกแอซิดเป็นแลคติกแอซิด ดังรูปที่ 2-2

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH$ .....(7)

Glucose lactic acid

ที่มา : Muller,2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 กลไกลการเกิดกรดแลคติกด้วยวิถีไกลโคไลซิส

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

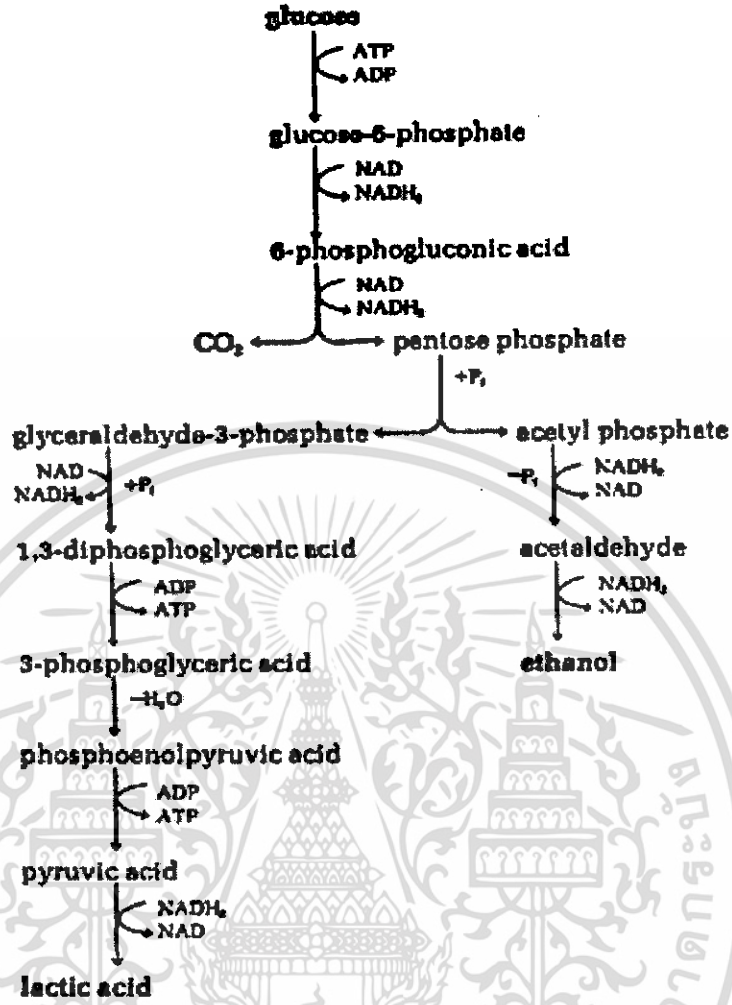
เฮทเทอโรแลคติกเฟอร์เมนเตชั่น (Heterolactic fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลคติก เอทธานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือกรดอะซิติก โดยกระบวนการหมักได้จากกลุ่ม เฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (heterofermentative) ดังสมการที่ 8 และกลไกการเกิดกรดแลคติกดังรูปที่ 2-3

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + C_2H_5OH + CO_2$.....(8)

Glucose — lactic acid — ethanol — carbon dioxide

ที่มา : Muller,2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 กลไกลการเกิดกรดแลคติกแอซิดกลุ่ม Heterofermentative

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

แลคโตบาซิลัส (*Lactobacillus sp.*) เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุดมีความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์ คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ภายในสูงระหว่าง 32-53 เปอร์เซ็นต์ (Bd,Tm) สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 2-53 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีและเหมาะสมที่ 30-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5.5-6.2 หรืออาจเจริญได้ที่ พีเอช 5.0 หรือต่ำกว่านี้ได้ (Sneath และคณะ,1984) *Lactobacillus* sp. จัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Stiles และ Holzapfel,1997) ดังนี้คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Obligately homofermentative

Facultatively heterofermentative

Obligately heterofermentative

ลักษณะความแตกต่างของแต่ละกลุ่ม แสดงดังตารางที่ 2-2

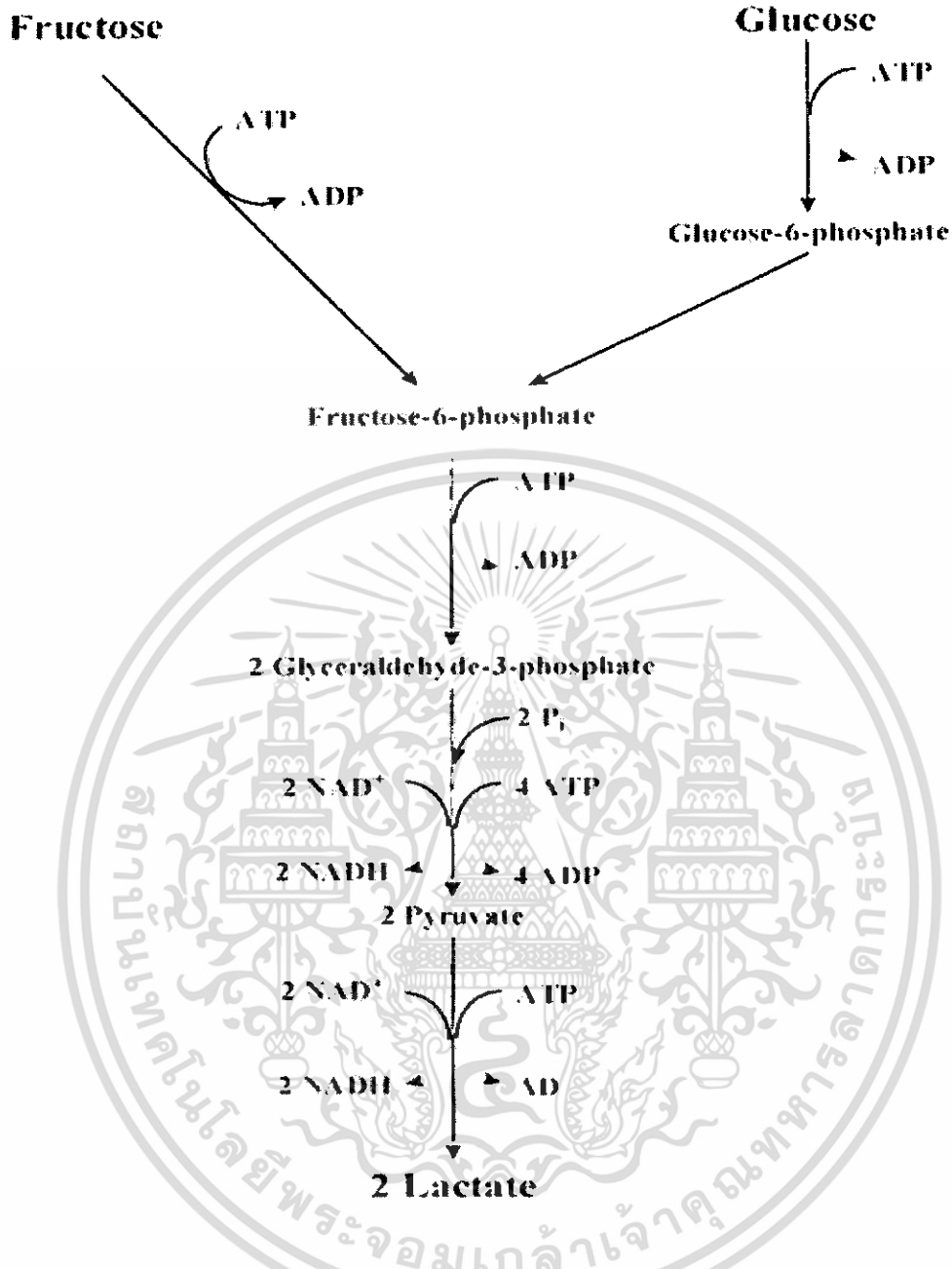
ตารางที่ 2.2 ลักษณะความแตกต่างของ *Lactobacillus* sp.

ลักษณะ	กลุ่ม I, Obligately homofermentative	กลุ่ม II, Facultatively herterofermentative	กลุ่ม III, Obligately heterofermentative
การหมักน้ำตาลเพนโตส	-	+	+
การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส	-	-	+
การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคเนต	-	+	+
เอนไซม์ FDP aldolase	+	+	+
เอนไซม์ Phosphoketolase	-	+	+
	Lb.acidophilus	*Lb.casei*	*Lb.brevis*
	Lb.delbruckii	*Lb.curvatus*	*Lb.buchneri*
	Lb.helveticus	*Lb.plantarum*	*Lb.fermentum*
	Lb.salivarius	*Lb.sakei*	*Lb.reuteri*

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติก โดยวิธี Embden- Meyerhof- Parnas (EMP) ดังรูปที่ 2-4 จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ Fructose-1,6-bisphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase ดังนั้นจึงไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโตสและกลูโคเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

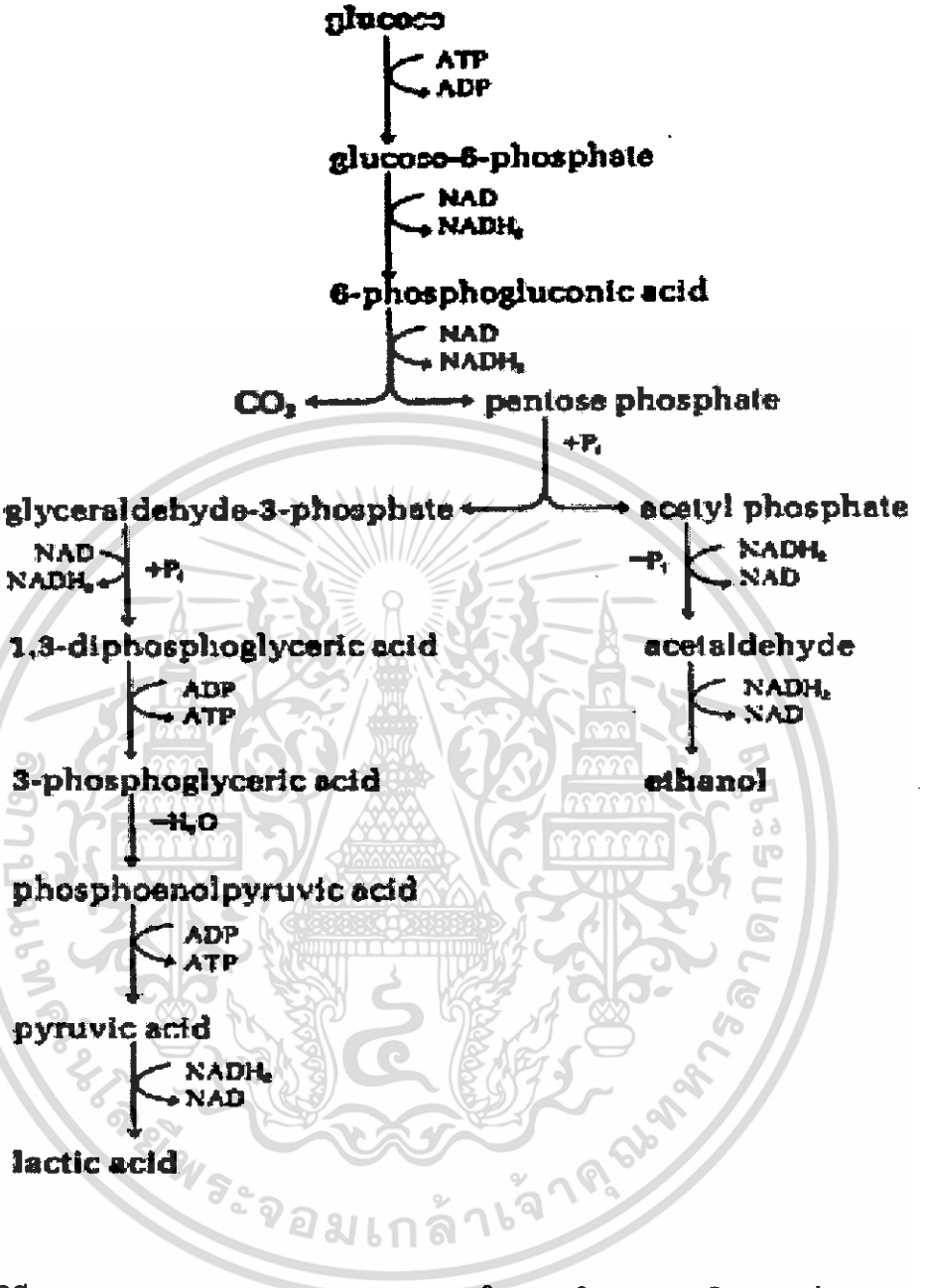


รูปที่ 2.4 วิถี Embden- Meyerhof- Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลคติกของกลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden – Meyerhof - Parnas (EMP) ดังรูปที่ 2-5 จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase ดังนั้นจึงสามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

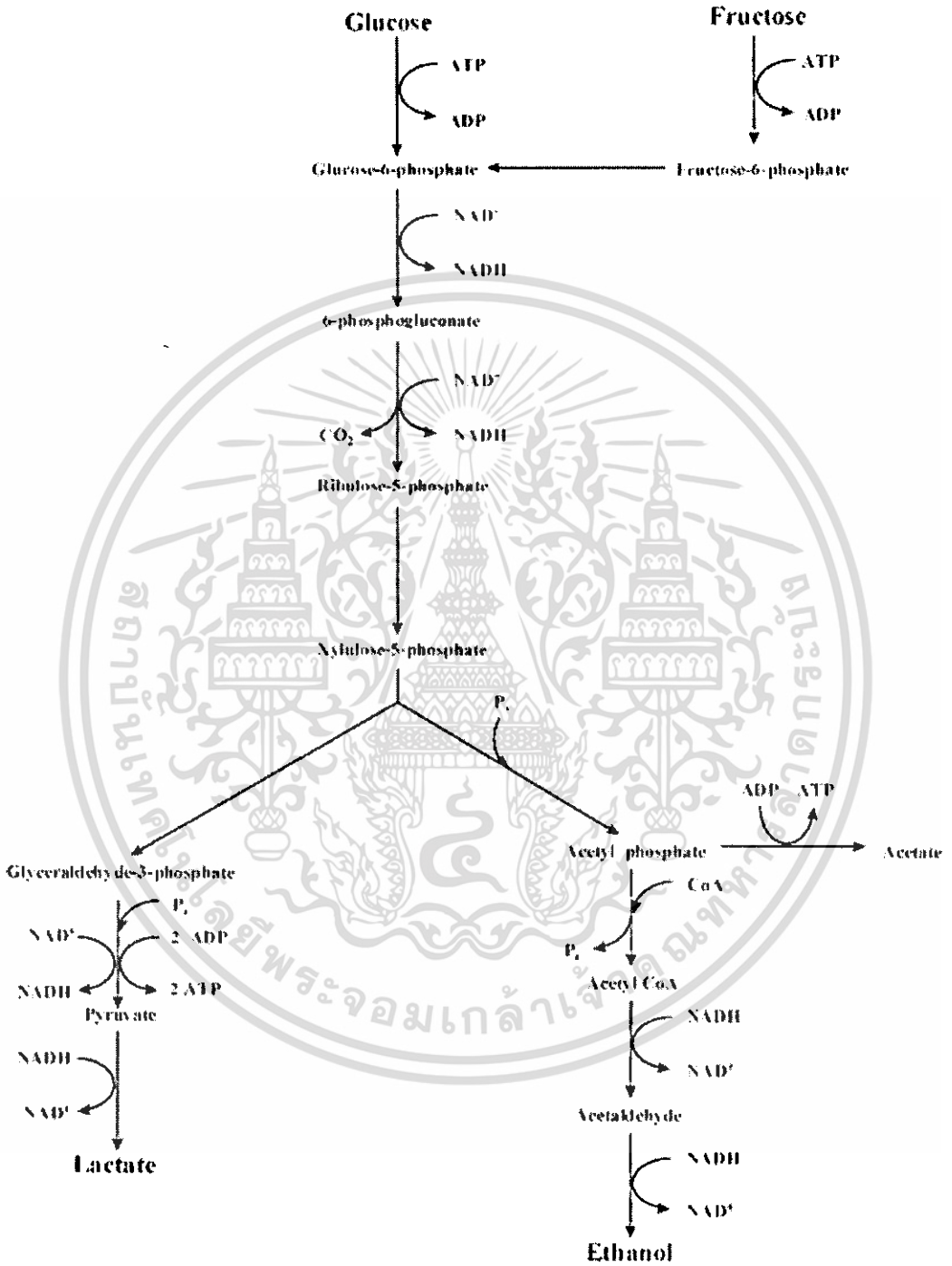


รูปที่ 2.5 วิถี Embden – Meyerhof - Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลคติกของกลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli

ที่มา : www.brighton73.freeserve.co.uk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม Obligately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโตส ผ่านทางวิถีฟอสโฟกลูโคเนต ดังรูปที่ 2-6 เป็นแลคเตต เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์

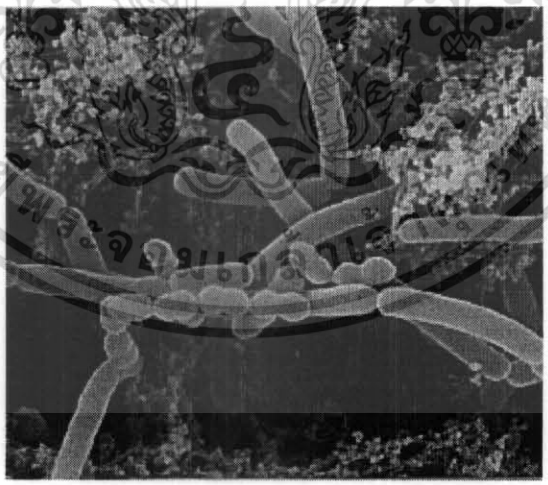


รูปที่ 2.6 วิถีฟอสโฟกลูโคเนต

ที่มา : www.brighton73.freeseve.co.uk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactobacillus casei เป็น facultatively anaerobic จัดอยู่ในกลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้และไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นท่อน(Sneath และคณะ,1984) ดังรูปที่ 2.13 แบคทีเรียแลคติกมีความสำคัญในอุตสาหกรรม พบในน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากพืชและในบริเวณลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ทั่วไป *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ชิโรต้าเป็นสายพันธุ์หลักในการผลิตนม นอกจากนี้ได้มีการนำ *Lactobacillus casei* ไปใช้ในงานวิจัยและอุตสาหกรรมต่างๆอีกมากมาย ดังนี้ ลัญจกร และคณะ (2548) ได้ศึกษาการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิตแบคทีริโอซินจาก *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* SN 11 โดยใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารทุกสูตร แต่เจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จรูป(MRS) โดยให้กิจกรรมยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็น 20 AU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่16-24 ซึ่งเป็นช่วง late log phage ถึงระยะ early stationary phase ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลงCW1 (สัดส่วนน้ำนึ่งปลาทูน่า ต่อน้ำมะพร้าวเป็น 1 ต่อ 1) ให้ค่ากิจกรรมยับยั้งเป็น 20 AU/ml ในชั่วโมงที่20 และสูตรอาหารดัดแปลง CW2 (1 ต่อ 2) , CW3 (1 ต่อ 3) และ CW4 (1 ต่อ 4) มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 10 AU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่16 ตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง และพบกิจกรรมการยับยั้งเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยในสูตรอาหารทูน่า2 (สัดส่วนน้ำนึ่งปลาทูน่า ต่อน้ำมะพร้าว เป็น 2 ต่อ 1) และทูน่า3 (3 ต่อ 1) และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใดๆในสูตรอาหารทูน่า4 (4 ต่อ 1)



รูปที่ 2.7 *Lactobacillus casei* ขนาด 2 ไมครอน โดยกล้องจุลทรรศน์ส่องผ่าน

ที่มา : www.lactospore.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก

2.5.1 แหล่งคาร์บอน

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าเมื่อนำเวย์มาเติมกลูโคสลงไป 20 กรัมต่อลิตรร่วมกับยีสต์กัดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร กรดแลคติกที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้น

Yun และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตกรดแลคติก จากเชื้อ *Enterococcus faecalis* RYK 1แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกาแลคโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์และแป้ง พบว่าในน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลมอลโตส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงถึง 18.18, 17.95 และ 16.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลคโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์และแป้งจะให้ปริมาณกรดแลคติก 2.7, 1.26, 2.24, 1.68, 1.83 และ 1.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำ

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ โดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* RYK 1 ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อเซลล์เจริญในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลมอลโตส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณการผลิตจะอยู่ระหว่าง 5.2-6.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กรดแลคติกที่ได้คิดเป็น 0.96 กรัมต่อกรัมแหล่งคาร์บอน การผลิตกรดแลคติกจากกลูโคส ฟรุกโตสและมอลโตส โดย *Enterococcus faecalis* RYK 1 สามารถให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูง

Bulet และคณะ (2004) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส โมลาส ฝักถั่ว และรำข้าวสาลี พบว่าน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียวให้กรดแลคติกในปริมาณที่สูง เช่นเดียวกับที่ใช้น้ำตาลจากฝักถั่วให้ปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 58 กรัมต่อลิตร

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากโมลาสในการผลิตกรดแลคติกโดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าที่ความเป็นกรดด่าง 7.0 ได้ปริมาณกรดแลคติก 95.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94.9

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่า ความเข้มข้นของแป้งที่ 20 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดแลคติก 0.85-0.92 กรัมต่อสารตั้งต้น

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด โดยนำมาย่อยกับเอนไซม์ และจึงนำผลิตกรดแลคติก ด้วยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RYK 1 พบว่า เมื่อใช้ข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลีเป็นสารตั้งต้นจะให้ปริมาณกรดแลคติกมากกว่า 0.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่ออาหารประกอบด้วยแป้งสาลีที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 200 กรัมต่อลิตร แป้งข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72575

แลคติกที่ผลิตได้จะสูงถึง 5.36 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณเซลล์จะสูงถึง 14.08 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้แป้งสาลีเพียงอย่างเดียว

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส แลคโตส กาแลคโตส ไซโลส มอลโตส ที่สามารถให้ปริมาณกรดที่สูง โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด

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

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

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ถั่วเหลืองและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในเวย์และกลูโคสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดีและเหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกได้แก่ ยีสต์สกัด

Kolozik และคณะ (1999) พบว่าเมื่อเติมยีสต์สกัดลงไปในเวย์จะทำให้ชีวมวลและปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นแต่เมื่อไม่เติมยีสต์สกัด การเจริญของเซลล์และปริมาณกรดจะน้อย

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

Nancib และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ยูเรีย corn steep และ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เติมลงในน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีคือ ยีสต์สกัด

Altaf และคณะ(2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วเบงกอล ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และbaker'syeast ที่เติมลงในแป้งซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV6 พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้จะสูงถึงร้อยละ 92

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปทิซอย ยูเรีย เปปโตน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัม พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะสูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด corn steep liquor ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 89 กรัมต่อลิตร

2.5.3 แหล่งแร่ธาตุ

Fitzpatrick และคณะ(2001) ศึกษาอิทธิพลของแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่มีการเติมแมงกานีสในรูป $MnSO_4.H_2O$ ร่วมกับยีสต์สกัดลงไปในเวย์ พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดจะสั้นลงและเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสได้ดี แต่เมื่อไม่มีการเติมแมงกานีสเวลาที่ใช้ในการผลิตจะนานขึ้น และเชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ได้เท่าที่ควร

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันฝรั่งโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่ามีการเติมแร่ธาตุชนิดต่างๆ ได้แก่ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟตและซิงค์ซัลเฟตลงไป เพื่อช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลได้เร็วขึ้น

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปทิซอย ยูเรีย เปปโตน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัม พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะสูงเมื่อมีการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งและเศษอาหารที่เหลือทิ้งจากโรงงานอาหาร โดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* 18011 พบว่า เมื่อเติมแมงกานีสลงไปปริมาณกรดแลคติกจะได้สูงกว่าเมื่อไม่เติมแมงกานีส

2.5.4 อุณหภูมิ

Mostafa (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Idris และ Suzuna (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรด โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาอุณหภูมิที่ระดับ 27 30 37 40 45 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซลเซียส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด

John และคณะ(2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติก

Tanaka และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากรำข้าว โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 พบว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vishnu และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้ง โดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV 6 พบว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุดในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

2.5.5 ความเป็นกรดเป็นด่าง

Fu และ Mathew (1999) ศึกษาอิทธิพลของพีเอช สารตั้งต้นและปริมาณออกซิเจนในการผลิตกรดแลคติก จากน้ำตาลแลคโตส โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมของเชื้อในการผลิตกรดแลคติกอยู่ในช่วง 5-6 และการเลี้ยงแบบ anaerobic จะให้ผลผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่าการเลี้ยงแบบ aerobic 2.3 เท่า

Pauli และ Fitzpatrick (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าในการศึกษามีการควบคุมให้ค่าพีเอชอยู่ที่ 5.4 จึงจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

Wee และคณะ (2004) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากโมลาส โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าพีเอช 6 สามารถให้ปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 96.1 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 96.3

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันฝรั่งโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกอยู่ระหว่าง 6 - 7

Idris และ Suzuna (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสัปปะรดโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 การใช้น้ำตาลจะเร็ว และให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูง

John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติก

2.4.6 การให้อากาศ

Arasaratnam และคณะ (1996) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยการเติมกลูโคส และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ โดยเชื้อ Lactobacillus delbrueckii โดยเลี้ยงในสภาวะนิ่ง (static culture) หรือที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เมื่อใช้กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด

Fu และ Mathew (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลแลคโตส โดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งในการศึกษาได้มีการศึกษาถึงการผลิตกรดแลคติกแบบ anaerobic และ aerobic ที่มีการกวนให้อากาศที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าการเลี้ยงแบบ anaerobic จะให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงกว่าการเลี้ยงแบบ aerobic

Nancib และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ได้มีการให้อากาศ โดยการกวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่า เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญอยู่ในช่วง stationary phase ภายในเวลา 20 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากโมลาสโดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* ในการศึกษามีการควบคุมการให้อากาศโดยการกวนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้สูงถึงร้อยละ 98

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูกโดยเชื้อ *Enterococus faecalis* RKY 1 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกคือมีการให้อากาศโดยมีการกวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที

2.6 การใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือที่นิยมเรียกว่า HPLC เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quatitative analysis) ที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง โดยสามารถใช้กับงานด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่นในการวิเคราะห์ทางอาหาร ยา ยาฆ่าแมลง ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ฯลฯ สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณในระดับไมโครกรัม (μg) ในกรณีทั่วๆไป หรือละเอียดถึงพิโคกรัม (pg) เมื่อเลือกหน่วยตรวจวัดที่เหมาะสม

HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) สูบของเหลวหรือตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile Phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แล้วจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) สัญญาณที่ตรวจวัดได้ซึ่งอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ โดยสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) ประกอบด้วยพีค (peaks) ของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารผสม

2.6.1 ส่วนประกอบที่สำคัญของ HPLC

2.6.1.1 Mobile phase reservoir

- ใช้บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)
- แก้ว / stainless steel
- มีเครื่องกรองฝุ่น/สิ่งสกปรก

2.6.1.2 Degasser

- ขจัดฟองอากาศในสารละลาย

2.6.1.3 Pump

- การแยกสารใน HPLC อาศัยการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน ปั๊มที่ใช้ควรทำให้เกิดความดันได้สูงประมาณ 6000 psi (lbs/in2) และมี flow rate อยู่ในระหว่าง 0.1-10 ml/min

2.6.1.4 Sample injection system

- manual (ใช้ microsyring)
- automatic sampler injector

2.6.1.5 Column

1. Analytical column : ความยาว 10-30 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-10 มม. วัสดุที่ใช้ทำภาชนะบรรจุ เช่น stainless steel ,polyethylene , แก้ว , PEEK , อื่น ๆ Packing material ที่อยู่ภายใน ได้แก่ silica based , resins , gels , bonded phase

2. Guard column : นิยมใช้ต่อก่อนเข้า Analytical column เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของ Analytical column จะทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับตัวทำละลาย ส่วนประกอบของวัสดุบรรจุจะคล้ายคลึงกับ Analytical column แต่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าและราคาไม่แพงมากนัก

2.6.1.6 Detector

เครื่องตรวจวัดสำหรับ HPLC ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่

1. Ultraviolet-Visible detector : อาศัยการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง เช่น Diode array detector

2. Fluorescence detector : ใช้กับสารที่สามารถ fluorescence ได้

3. Refractive index detectors (RI detector) : ใช้วัดปริมาณสารใดก็ได้ที่มีค่าดรรชนีหักเห ต่างจากเฟสเคลื่อนที่

4. Electrochemical detectors : ใช้วัดการสูญเสียหรือได้รับอิเล็คตรอนของสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์

5. Conductivity detectors : ใช้วัดความสามารถในการนำกระแสไฟฟ้า

หลักการแยกของระบบ HPLC

2.6.2 การใช้ HPLC ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ

2.6.2.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative analysis)

ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมาได้ ทำโดยการเปรียบเทียบค่า Retention time (RT) กับสารมาตรฐาน โดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจะต้องทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน เช่น อุณหภูมิ ชนิดของคอลัมน์ ชนิดและอัตราการไหล (flow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

rate) ของเฟสเคลื่อนที่ ถ้าสารตัวอย่างและสารมาตรฐานมีค่า RT เท่ากันเป็นสารเดียวกัน วิเคราะห์เพิ่มเติม โดยเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ และ / หรือ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่

2.6.2.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis)

หลังจาก HPLC แยกสารออกมาเป็นพีค (peak) ต่าง ๆ สามารถวัดปริมาณของสารในแต่ละพีคได้โดย

1.วัดความสูงของพีค (Peak height) เทียบกับความสูงของพีคของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ

2. วัดพื้นที่พีค (peak area) เทียบกับพื้นที่ของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

3.1.1 อุปกรณ์เครื่องมือ

1. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000
2. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ของบริษัท Shimadzu
   รุ่น C-R7 Ao plas
   - 2.1 UV-is detector รุ่น SPDAVF
   - 2.2 ปั๊ม รุ่น LC-10AC VP
   - 2.3 Degasser DGU-12A
3. ถังหมักขนาด 2 ลิตร
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Falcon 6/300
5. เครื่องนึ่งความดันไอ(autoclave) ของบริษัท Hirayama Hiclave รุ่น HV-50
6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200S
7. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZUรุ่น LIBROR EB-40000 H
8. ตู้เย็นอุณหภูมิ -83 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO รุ่น MDF-U 4086S
9. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO
10. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Cyberscanรุ่น EP 2000
11. เครื่องอบลมร้อน ของบริษัท Binder
12. ตู้บ่มปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของบริษัท Shel labรุ่น Model 2020
13. ตู้บ่มปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของบริษัท Memmert รุ่น D06062 Model 600
14. ตู้บ่มปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Binderรุ่น Control E2
15. ตู้เขี่ยเชื้อ(Lamina flow) ของบริษัท ISSCOรุ่น BVT123
16. เครื่องเขย่าของบริษัท Binder
17. ขวดรูปชมพู่ (Erlenneyer flask) ของบริษัท PYREX^{R}
18. หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^{R}
19. กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท PYREX^{R}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 สารเคมี

1. สารสกัดยีสต์ (yeast extract)
2. เปปโตน (peptone)
3. แลคโตส (lactose)
4. อาหารสำเร็จรูป เอ็มอาร์เอส (MRS)
5. วุ้น (agar)
6. น้ำกลั่น
7. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)
8. แมงกานีสซัลเฟส ($MnSO_4$)
9. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไอเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)
10. กรดซัลฟุริก เข้มข้น(conc.$H2SO_4$)
11. สารละลายพีนอล 5 %
12. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส(KH_2PO_4)
13. กรดฟอสฟอริก(H_3PO_4)
14. เมทธานอล
15. โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH)
16. ไฮโดรคลอริก (HCl)

3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

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

3.2.1.1 การเก็บรักษาเชื้อในการวิจัย

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) เขี่ยเชื้อจำนวน 1 เข็ม เขี่ยเชื้อ streak ลงในอาหารแข็ง (MRS agar) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันทับปิดปากหลอดทดลองให้สนิท เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อหรือลงในอาหารใหม่ (Subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

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

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษา มีองค์ประกอบดังนี้

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Peptone)	10	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลกลูโคส(Glucose)	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	1	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต($MgSO_4.7H_2O$)	0.03	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร

นำอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้ว ไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.2.3 การศึกษาสภาวะต่างๆที่ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ 3.2.2

3.2.3.1 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก

เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 (ที่เตรียมจากข้อ 2.1.2) ลงในอาหารที่เตรียมไว้ตามสูตรอาหารในหัวข้อ 3.2.2 ซึ่งได้ทำการปรับพีเอชของอาหารให้เท่ากับ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 โดยปริมาณอาหาร รวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรฟลาสก์ (ปริมาตรอาหาร 190 มล. เติมหัวเชื้อ 10 มล. ลงในฟลาสก์ 250 มล.) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่มีการเขย่า เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชม. ทำการวิเคราะห์ชีวมวลตามวิธี A.O.A.C. (2000) วัดน้ำหนักแห้ง ปริมาณ กรดแลคติก (โดยเครื่อง HPLC) และน้ำตาลกลูโคส ตามวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois, 1965) และทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

3.2.3.2 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก

เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 (ที่เตรียมจากข้อ 2.1.2) ลงในอาหารที่เตรียมไว้ตามสูตรอาหารในหัวข้อ 3.2.2 ปรับพีเอชของอาหารที่เหมาะสมจากการทดลอง 3.2.3.1 โดยปริมาณอาหาร รวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรฟลาสก์ (ปริมาตรอาหาร 190 มล. เติมหัวเชื้อ 10 มล. ลงในฟลาสก์ 250 มล.) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ไม่มีการเขย่า เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชม. ทำการวิเคราะห์ชีวมวลตามวิธี A.O.A.C.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2000) วัดน้ำหนักแห้ง ปริมาณกรดแลคติก (โดยเครื่อง HPLC) และน้ำตาลกลูโคส ตามวิธีฟีนอล- ซัลฟูริก (Dubois, 1965) และทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

3.2.4 การศึกษาการเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

3.2.4.1 สูตรอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium)

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Peptone)	10	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลกลูโคส(Glucose)	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	1	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต($MgSO_4.7H_2O$)	0.03	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต($CaCO_3$)	2	เปอร์เซ็นต์

โดยกำหนดความเร็วรอบที่เหมาะสม คือ สภาวะนิ่ง อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส และพีเอชเหมาะสมคือ 6.5

3.2.4.2 การผลิตกรดแลคติกโดยใช้ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมมาทำการผลิตกรดแลคติก โดยใช้ฟลาสก์ 2 ลิตรเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ร้อยละ 70 เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการบ่มเป็นเวลา 96 ชม. เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชม. ทำการวิเคราะห์ชีวมวลตามวิธี A.O.A.C. (2000) วัดน้ำหนักแห้ง ปริมาณกรดแลคติก (โดยเครื่อง HPLC) และน้ำตาลกลูโคส ตามวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois, 1965) และทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

3.2.4.3 การผลิตกรดแลคติกโดยใช้ถังหมัก 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมมาทำการผลิตกรดแลคติก โดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตรเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ร้อยละ 70 เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ทำการบ่มเป็นเวลา 96 ชม. เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชม. ทำการวิเคราะห์ชีวมวลตามวิธี A.O.A.C. (2000) วัดน้ำหนักแห้ง ปริมาณกรดแลคติก (โดยเครื่อง HPLC) และน้ำตาลกลูโคส ตามวิธีฟีนอล- ซัลฟูริก (Dubois, 1965)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การวิเคราะห์ผล

3.2.5.1 วัดชีวมวลตามวิธี AOAC (2000) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

3.2.5.2 วัดชีวมวลโดยวัดน้ำหนักแห้ง โดยนำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง นำใส่โถดูดความชื้นทิ้งให้เย็นวัดน้ำหนักของมวลชีวมวลที่ได้

3.2.5.3 การวัดกรดแลคติกวัดด้วยเครื่อง HPLC นำน้ำหมักไปกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใช้ Inertsil C8-3 column และใช้ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

3.2.5.4 การวัดปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ลดลง ด้วยวิธีฟีนอล –ซัลฟูริก (Dubois, 1965)

3.2.5.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 12.0 for Window

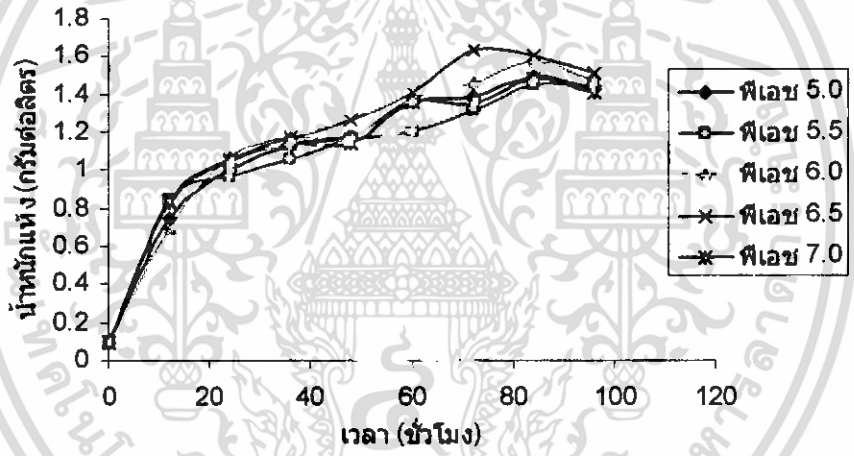
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่สภาวะต่างๆ

4.1.1 ผลของพีเอชต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยใช้อาหารสังเคราะห์ ทำการหมักที่สภาวะนิ่ง เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชต่างๆ พบว่า กราฟการเจริญของเชื้อในแต่ละพีเอชมีค่าใกล้เคียงกัน โดยเมื่อเชื้อมีการเจริญสูงสุด จะมีช่วงที่การเจริญเติบโตสูงสุด (maximum log) ณ ชั่วโมงที่ 61 และมีการเจริญเติบโตไปเรื่อยๆ ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) จนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 96 ดังรูปที่ 4-1

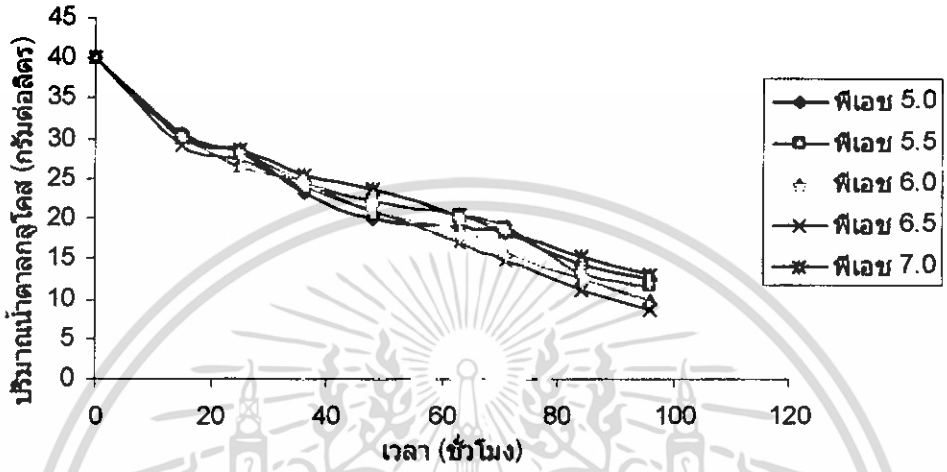


รูปที่ 4.1 ผลของพีเอชต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

ส่วนค่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้เป็นกรดแลคติกนั้น มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก (รูปที่ 4-2) จากกราฟจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งถึงช่วงท้ายของการหมัก แสดงว่า เชื้อมีการนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโตในช่วงแรก ก่อนที่จะทำการสังเคราะห์ออกมาเป็นกรดแลคติก เมื่อทำการทดลองไปจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่า การทดลองที่พีเอช 6.5 นั้น ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 8.75 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 78.13 ของสารตั้งต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Idris และ Suzuna (2006) ที่ได้ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสัปปะรดโดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 การใช้น้ำตาลจะเร็ว และให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติก



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863ที่พีเอชต่างๆ หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

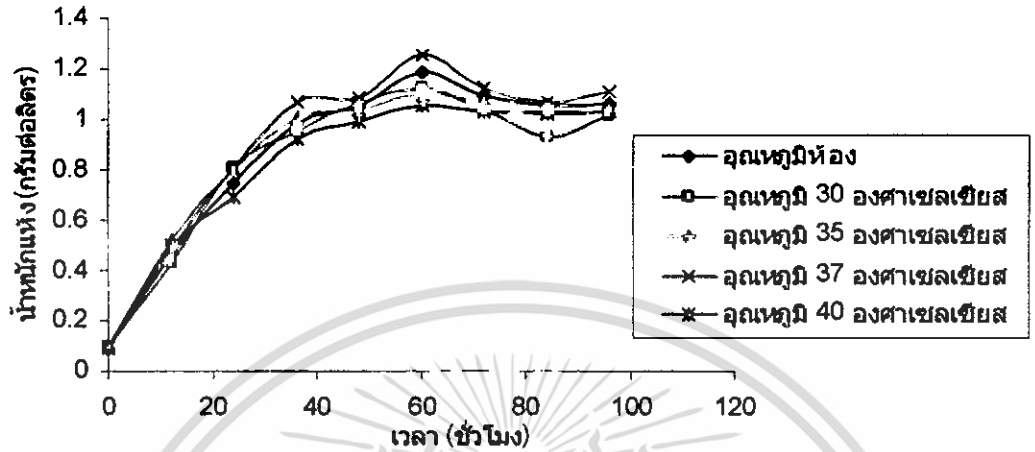
4.1.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิการบ่มต่างๆ พบว่า กราฟการเจริญของเชื้อในแต่ละอุณหภูมินั้นมีค่าใกล้เคียงกัน โดยเชื้อจะมีช่วงการเจริญสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 60 ซึ่งใกล้เคียงกับผลของการเจริญเติบโตเมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชต่างๆ และมีการเจริญเติบโตไปเรื่อยๆ จนกระทั่งเสร็จสิ้นการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 96 (รูปที่ 4-3)

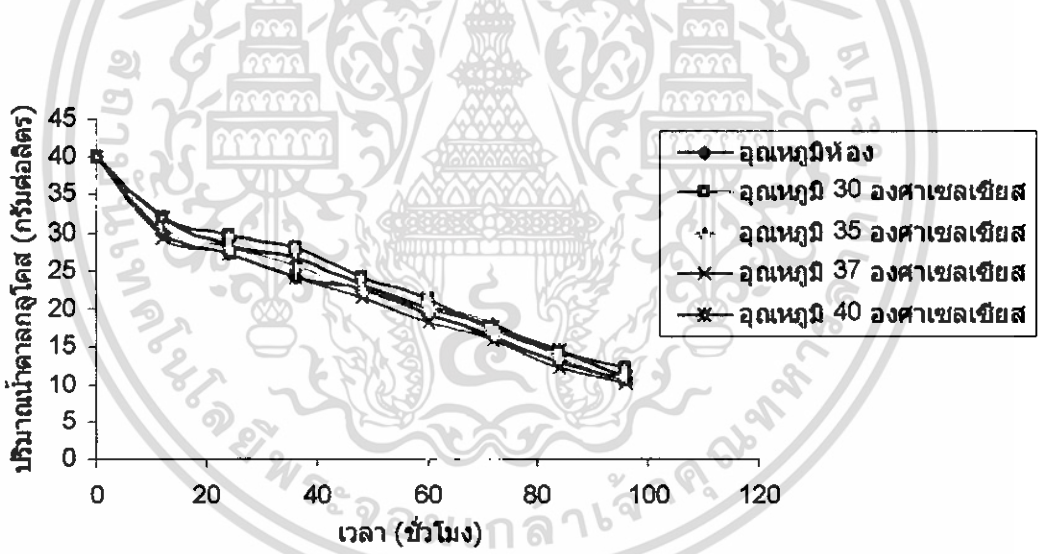
สำหรับการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการวัดปริมาณกลูโคสที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น จากกราฟจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก จากนั้นจึงค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งถึงช่วงท้ายของการหมัก แสดงว่า เชื้อมีการนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโตในช่วงแรก เมื่อทำการทดลองไปจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่า การทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนั้น ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 10.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 74.95 ของสารตั้งต้น แสดงว่า เชื้อสามารถใช้สารตั้งต้นในกระบวนการหมักได้เป็นอย่างดี (รูปที่ 4-4) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูกโดยเชื้อ *Enterococus faecalis* RKY 1 ในการศึกษาได้มีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vishu และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้ง โดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV6 พบว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุดในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 หมักที่พีเอช 6.5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่างๆ ของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 หมักที่พีเอช 6.5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

ซึ่งจากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ทั้งจากการทดลองเมื่อศึกษาผลของพีเอช และการทดลองเมื่อศึกษาผลของอุณหภูมินั้น ข้อมูลที่ได้จากผลของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ผลของน้ำหนักแห้ง และผลจากการวัดปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป ได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน

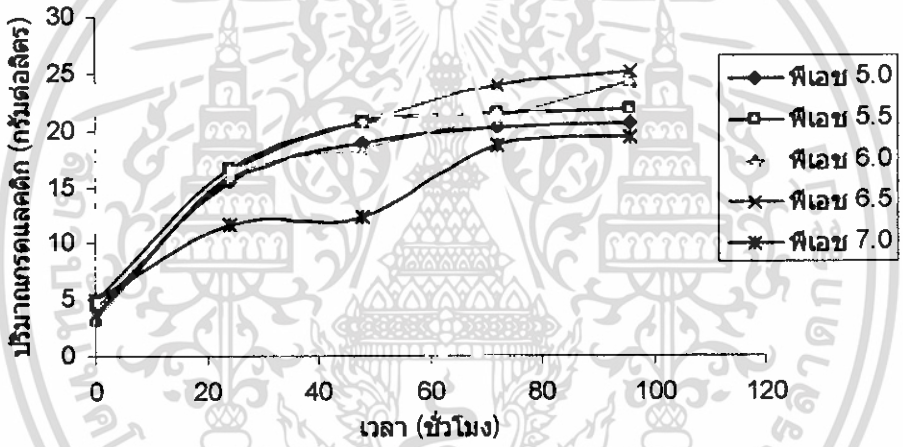
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักโดยทำการหาค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ แล้วทำการปรับสภาวะต่างๆที่ใช้ในการศึกษา ได้ผลการทดลองดังนี้

4.2.1 ผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

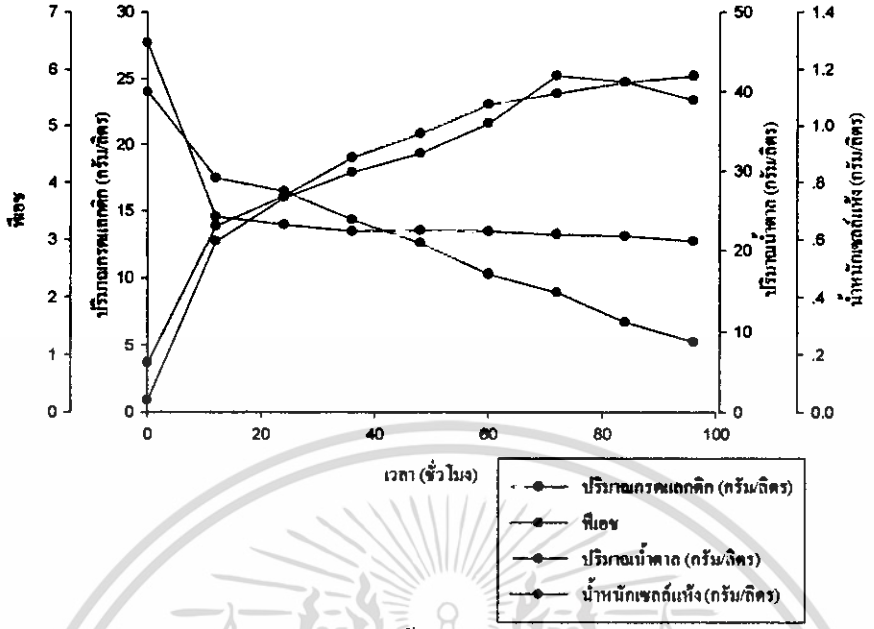
เมื่อทำการหมักโดยใช้อาหารสังเคราะห์ เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 และทำการปรับพีเอชของอาหารให้เท่ากับ 5, 5.5, 6, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์พบว่า ที่พีเอช 6.5 ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุด คือ 25.19 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 รองลงมา คือที่พีเอช 6.0 ให้ผลผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 24.23 กรัมต่อลิตรดังรูปที่ 4-5



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณผลผลิตกรดแลคติกที่พีเอชต่างๆของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

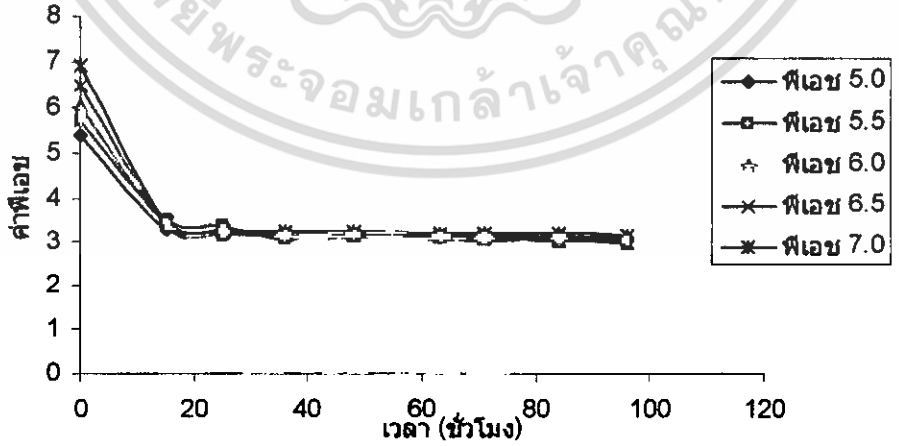
สำหรับความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เมื่อใช้สภาวะที่พีเอช 6.5 จะสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 96 มีค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.262 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าอัตราการผลิตที่สูงกว่าที่สภาวะพีเอชอื่นๆ และมีค่าผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.8063กรัมต่อกรัมซับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 การเปลี่ยนแปลงของพีเอช กับปริมาณผลผลิตกรดแลคติก เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชที่ค่าพีเอช 6.5 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

เมื่อสังเกตจากกราฟการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก จะพบว่า ทุกสภาวะพีเอช คือ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก จนถึง ณ ชั่วโมงที่ 36 ค่าพีเอชของอาหารจึงเริ่มคงที่ ที่พีเอชประมาณ 3.0 ถึง 3.2 โดยมีค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยดังรูปที่ 4-7



รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 หมักที่ 37 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองที่ได้ เมื่อนำไปเปรียบเทียบค่าทางสถิติแล้วพบว่า ที่ค่าพีเอช 5.0, 5.5 6.0, 6.5 และ 7.0 นั้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แต่เนื่องจากที่พีเอช 6.5 ให้ปริมาณกรดแลคติกที่มากที่สุดคือ 25.19 กรัมต่อลิตรจึงนำมาใช้ในการทดลอง ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ได้ผลสอดคล้องกับรายงานของ John และคณะ (2006) ที่ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 หมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติก ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่พีเอช 6.5มาใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดลอง พีเอชของอาหาร น้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลผลิตของกระบวนกระหมักเมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชต่างๆ

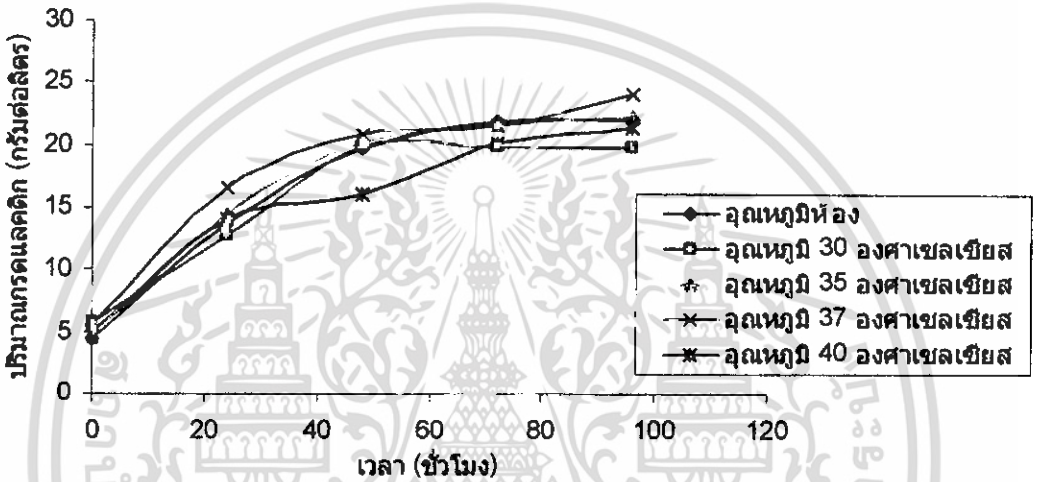
พีเอชของอาหาร	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	พีเอช ณ ชั่วโมงที่ 96	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ	น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	%น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ของผลิต (กรัมต่อกรัมซับเสตรท)
pH 5.0	96	3.09	1.42^{ab}	0.048^{ab}	27.46^{ab}	68.65	20.57^{ab}	0.214^{ab}	0.749^{ab}
pH 5.5	96	3.03	1.44^{ab}	0.047^{ab}	28.36^{ab}	70.90	21.86^{ab}	0.227^{ab}	0.770^{ab}
pH 6.0	96	2.99	1.46^{ab}	0.049^{ab}	30.06^{ab}	75.15	24.23^{ab}	0.253^{ab}	0.806^{ab}
pH 6.5	96	2.97	1.51^{a}	0.050^{a}	31.25^{a}	78.13	25.19^{a}	0.262^{a}	0.806^{a}
pH 7.0	96	3.14	1.40^{b}	0.046^{b}	26.84^{b}	67.10	19.41^{b}	0.202^{b}	0.723^{b}

หมายเหตุ : ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก

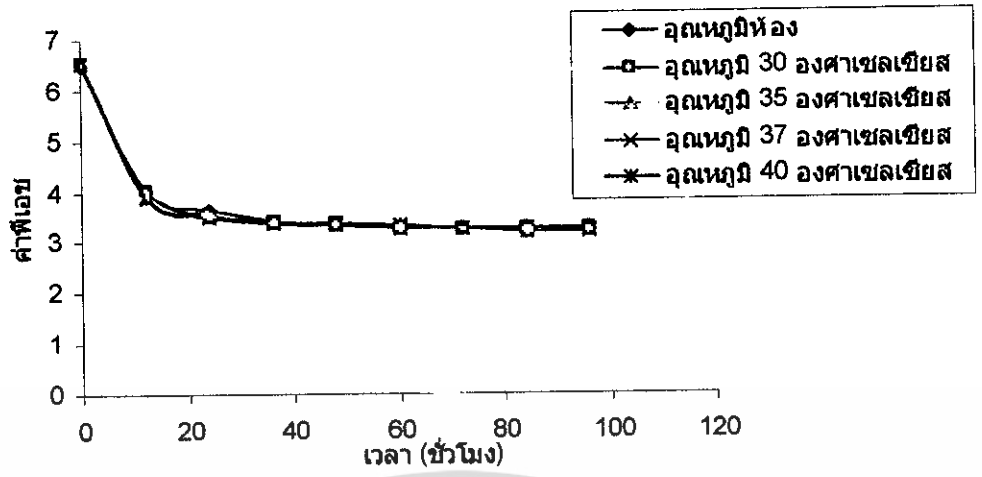
เมื่อทราบสภาวะของพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกคือที่พีเอช 6.5 แล้ว จึงทำการทดลอง โดยทำการเปลี่ยนสภาวะของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเป็นที่ 30, 35, 37, 40 และที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง จากผลการวิเคราะห์ พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ใช้ในการบ่ม ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงที่สุด คือ 24.30 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ผลการผลิตกรดแลคติก เท่ากับ 22.42 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4-8



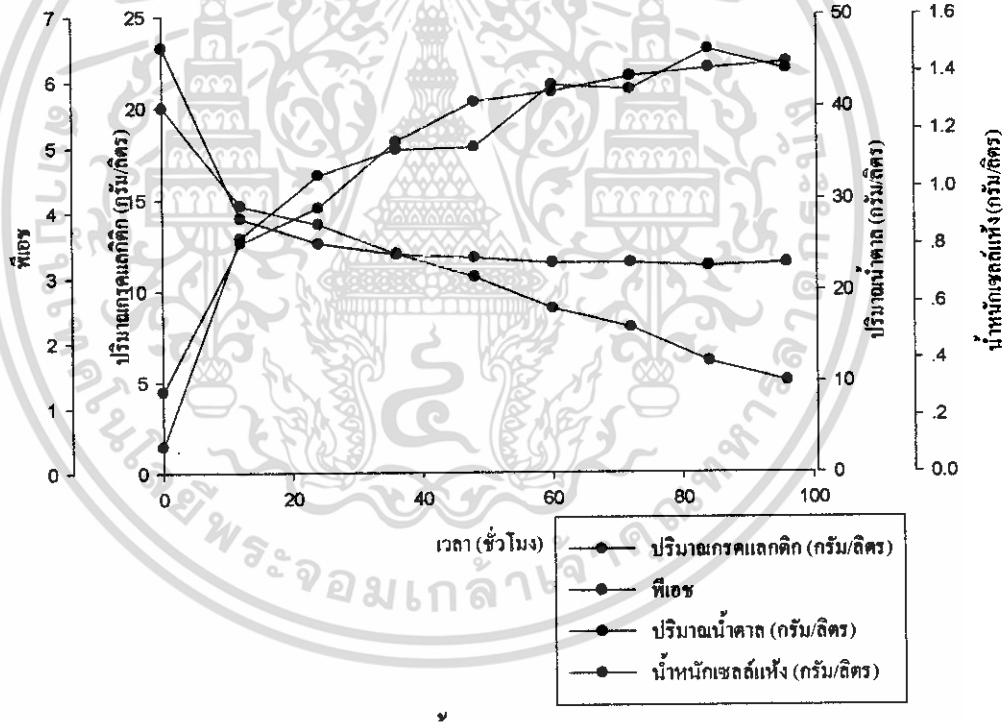
รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณผลผลิตกรดแลคติกที่อุณหภูมิต่างๆของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ทำการหมักที่พีเอช 6.5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

เมื่อสังเกตจากกราฟการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อให้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 จะพบว่า ทุกสภาวะอุณหภูมิการบ่ม จะมีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก จนถึง ณ ชั่วโมงที่ 36 ค่าพีเอชของอาหารจึงเริ่มคงที่ ที่พีเอชประมาณ 3.4 ถึง 3.2 โดยมีค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4-9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชที่อุณหภูมิต่างๆ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า



รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 การเปลี่ยนแปลงของพีเอช กับปริมาณ ผลผลิตกรดแลคติก เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักที่พีเอช 6.5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไม่มีการเขย่า

สำหรับความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อชนิดนี้ เมื่อใช้สภาวะที่พีเอช 6.5 และที่อุณหภูมิการบ่ม 37 องศาเซลเซียส จะสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 96 มีค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการผลิต เท่ากับ 0.2531 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าอัตราการผลิตที่สูงกว่าที่สภาวะอุณหภูมิอื่นๆ และมีค่าผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.8107 กรัมต่อกรัมซับสเตรท

จากผลการทดลองที่ได้ เมื่อนำไปเปรียบเทียบค่าทางสถิติแล้วพบว่า ที่อุณหภูมิ 30,35,37 40 และอุณหภูมิห้องนั้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ได้มีรายงานของ Idris และ Suzuna (2006) ได้ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรด โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาอุณหภูมิที่ระดับ 27, 30, 37, 40, 45, และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดลอง พีเอชของอาหาร น้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลผลิตของกระบวนกระหมักเมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิการบ่มต่างๆ

อุณหภูมิการบ่ม	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	พีเอช ณ ชั่วโมงที่ 96	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ	น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	%น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ของผลผลิต (กรัมต่อกรัมซับสเตรท)
30 องศาเซลเซียส	96	3.23	1.01 [b]	0.047 [ab]	27.65 [b]	69.12	20.66 [b]	0.215 [b]	0.747 [b]
35 องศาเซลเซียส	96	3.22	1.04 [ab]	0.048 [ab]	29.36 [ab]	73.40	22.42 [ab]	0.233 [ab]	0.763 [ab]
37 องศาเซลเซียส	96	3.19	1.10 [a]	0.051 [a]	29.98 [a]	74.95	24.30 [a]	0.253 [a]	0.810 [a]
40 องศาเซลเซียส	96	3.20	1.03 [ab]	0.046 [b]	28.97 [ab]	72.42	21.53 [ab]	0.224 [ab]	0.743 [ab]
อุณหภูมิห้อง	96	3.26	1.06 [ab]	0.050 [ab]	29.31 [ab]	73.27	22.12 [ab]	0.230 [ab]	0.754 [ab]

หมายเหตุ : ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาการเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และศึกษาการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ ได้ผลการทดลองดังนี้

- แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร (เสกสรรค์ และอรรถพนธ์ , 2007)

- แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือสารสกัดยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 10 กรัมต่อลิตร (มัทนา และคณะ , 2007)

- แหล่งแร่ธาตุรองที่เหมาะสม คือ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส 1 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟส 0.03 กรัมต่อลิตร และ แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไอเดรต 0.1กรัมต่อลิตร (จิราภรณ์ และณัฐวุทธิ , 2007)

- พีเอชที่เหมาะสม คือ 6.5

- อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส

- ความเร็วรอบที่เหมาะสม คือ ที่สภาวะนิ่ง (Arasaratnam และคณะ, 1996)

สูตรอาหารสังเคราะห์ มีองค์ประกอบดังนี้

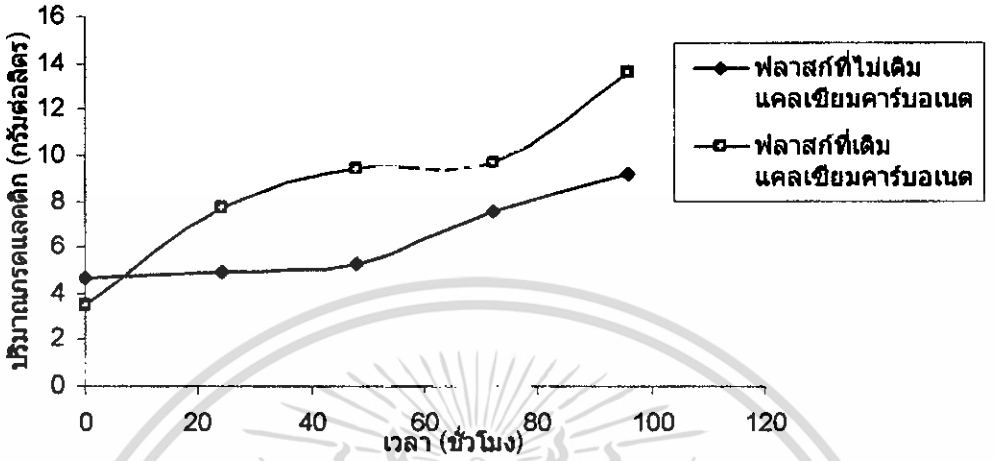
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Peptone)	10	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลกลูโคส(Glucose)	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	1	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต($MgSO_4.7H_2O$)	0.03	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร

4.3.1 ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกแล้ว จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต โดยใช้อาหารสังเคราะห์ ทำการเก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง จากผลการวิเคราะห์ พบว่า ฟลาสก์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงกว่าฟลาสก์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งทั้งฟลาสก์ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต จะให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟลาสก์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตให้ผลผลิตกรดแลคติก เท่ากับ 13.504 กรัมต่อลิตร และฟลาสก์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตให้ผลผลิตกรดแลคติก เท่ากับ 9.162 กรัมต่อลิตร

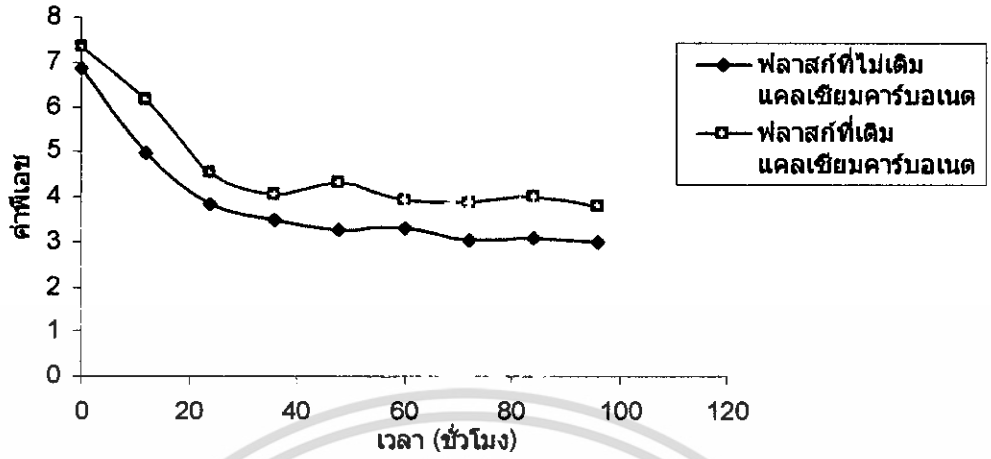


รูปที่ 4.11 ปริมาณผลผลิตกรดแลคติกที่ผลิตได้โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ในระดับ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ไม่มีการเขย่า

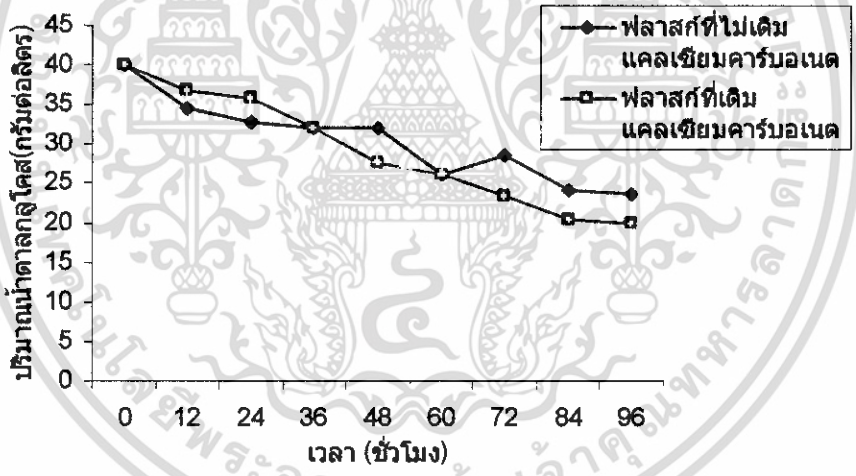
สำหรับความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อชนิดนี้ โดยฟลาสก์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีค่าอัตราการผลิต เท่ากับ 0.141กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.6731 กรัมต่อกรัมซับสเตรท และฟลาสก์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าอัตราการผลิต เท่ากับ 0.095 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.5579 กรัมต่อกรัมซับสเตรท (รูปที่ 4-12)

เมื่อสังเกตจากกราฟการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก (รูปที่ 4-12) จะพบว่า ฟลาสก์ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก จากนั้นค่าพีเอชจะค่อยๆ ลดลง จนถึง ณ ชั่วโมงที่ 72 ค่าพีเอชของอาหารจึงเริ่มคงที่ ที่พีเอชประมาณ 3.0 ถึง 3.8 โดยมีค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ส่วนค่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้เป็นกรดแลคติกนั้น (รูปที่ 4-13) จากกราฟจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งถึงช่วงท้ายของการหมัก แสดงว่า เชื้อมีการนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโต ก่อนที่จะทำการสังเคราะห์ออกมาเป็นกรดแลคติก เมื่อทำการทดลองไปจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่า ฟลาสก์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 19.94 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 50.15 ของสารตั้งต้น ส่วนฟลาสก์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 23.58 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 41.05 ของสารตั้งต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมักของอาหารสังเคราะห์ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ไม่มีการเขย่า



รูปที่ 4.13 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 ใน ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดลอง พีเอชของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลผลิต เมื่อเปรียบเทียบกระบวนกระหมักแบบ ฟลากส์ 2ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ชนิดของตัวอย่าง	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	พีเอช ณ ชั่วโมงที่ 96	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป(กรัมต่อลิตร)	%น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ของผลิต (กัมต่อกรัมซับสเตรท)
ฟลากส์ขนาด 2 ลิตรไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	96	3.00	1.26	16.42	41.05	9.16	0.09	0.55
ฟลากส์ขนาด 2 ลิตรเติมแคลเซียมคาร์บอเนต	96	3.80	-	20.06	50.15	13.50	0.14	0.67

หมายเหตุ : ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

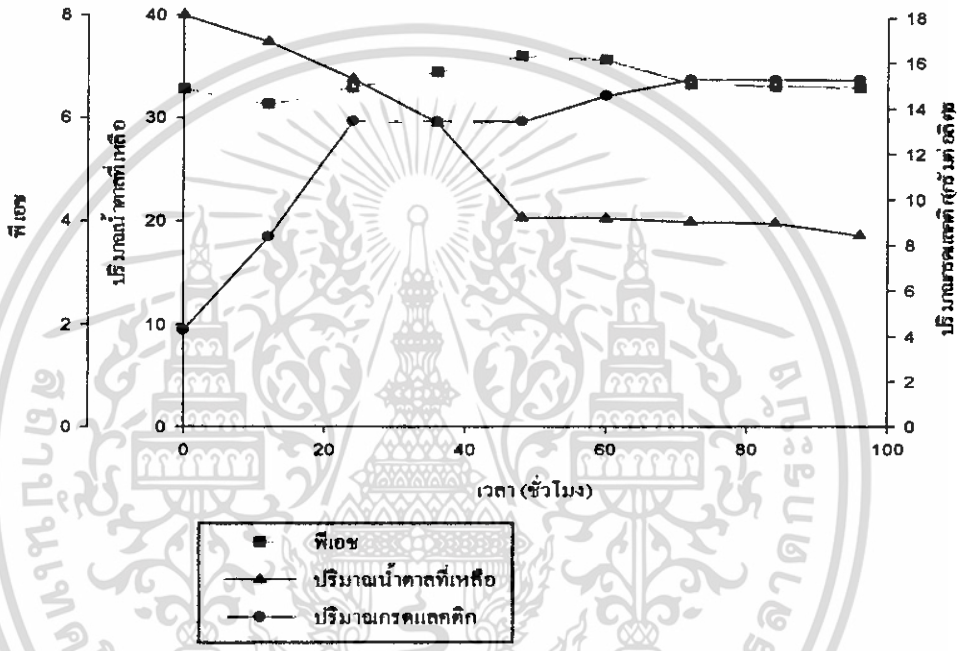
4.3.2 ศึกษาการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกแล้ว จึงทำการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต โดยใช้อาหารสังเคราะห์ ทำการเก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง จากผลการวิเคราะห์ พบว่า ถังหมักจะให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 15.276 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการผลิต เท่ากับ 0.159 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.7198 กรัมต่อกรัมซับสเตรท

จากรูปที่ 4- 14 จะเห็นได้ว่าเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่เจริญในถังหมักขนาด 2ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูง ทั้งนี้เนื่องมาจากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักสามารถควบคุมความเร็วรอบของใบพัดกวนในอัตราเร็วที่เหมาะสมได้ซึ่งในการทดลองนี้กำหนดให้ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ทำให้เชื้อสามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึง และในถังหมักสามารถควบคุมค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ได้ การเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไป เพื่อให้แคลเซียมคาร์บอเนตแตกตัว เกิดเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลเซียมแลคเตท และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แคลเซียมคาร์บอเนตทำหน้าที่เป็นตัวสะเทิน (neutralizer) ในระหว่างการหมัก (Ohkouchi และInoue, 2006) เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช ระหว่างกระบวนการหมัก จะพบว่า ค่าพีเอชของถังหมัก ในช่วงแรกจะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย จนถึง ณ ชั่วโมงที่ 72 ค่าพีเอชของอาหารจะเริ่มคงที่ ที่พีเอชประมาณ 6.6 ส่วนปริมาณของน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 18.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 53.05 ของสารตั้งต้น



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 การเปลี่ยนแปลงของพีเอช กับปริมาณผลผลิตกรดแลคติก เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักที่พีเอช 6.5 ในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดลอง พีเอชของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลผลิต ของถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ชนิดของตัวอย่าง	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	พีเอช ณ ชั่วโมงที่ 96	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	%น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ของผลิต (กัมต่อกรัมซับสเตรท)
ถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	96	6.63	-	21.22	53.05	15.27	0.15	0.71

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

ในการผลิตกรดแลคติกด้วยกระบวนการทางชีวภาพนั้น มีข้อดีอยู่หลายประการนอกจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จะไม่มีความเป็นพิษสามารถนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารได้ ยังมีค่าใช้จ่ายในการผลิตที่ต่ำกว่าการผลิตด้วยกระบวนการทางเคมี สำหรับจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการให้ผลผลิตกรดแลคติกในปริมาณมากที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ คือ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ซึ่งจะให้ผลผลิตออกมาในรูปกรดแลคติกเพียงชนิดเดียว ด้วยคุณสมบัตินี้จึงได้นำมาใช้ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่ง แล้วศึกษาผลของพีเอช และผลของอุณหภูมิการบ่มต่างๆ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ทั้งจากการทดลองเมื่อศึกษาผลของพีเอช และการทดลองเมื่อศึกษาผลของอุณหภูมินั้น ข้อมูลที่ได้จากผลของค่าการดูดกลืนแสง ผลของน้ำหนักแห้ง และผลจากการวัดปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป ได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน คือมีช่วงการเจริญสูงสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 60 และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้สูงสุดถึงร้อยละ 78.13 ของสารตั้งต้น และจากการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก คือที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงที่สุด คือ 25.198 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 ของระยะเวลาการหมัก โดยมีค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.262 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของผลผลิตมีค่าเท่ากับ 0.8063 กรัมต่อกรัมซับสเตรท

เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงกว่าฟลาสก์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต โดยฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต จะให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 13.504 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.141กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.6731 กรัมต่อกรัมซับสเตรท ส่วนฟลาสก์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต จะให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณกรดแลคติก เท่ากับ 9.162 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการผลิต เท่ากับ 0.095 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.5579 กรัมต่อกรัมซับสเตรท ส่วนการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่า ถังหมักจะให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 15.276 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการผลิต เท่ากับ 0.159 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.7198 กรัมต่อกรัมซับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับผลผลิตการหมักที่ดีนั้นควรใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก หาได้ง่าย ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นแต่มีช่วงระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิตยาวนาน และเชื้อที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักสามารถใช้สารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตให้ได้มากที่สุด โดยมีผลผลิตอื่นๆน้อยที่สุด รวมถึงสภาวะการหมักซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มผลผลิตเช่นเดียวกัน เช่นในการทดลองครั้งนี้ควรทำการหมักที่สภาวะนิ่ง ให้อยู่ในสภาพไร้อากาศมากที่สุด เพื่อให้มีสภาวะการหมักที่เหมาะสมต่อเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ให้สามารถผลิตกรดแลคติกให้ได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ลัญจกร จันทร์อุดม, สุกัญญา จันทะชุม และอรัญ หันพงศ์กิตติกูล. .2548 การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิตแคเทอริโอซินจาก *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11. Songkhlanakarin J.Sci.Technol Vol 27)Suppl(3...824-817

ศิวาพร ศิวเวช. .2546วัตถุเจือปนอาหาร เล่ม .1นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ

Altaf,Md. Naveena,B. J. Bhadriah,K. and Reddy,G. 2005. Selection of medium components by Plackett–Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. Bioresource Technology (96):485-490

Arasaratnam, V. Senthuran, A. and Balasubramaniam, K. 1996 . Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* . Enzyme and Microbial Technology (19):482-486

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 Druc Administration.1998. Code of Federal Regulations, U.S. Government Printing Office,Washington. D.C. Title 21.

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.

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 biodegr plastics. International Dairy Journal (13) :575-580.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fu, W. and Mathews, A. P. 1999.Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen.Biochemical Engineering Journal(3):163-170

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.

John, R. P. Nampoothiri, K. M. and Pandey, A. 2006. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii* .Process Biochemistry(41):759-763

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.

Michael, E. S. and Wilhelm, H. 1997.Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy International Journal of Food Microbiology, Volume (36):1-29

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

Mostafa, N. A. 1996 Production of lactic acid from whey with agar immobilized cells in a continuous packed tubular reactor Energy Conversion and Management, (37):253-260

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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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. Prodution of D-latic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. Bioresource Technology (97) : 211-217.

Vishnu, C. Naveena, B.J. Altaf, Md. Venkateshwar, M. Reddy, G. 2006 Amylopullulanase—A novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid Enzyme and Microbial Technology, (38):545-550

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

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

www.chemistry.bd.psu

www.msds.pcd.go.th/searchName.aspvID=742

www.brighton73.freeserve.co.uk/.../phd-intr.htm

www.lactospore.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1. อาหารเหลว(MRS broth)ประกอบด้วย

สารสกัดเนื้อ(meat extract)	10	กรัม
สารสกัดยีสต์ (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
แอมโมเนียมอะซิเตต(CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต($MnSO_4.4H_2O$)	0.05	กรัม

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ด้วย 1.0 นอร์มัลกรดไฮโดรคลอริก และ 1.0 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็ง (MRS agar)ประกอบด้วย

สารสกัดเนื้อ(meat extract)	10	กรัม
สารสกัดยีสต์ (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
แอมโมเนียมอะซิเตต(CH_3COONH_3)	2	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ด้วย 1.0 นอร์มัลกรดไฮโดรคลอริก และ 1.0 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาตั้งตรงทิ้งให้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส

วิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dobis, 1956)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
2. คิวเวตแก้ว
3. ปิเปต

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก
2. ฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่

ตารางที่ 1 การเจือจางสารละลายกลูโคส ที่ระดับความเจือจางต่างๆ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

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

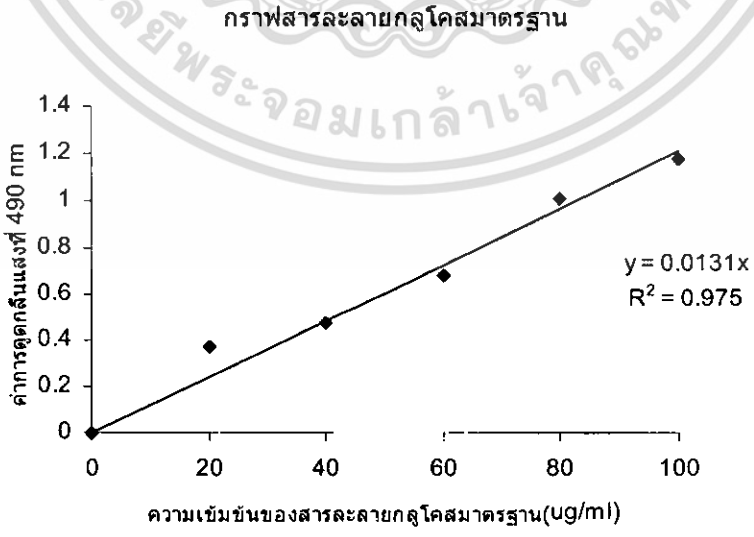
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5 เปอร์เซนต์ลงไป 1 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็วโดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของ ของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าค่อยๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที
4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกูลโคลใน สารละลาย ตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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

กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์
น้ำหนักเซลล์แห้ง

วิธีการ

1. เตรียมหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่อบแห้งแล้วและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยของเซลล์ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนลอยแช่แข็งเก็บไว้สำหรับการวิเคราะห์ค่าปริมาณน้ำตาลและกรดแลคติก
4. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองและนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 1-2 ครั้ง
5. รินส่วนลอยทิ้ง นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
6. ทิ้งให้เย็นใน desicator และชั่งน้ำหนักที่แน่นนอน
7. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งจาก

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
การใช้เครื่อง HPLC

ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

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

ขั้นตอนการเปลี่ยน MOBILE PHASE

1. ปิด Pump HPLC
2. เท Mobile Phase ใหม่ใส่ลงในบีกเกอร์
3. เปิด ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ยก Sinker ออกจาก Mobile Phase แล้วจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มี Mobile Phase ใหม่อยู่
5. รอจน Pump ดูด Mobile Phase ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20-30 ml
6. ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของSinker ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาดแล้ว นำ Sinkerจุ่มลงในขวดของ ใหม่
7. ในระหว่างขั้นที่ 1-6 ถ้า Pump หยุดทำงานให้กด Purge อีกครั้ง
8. ให้สังเกตสายของ ให้สังเกตว่าในสายของ Sinker มีฟองอากาศอยู่หรือเปล่า ถ้ายังมีอยู่ ให้กด Purge ให้ pump ทำงาน จนกว่าฟองอากาศจะหมด
9. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วรอจน Pump หยุดทำงานเอง หรือให้ กด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. ปิด Drain valve ที่ Pump แล้วสั่งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ ในการวิเคราะห์

Note: การเปลี่ยน Mobile Phase ต้องคำนึงถึงด้วยว่า Mobile Phase เก่าและใหม่เข้ากันหรือเปล่า ถ้าไม่สามารถผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันก็นำได้ต้องใช้สารชนิดอื่นเป็นตัวเชื่อมกลาง โดย run Mobile Phase ตัวเชื่อมกลางอย่างน้อย 20 นาที

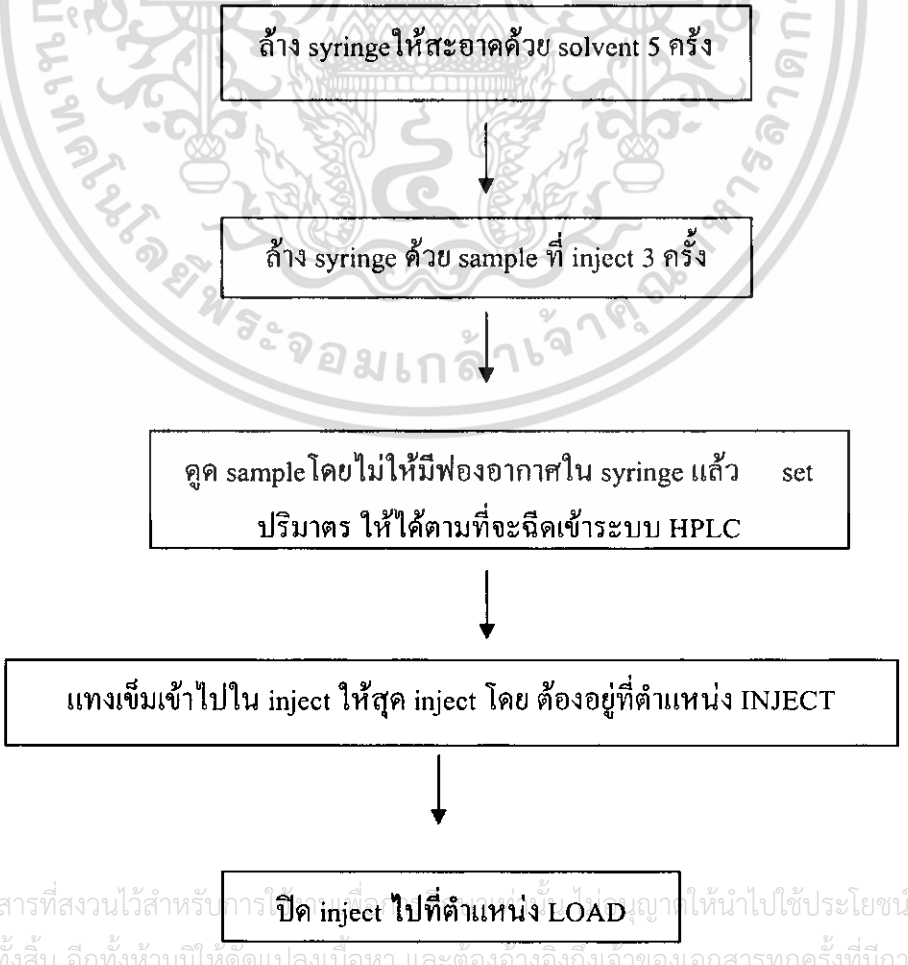
ตัวอย่าง 1.) **Buffer Solution** ⟶ **น้ำกลั่น HPLC** ⟶ **Polar Origanic Solvent**

2 .) **Non Polar Solvent** ⟶ **Iso-propanol Polar** ⟶ **Origanic Solvent**

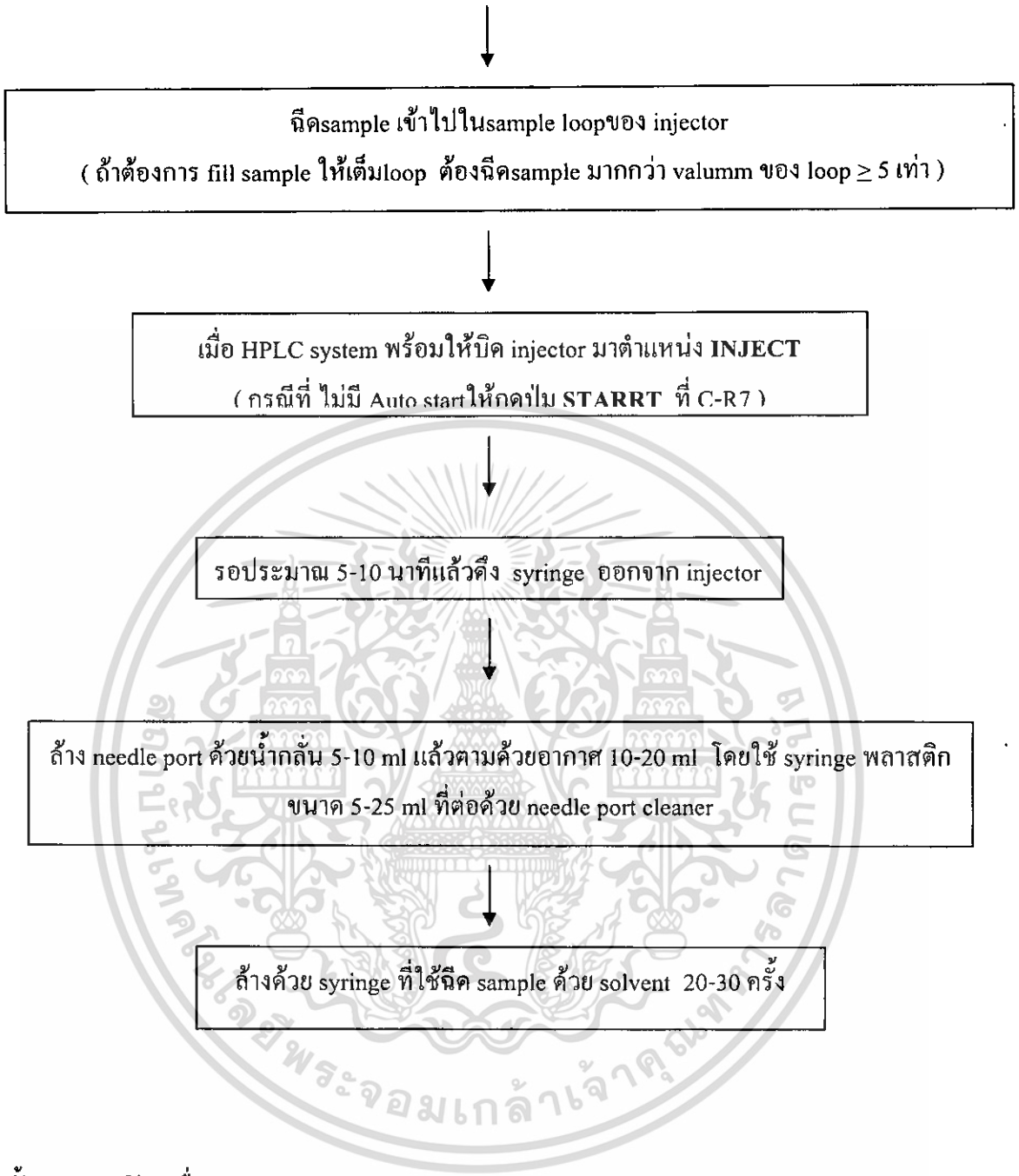
ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง

1. ตรวจดูให้แน่ใจว่าLC อยู่ในสถานะReady
2. ตรวจดูให้แน่ใจว่า Detector และ Autosampler อยู่ในสถานะ Ready
3. รอจน Baseline ค่อนข้างนิ่ง
4. ถ้าต้องการให้เครื่องคำนวณ Slope ให้เลือกกด S
5. ถ้า นิ่งอยู่ที่ตำแหน่งสูงกว่าศูนย์เล็กน้อย สามารถสั่งศูนย์อัตโนมัติกด Z
6. ทำการ Inject Sample

Rheodyne Manual Injector



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ขั้นตอนการปิดเครื่อง

1. หลังจากinject sample สุดท้ายเสร็จแล้วให้ Ren mobile phase ต่ออีกประมาณ 30 นาที
2. สั่ง OFF pump
3. ปิด Power ของ HPLC units แล้ว Sinker ให้พ้น Mobile Phase

Note : กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

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

Note

1. การเปลี่ยน Mobile Phase ที่ใช้งานมาเป็น Mobile Phase ที่ใช้เก็บ Column ต้องระวังการผสมกันระหว่าง Mobile Phase ทั้ง 2 ว่า สามรรถผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ ถ้าไม่สามรถผสมเข้ากันได้ดีต้องมี Mobile Phase ขั้นกลางอย่าง 30 นาที
2. การล้างใช้ flow rate 1 ml/min หรือน้อยกว่า ขึ้นกับชนิดของ Column

ตัวอย่าง การล้างเครื่องโดยมี Mobile Phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็น buffer solution และ Mobile Phase ที่เก็บ เป็น70 % MEOH

buffer solution 30 นาที

↓

น้ำกลั่น **HPLC**30นาที

↓

70 % MEOH 30 นาที

↓

ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

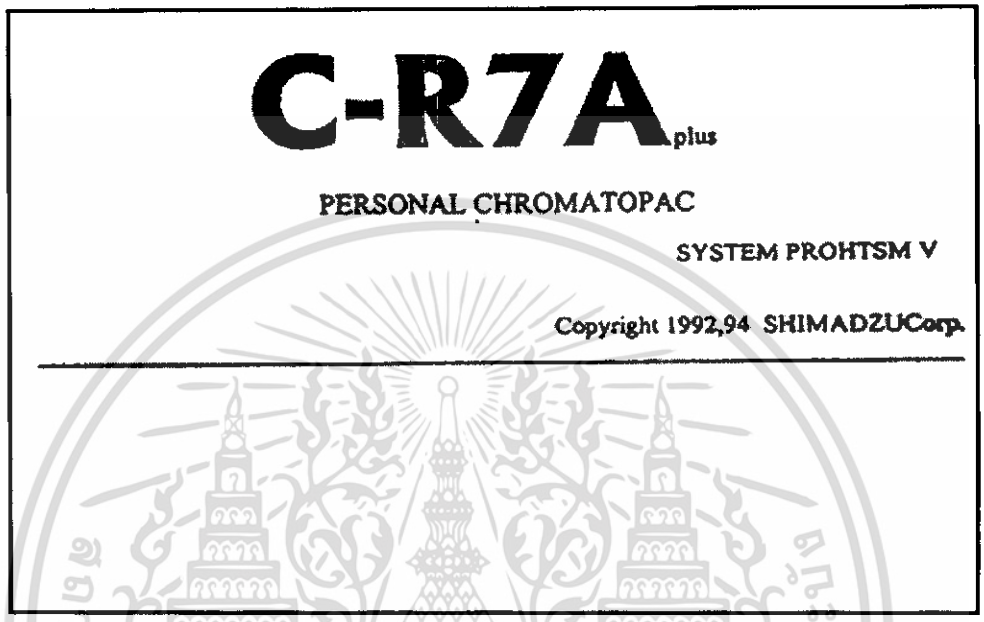
ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)

1. Run Mobile Phase ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run Mobile Phase ที่ใช้เก็บ Column 1 ชม.
3. หยุด Pumpแล้วถอด Column ออกจากระบบแล้วต่อ pipe เปล่าแทนที่และปิด Column ด้วย Plugให้แน่น
4. เปลี่ยน Mobile Phase เป็น แล้ว เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง
5. OFF pump แล้วปิดเครื่องทุก unit
6. ยก Sinker ออกจากขวด Mobile Phase แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการใช้งาน

1. กดปุ่มเปิด Power ที่เครื่องC-R7a ในกรณีที่มี 2 Drive ให้ใส่แผ่นSystem disk ใน Drive 1 และ แผ่นเก็บข้อมูลใน Drive 2 ในกรณีที่มี Board สำหรับเชื่อม HPLCกับ C-R7aให้ทำการเชื่อมสัญญาระหว่างเครื่องทั้งสองโดยพิมพ์ OPEN TRS7และ ENTERหลัง จากปรากฏหน้าจอ



2. กดWIN 1 จะปรากฏหน้าจอ Menu ของWIN 1 เลือกข้อ 2 ตามด้วย ENTER จะปรากฏ

เลือก **L** เพื่อเรียก Analysis File ในกรณีเคยสร้าง File เก็บไว

E ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูก Load ขึ้นมาใช้งา

R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่าใน Analysis File ที่ Load ขึ้นมาใช้งานอยู่

A ในกรณีที่ต้องการให้มีการ save อัตโนมัติ Analysis File กับทุกๆครั้งของการฉีด

วิธีสร้าง Analysis File ใหม่

- เลือก E จะปรากฏหน้าจอของ Analysis File

แก้ไข Parameter ดังต่อไปนี้ WIDTH 5

DRIFT(uV/min)0

และ T.DBL(min) 1000

- กด EXIT เพื่อออกจากหน้าจอจะปรากฏคำถาม

Save FILE ? Y : yes N : no

กด Y จะปรากฏ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Part 1 :
File Name 2:

ENTER เช่น

Part 1 :
File Name 2: ALCOHOL

หลังจากการ save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN1

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

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

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 และตั้งชื่อ 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 สุดท้าย

A เมื่อต้องการให้เครื่อง save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

4. เลือกข้อ 1 จากหน้าจอ Menu ของ WIN1 จากนั้นรอจนสังเกตเห็นเส้น 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 เครื่องจะใช้เวลาในการ ทดสอบประมาณ 10 เท่าของค่า Width ที่ตั้งไว้ใน Analysis file หลังจากการทดสอบสิ้นสุดค่า Slope ที่ได้จะถูก Save ใน Analysis file อัตโนมัติถ้าต้องการแก้ไขให้กลับสู่หน้า Menu ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis file
6. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณและให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START ในกรณีที่เครื่อง C-R7A สามารถเชื่อมต่อและควบคุมการทำงานของเครื่อง HPLC ได้จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถขอดูค่าต่างๆของเครื่อง HPLC ผ่านเครื่อง C-R7A ได้จากหน้า Menu ของ WIN1 โดยเลือกข้อ 7: LC Monitor ตามด้วย ENTER

การเตรียม Mobile phase

Mobile phase ใช้ 20 mM potassium phosphate buffer : pH 3.0

โดยเตรียมสารเคมีดังนี้

A: 0.1 M KH_2PO_4	13.7 g/l	เก็บในขวดสีชา
B: 0.5 M H_3PO_4	3.4 ml/100ml	เก็บในขวดสีชา

คำควณปริมาณสารละลาย A จากสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

Mobile phase (เตรียมเมื่อใช้) เตรียมจากสารละลาย A ปริมาตรตามที่คำนวณได้ เติมน้ำกลั่น DI ปรับพีเอชด้วยสรละลาย B และปรับปริมาตรตามที่ต้องการ นำไปกรองด้วย filter membrane และทำการ degassed ด้วยเครื่อง Sonicated ประมาณ 10-15 นาทีก่อนใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

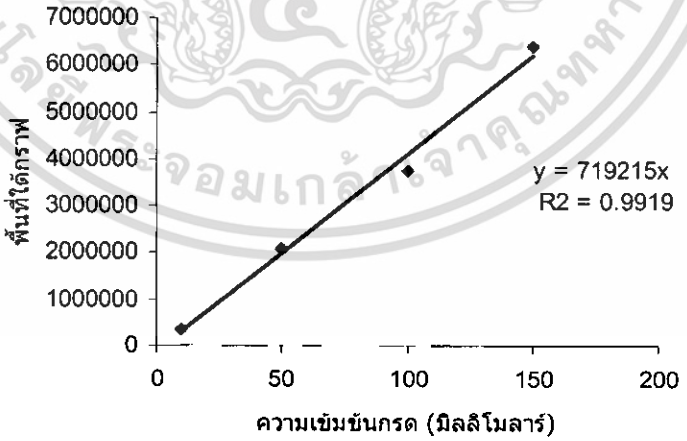
ภาคผนวก จ

ข้อมูลการทดลอง

1. ลักษณะพีคของกรดแต่ละชนิด ที่ตรวจสอบได้จากเครื่อง HPLC

รูปที่ 2 แสดงพีคของกรดมาตรฐานแลคติก ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

2. การหาค่ากราฟมาตรฐานของกรดแลคติก



รูปที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานกรดแลคติกเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ตารางข้อมูลผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

ตารางที่ 2 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่พีเอช 5.0

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40.00	5.39	4.2125	0.0936
15	30.66	3.28	13.9248	0.7478
25	28.54	3.17	15.4466	0.99
36	23.17	3.14	16.6704	1.1264
48	20.04	3.13	18.8366	1.1793
63	19.01	3.12	20.0979	1.3542
71	18.31	3.14	20.2244	1.3858
84	14.32	3.11	20.3773	1.49
96	12.54	3.09	20.5726	1.4246

ตารางที่ 3 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่พีเอช 5.5

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40.00	5.70	4.8127	0.095
15	30.32	3.49	14.5027	0.8355
25	28.32	3.36	16.6672	0.9622
36	24.54	3.06	17.5005	1.0602
48	22.32	3.09	20.6581	1.1599
63	20.61	3.06	21.6507	1.1985
71	18.96	3.03	21.5615	1.3088
84	13.34	3.04	21.4529	1.4458
96	11.64	3.03	21.8615	1.443

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่พีเอช 6.0

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40	6.05	3.2148	0.0933
15	30.57	3.36	15.2531	0.6894
25	26.44	3.16	15.7335	1.0671
36	24.82	3.16	16.6179	1.1646
48	20.73	3.14	18.4534	1.1827
63	18.67	3.12	20.0954	1.3714
71	15.93	3.08	21.0886	1.4536
84	12.59	3.03	21.7257	1.5758
96	9.940	2.99	24.2382	1.4651

ตารางที่ 5 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่พีเอช 6.5

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40	6.46	3.6853	0.0980
15	29.13	3.4	13.841	0.8425
25	27.51	3.26	16.1245	1.0507
36	23.89	3.14	19.02559	1.1707
48	20.97	3.16	20.8177	1.2604
63	17.15	3.14	23.0406	1.4029
71	14.91	3.09	23.8515	1.6317
84	11.23	3.06	24.7278	1.6017
96	8.750	2.97	25.1983	1.5126

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่พีเอช 7.0

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40	6.89	5.1108	0.0927
15	30.26	3.44	8.2672	0.8255
25	28.78	3.25	11.5958	1.0446
36	25.35	3.24	11.9491	1.1362
48	23.83	3.24	12.3789	1.1429
63	20.61	3.19	12.4772	1.3581
71	18.54	3.17	18.6578	1.3422
84	15.31	3.17	19.3874	1.4814
96	13.16	3.14	19.4102	1.4093

4. ตารางข้อมูลผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

ตารางที่ 7 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40	6.51	4.4763	0.0883
12	30.04	4.03	-	0.4666
24	27.37	3.62	13.7026	0.7436
36	24.18	3.42	-	0.9817
48	22.64	3.34	19.7732	1.0535
60	19.32	3.26	-	1.1849
72	16.31	3.26	21.9574	1.0933
84	13.12	3.23	-	1.0541
96	10.69	3.21	22.1203	1.0621

หมายเหตุ : - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40	6.54	5.7417	0.922
12	31.94	4.01	-	0.4332
24	29.53	3.57	12.7006	0.8105
36	27.97	3.4	-	0.9511
48	24.14	3.35	19.9265	1.0588
60	21.30	3.25	-	1.1267
72	17.25	3.26	19.9667	1.0346
84	14.35	3.26	-	0.9299
96	12.35	3.23	20.0072	1.0148

หมายเหตุ : - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

ตารางที่ 9 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40	6.52	4.4676	0.09
12	30.43	3.91	-	0.5229
24	28.15	3.53	14.5496	0.8032
36	25.81	3.36	-	1.0067
48	22.31	3.31	20.3185	1.0374
60	20.23	3.23	-	1.0994
72	18.19	3.23	21.6742	1.0655
84	13.59	3.18	-	1.0282
96	10.64	3.22	22.426	1.0457

หมายเหตุ : - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40	6.55	5.6152	0.0911
12	29.31	3.85	-	0.4845
24	27.29	3.49	16.6627	0.8054
36	24.08	3.38	-	1.0727
48	21.58	3.31	20.8457	1.0827
60	18.12	3.25	-	1.2539
72	15.96	3.26	21.7496	1.1256
84	12.23	3.17	-	1.066
96	10.02	3.19	24.3072	1.1075

หมายเหตุ : - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

ตารางที่ 11 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40	6.54	4.9974	0.0902
12	31.98	3.89	-	0.4992
24	28.31	3.53	14.0625	0.6946
36	26.87	3.42	-	0.9235
48	23.25	3.35	16.0928	0.99
60	19.91	3.31	-	1.0502
72	17.64	3.26	20.2881	1.0279
84	14.63	3.24	-	1.0265
96	11.03	3.2	21.534	1.0310

หมายเหตุ : - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ตารางข้อมูลผลการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ตารางที่ 12 ผลของฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40.00	6.85	4.6678	0.0900
12	34.58	4.98	-	0.1386
24	32.76	3.82	4.927	0.5124
36	32.10	3.49	-	0.8417
48	32.06	3.27	5.2267	0.9963
60	26.22	3.3	-	1.0892
72	28.56	3.02	7.5552	1.1925
84	24.18	3.08	-	1.2500
96	23.58	3.00	9.1623	1.2568

หมายเหตุ : - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 ผลของฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40.00	7.36	3.4294	-
12	36.76	6.17	-	-
24	35.78	4.52	7.7172	-
36	32.06	4.05	-	-
48	27.56	4.30	9.38	-
60	26.22	3.93	-	-
72	23.62	3.88	9.6462	-
84	20.50	3.98	-	-
96	19.94	3.80	13.504	-

หมายเหตุ : - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

ตารางที่ 14 ผลของถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	40.00	6.88	4.2595	-
12	37.42	6.27	-	-
24	33.82	6.6	13.3898	-
36	29.64	6.9	-	-
48	20.42	7.22	13.3784	-
60	20.36	7.16	-	-
72	20.04	6.69	15.2333	-
84	19.94	6.65	-	-
96	18.78	6.63	15.2726	-

หมายเหตุ : - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.การวิเคราะห์ผลปริมาณกรดแลคติกทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ ANOVAและ Duncan เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก

ANOVA

pH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	71.080	4	17.770	175823.364	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	71.081	14			

Duncan

Lactic acid	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
pH 7.0	3	19.4100				
pH 5.0	3		20.5707			
pH 5.5	3			21.8607		
pH 6.0	3				24.2393	
pH 6.5	3					25.1993
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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ ANOVAและ Duncan เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมที่มีต่อน้ำหนักแห้ง

ANOVA

pH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.021	4	.005	53.400	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.022	14			

Duncan

Dry weight	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
pH7.0	3	1.4000				
pH 5.0	3		1.4200			
pH 5.5	3			1.4400		
pH 6.0	3				1.4600	
pH.6.5	3					1.5100
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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-17 การวิเคราะห์ ANOVAและ Duncan เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมที่มีต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป

ANOVA

pH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	40.262	4	10.066	100655.400	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	40.263	14			

Duncan

Glucose	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
pH7.0	3	26.8400				
pH 5.0	3		27.4600			
pH 5.5	3			28.3600		
pH 6.0	3				30.0600	
pH.6.5	3					31.2500
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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-18 การวิเคราะห์ ANOVAและ Duncan เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมที่มีต่ออัตราการผลิตกรดแลคติก

ANOVA

pH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.008	4	.002	19.542	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.009	14			

Duncan

Lactic acid	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
pH7.0	3	.2000		
pH 5.0	3	.2113	.2113	
pH 5.5	3		.2200	
pH 6.0	3			.2500
pH.6.5	3			.2600
Sig.		.197	.316	.251

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-19 การวิเคราะห์ ANOVAและ Duncan เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมที่มีต่อผลได้ของผลผลิตกรดแลคติก

ANOVA

pH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.015	4	.004	38.400	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.016	14			

Duncan

Lactic acid	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
pH7.0	3	.7200			
pH 5.0	3		.7400		
pH 5.5	3			.7700	
pH 6.0	3				.8000
pH.6.5	3				.8000
Sig.		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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-20 การวิเคราะห์ ANOVAและ Duncan เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก

ANOVA

Temperature

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21.891	4	5.473	52961.899	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	21.892	14			

Duncan

Lactic acid	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
30 C	3	20.6690				
40 C	3		21.5313			
control	3			22.1200		
35 C	3				22.4287	
37 C	3					24.3090
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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-21 การวิเคราะห์ ANOVAและ Duncan เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่มีต่อน้ำหนักแห้ง

ANOVA

Temperature

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.016	4	.004	41.100	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.017	14			

Duncan

Dry weight	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
30 C	3	1.0100		
control	3	1.0100		
40 C	3		1.0300	
35 C	3		1.0400	
37 C	3			1.1000
Sig.		1.000	.249	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-22 การวิเคราะห์ ANOVAและ Duncan เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่มีต่อน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป

ANOVA

Temperature

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.985	4	2.246	22461.900	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	8.986	14			

Duncan

Glucose	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
30 C	3	27.6500				
40 C	3		28.9700			
control	3			29.3100		
35 C	3				29.3600	
37 C	3					29.9800
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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-23 การวิเคราะห์ ANOVAและ Duncan เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่มีต่ออัตราการผลิตกรดแลคติก

ANOVA

Temperature

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	4	.001	6.600	.007
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.004	14			

Duncan

Lactic acid	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
30 C	3	.2100		
40 C	3	.2200	.2200	
35 C	3		.2300	
control	3		.2300	
37 C	3			.2500
Sig.		.249	.269	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-24 การวิเคราะห์ ANOVAและ Duncan เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่มีต่อผลได้ของผลผลิตกรดแลคติก

ANOVA

Temperature

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.010	4	.003	25.500	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.011	14			

Duncan

Lactic acid	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
30 C	3	.7400		
40 C	3	.7400		
Control	3	.7500	.7500	
35 C	3		.7600	
37 C	3			.8100
Sig.		.269	.249	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้