สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน สำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

นายเสกสรรค์ มณีคำ

นายอรรถพนธ์ ขันธจิตร์

ว.วท.
ส๙๙๙๓
2549

เลขหมู่.....72608.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....20 มิ.ย. 2550

b.11769977x
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on Optimization of Carbon sources for lactic acid production by *Lactobacillus casei* ATCC 10863

Mr. Seksan Maneekhum

Mr. Atthapon Khathachitra

A Special Project Submitted in Partial of the 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

โครงงานพิเศษเรื่อง	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน สำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863
นักศึกษา	นายเสกสรรค์ มณีคำ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 46050150
	นายอรรถพนธ์ ขันธจิตร์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 46050154
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.สุขใจ ชูจันทร์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ			ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร.สมชาย	ไกรรักษ์	
กรรมการ	ผศ.ลินจง	สุขลำภู	
กรรมการ	รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	

(.....)
(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแลกติกโดย เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863
นักศึกษา	นายเสกสรรค์ มณีคำ นายอรรถพนธ์ ขันธจิตร์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดย เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยแหล่งคาร์บอน 6 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลทราย ทำการหมักที่สภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าน้ำตาลกลูโคสแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณสูงสุด คือ 22.247 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรดแลกติก คือ 0.698 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตกรดแลกติก คือ 0.309 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 72 ของระยะเวลาการหมัก จากนั้นศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดแลกติก โดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ผลการการทดลองพบว่าน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด คือ 25.322 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรดแลกติก คือ 0.984 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตกรดแลกติก คือ 0.352 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 72 ของระยะเวลาการหมัก และได้ศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรทั้งที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักชนิดใบพัดกวนขนาด 2 ลิตรที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยให้ผลผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ซึ่งพบว่าในระดับถังหมัก ให้ผลผลิตกรดสูงสุดเมื่อเทียบกับระดับ ฟลาสก์ โดยผลิตกรดแลคติกได้ 15.28กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.72 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Study on Effect of Carbon Sources for Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei* ATCC 10863
Name	Mr. Seksan Maneekum
	Mr. Atthapon Khandhajitra
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Assoc.Prof. Sukjai Choojun

ABSTACT

A study about suitable carbon sources for lactic acid, producing by *Lactobacillus casei* ATCC 10863 from six carbon sources that are glucose, lactose, maltose, fructose, sucrose and cane-sugar. It was fermented in stationary flask at temperature 30° C. This experiment found that glucose which is suitable carbon sources; because it could produce maximum lactic acid is 22.247 g/l. The yields of lactic acid are 0.698 g/g substrate and the productivity of lactic acid is 0.309 g/l/h, at the seventy-two hours of fermentation respectively. Suitable concentration of carbon sources for lactic acid producing by sources and glucose were studied. The different concentrations are 20, 30, 40 and 50 g/l. The result of the experiment found that glucose at 40 g/l concentration is the maximum lactic acid that is 25.322 g/l, the yield of lactic acid is 0.984 g/g substrate and the productivity of lactic acid is 0.352 g/l/h at the seventy-two hours of fermentation. The efficiency of lactic acid production in 2-liter-flask and fermentor were investigated and the supplement of calcium carbonate was also control out. The result present that the supplement of calcium carbonate improved the production of lactic acid by *L. casei* ATCC 10863. Cultivation in fermentor showed better yield of lactic acid than 2-liter-flask. The lactic acid, yield and productivity rate were 15.28 g/l, 0.72 g/g substrate and 0.16 g/l.hr, respectively for cultivation time ninety-six hours.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี นั้นอันเนื่องจากได้รับความสนับสนุน ความช่วยเหลือ ความร่วมมือ ตลอดจนคำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อคณะผู้จัดทำ และคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ที่ให้คำปรึกษาและแนะแนวทางการปฏิบัติงาน พร้อมทั้งข้อเสนอแนะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงงานนี้ ตลอดจนตรวจทานการแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานนี้ทำให้โครงงานชิ้นนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ และ ผศ.ลินจง สุขลำภู กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาคชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องและให้คำแนะนำปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติ ๆ ที่คอยให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษเสมอมา ขอขอบพระคุณพี่ ๆ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ต่าง ๆ เพื่อใช้ในการทำโครงงานพิเศษ รวมถึงพี่ปริญญาโท พี่แตงโม พี่เดียร์ พี่อิ๋ว พี่ผึ้ง พี่โจ้ พี่ยุ้ยรวมทั้งเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์

ทางคณะผู้จัดทำ ใคร่ขอถือโอกาสนี้ขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนาม และไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย หากโครงงานพิเศษชิ้นนี้มีสิ่งใดที่ขาดตกบกพร่อง ทางคณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณความดีที่ปรากฏในโครงงานพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นคุณความดีของผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นายเสกสรรค์ มณีคำ
นายอรรถพนธ์ ขันธจิตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... จ
สารบัญรูป ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน 2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ
2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก 3
2.1.1 ความสำคัญของกรดแลกติก 3
2.1.2 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของกรดแลกติก 4
2.2 กระบวนการผลิตกรดแลกติก 6
2.2.1 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี 6
2.2.2 การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางชีวภาพ 7
2.3 การนำกรดแลกติกมาประยุกต์ใช้ 8
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก 10
2.4.1 ลักษณะโดยทั่วไป 10
2.4.2 แหล่งที่พบ 10
2.4.3 ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรียแลคติก 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.4 ความทนทานต่อการยับยั้งการเจริญโดยระบบทางเดินอาหาร 11
2.4.5 การสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นของแบคทีเรียแลคติก 12
2.4.6 สารต้านเชื้อราจาก Lactic acid bacteria (LAB) 13
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก 22
2.4.1 แหล่งคาร์บอน 22
2.4.2 แหล่งไนโตรเจน 23
2.4.3 แหล่งแร่ธาตุ 32
2.4.4 อุณหภูมิ 24
2.4.5 ค่าความเป็นกรดด่าง (พีเอช) 25
2.6 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC 25

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย
3.1 อุปกรณ์ 30
3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 30
3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย 30
3.2 สารเคมี 31
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 32
3.3.1เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ 32
3.3.2 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย 32
3.3.3 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น 32
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการลดลอง 32
3.5 การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก 33
3.5.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก 33
3.5.2 ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก..... 34
3.5.3 ศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพการผลิตกรดแลกติก 34
ในฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6 การวิเคราะห์ผล 35
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ 36

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล
4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก 39
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863
4.2 การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 42
สำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863
4.3 ศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ 48
L.casei ATCC 10863ในระดับฟลาสก์และระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 57

เอกสารอ้างอิง 59
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 62
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ 64
ภาคผนวก ค ตารางผลการทดลอง 77
ภาคผนวก ง การวเคราะห์ทางสถิติ 87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก 4

2.2 สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของเชื้อ *Lactobacillus sp.* สายพันธุ์ต่าง 16

2.3 ลักษณะและความแตกต่างของ *Lactobacillus sp* 20

4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก..... 38
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

4.2 ผลของน้ำตาลกลูโคสที่มีค่าความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตกรดแลกติก 44
โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863

4.3 ผลของการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863.....52
ที่ทำการหมักภายในฟลากส์ขนาด 2 ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการหมัก
ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างของ L (+) lactic acid และ D (-) lactic acid 4
2.2 กรดพอลิแลกติกแอซิด 5
2.3 ไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลกติก 5
2.4 ไดอแกรมการใช้กรดแลกติกทางการค้าและการนำมาประยุกต์ในรูปแบบต่าง ๆ 9
2.5 โครงสร้างทางเคมีของสารไดอะซิทิล 13
2.6 วิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของกลุ่ม 17
Obligately homofermentative lactobacilli
2.7 วิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติก..... 18
ของกลุ่ม heterofermentative lactobacilli
2.8 วิถีฟอสโฟกลูโคเนตของกลุ่ม Obligately heterofermentativelactobacill 19
2.9 ตัวอย่างเครื่อง HPLC ของ Shimadzu 26
4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 39
ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน
4.2 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 39
ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน
4.3 กราฟแสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ 40
ของการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน
4.4 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863..... 41
ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน
4.5 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 42
ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน
4.6 การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ 43
ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นแหล่งคาร์บอน
4.7 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์..... 45
ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นแหล่งคาร์บอน
4.8 กราฟแสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ ของการผลิตกรดแลกติก 45
จากความเข้มข้นกลูโคสที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.9 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลง 46
โดยการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคส
ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน
4.10 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 47
ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน
4.11 การเปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าการเจริญเติบโต 47
ปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและค่าพีเอช
ที่เกิดจากการหมักกรดแลกติกที่ความเข้มข้นกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร
ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5-7.0 ที่สภาวะนิ่ง
4.12 การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในสภาวะที่เหมาะสม 50
ของแหล่งอาหาร ในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร
และน้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
4.13 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีการเปลี่ยนแปลงโดยการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 51
ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร
4.14 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 51
ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร
4.15 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 53
ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร
4.16 กราฟแสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติของการเปรียบเทียบ 53
การผลิตกรดแลกติกจากอาหารและสภาวะที่เหมาะสม
ในระดับฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร
4.17 กราฟแสดงผลที่ได้ต่างๆ ในการหมักกรดแลกติก โดยเชื้อ 54
L. casei ATCC ใน ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ชุดแรก
ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.18 กราฟแสดงผลที่ได้ต่างๆ ในการหมักกรดแลกติก โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 55
ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ชุดที่สอง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร
4.19 กราฟแสดงผลที่ได้ต่างๆ ในการหมักกรดแลกติก โดยเชื้อ *L. casei* ATCC..... 56
ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

กรดแลกติกหรือกรดนมเป็นกรดอินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในอาหาร พบตามธรรมชาติในนม เปรี้ยว ผักดองชนิดต่าง ๆ เนยแข็ง เป็นต้น (Gardner, 1972) นิยมใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร ที่มีความจำเป็นต่อวงการอุตสาหกรรมอาหารมากเพราะ กรดแลกติกที่เติมลงไปในอาหารนั้นจะเป็นตัวที่ช่วยเพิ่มกลิ่นและรสของอาหาร ช่วยควบคุมความเป็นกรดด่าง ยืดอายุการเก็บของอาหาร ช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์และการงอกของสปอร์ ช่วยเสริมประสิทธิภาพของสารป้องกันการหืนและปรับปรุงลักษณะของเนื้อผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เป็นต้น (ศิวาพร,2546) กรดแลกติกยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องหนัง เวชภัณฑ์ โลชั่น อุตสาหกรรมการทำพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plasties) (Fitzpatrick,2003)

กรดแลกติกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตกรดแลกติกโดยใช้วิธีทางเคมีเป็นวิธีที่ใช้ค่าใช้จ่ายสูงและมีความยุ่งยากในช่วงการทำให้บริสุทธิ์ ส่วนกระบวนการทางชีวภาพสามารถผลิตกรดแลกติกโดยใช้โฮโมแลกติกแอซิดแบคทีเรียเนื่องจากการผลิตกรดแลกติกสามารถใช้สารตั้งต้นร่วมกับโฮโมแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้หลายชนิด จึงได้มีการศึกษาหาวิธีที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณมากและเสียค่าใช้จ่ายในการลงทุนต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงกระบวนการการผลิตให้มีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะและองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม (senthuran และคณะ,1999)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็นแนวทางในการคิดค้นสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยศึกษาจากผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลกโตส น้ำตาลทราย น้ำตาลฟลุคโตส น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลซูโครส อีกทั้งปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยการใช้อาหารสังเคราะห์ในการผลิตเพื่อเป็นแนวทางในการหาแหล่งคาร์บอนที่ดีและเหมาะสมสำหรับการเพิ่มผลผลิตของกรดแลกติกโดยกระบวนการทางชีวภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์

1.2.2 ศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก ได้แก่

1) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) ศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

1.2.3 ศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก ได้แก่ ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์เปรียบเทียบกับการผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตร และวิเคราะห์หาค่าการเจริญเติบโตของเซลล์ กรดแลกติก น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่นำมาทดลองทั้งก่อนและหลังทำการหมัก

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

1.5.1.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1.5.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

1.4.2 การศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

1.5.2.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะต่อการผลิตกรดแลกติก

1.5.2.2 การศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

1.5.2.3 การศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกที่ใช้แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสม ในระดับฟลาสก์และระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.4.3 การวิเคราะห์ผล

1.4.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถผลิตกรดแลกติก โดยกระบวนการทางชีวภาพโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

1.5.2 ทราบถึงสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เพื่อใช้เป็นแนวทางศึกษาและพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.5.3 ทำให้ทราบถึงศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกที่ได้จากกระบวนการหมักอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

กรดแลกติกเป็นอินทรีย์กรดที่พบมากในธรรมชาติ และมีการใช้ในอาหาร จะต่างกับกรดอื่นคือมีลักษณะหนืดและเป็นของเหลวที่ไม่มีกลิ่น สำหรับ food – grade D, L- lactic acid ที่ขายทั่วไปจะเป็นสารละลายที่ไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะตัวและมีความเข้มข้น ร้อยละ 50 และ ร้อยละ 80

กรดแลคติกละลายในน้ำได้ดี ใช้มากในอุตสาหกรรมการทำไวน์ เบียร์ น้ำผลไม้ต่างๆ ทั้งชนิดที่อัดคาร์บอนไดออกไซด์และไม่อัดคาร์บอนไดออกไซด์ แยม เยลลี่ น้ำสลัดต่างๆใช้ละลาย pepper oleoresin นอกจากนี้ยังใช้ในพวกผักดอง pickles และ relishes ใช้ช่วยในการปรับความเป็นกรดด่างและเพิ่มกลิ่นรสในอุตสาหกรรมการทำเนยแข็งและ dried food cascin ใช้ปรับปรุงคุณสมบัติของ whipping ของไข่ดาว lactylated mono และ diglycerides ของ fatty acid และ stearoyl – 2 – lactylate ใช้เป็น emulsifier ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ส่วน calcium lactate ใช้ช่วยเกี่ยว firmness ของ apple slices ในระหว่างการแปรรูป ช่วยป้องกันการเปลี่ยนสีของผักและ ผลไม้และเป็นตัวช่วยให้เกิดเจลสำหรับ demethylate pectin

กรดแลคติกเตรียมได้จากการหมัก highly refined sucrose แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยเปลี่ยนให้เป็นผลึกของ calcium lactate จากนั้น decompose โดย กรดซัลฟิวริก เพื่อให้ได้กรดบริสุทธิ์ สำหรับวิธีอื่นๆ นั้นอาจจะโดยหมักแป้งมันฝรั่ง กากน้ำตาลหรือข้าวโพด โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* หรือ *Lactobacillus bulgaricus* จากนั้นใช้วิธีทำให้บริสุทธิ์แบบเดียวกันหรือจะใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายได้ หรืออาจเตรียม กรดแลกติก โดยการ hydrolyze lactonitrile

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ช่วยเพิ่มรสชาติและช่วยป้องกัน การเสื่อมในอาหารหมักดองและในผลิตภัณฑ์นม โดยทั่วไปสามารถพบกรดแลกติกในร่างกายของคน สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ได้ตามธรรมชาติ กรดแลกติกถูกตรวจพบเป็นครั้งแรกในนมเปรี้ยว โดยนักเคมีชาวสวีเดน เมื่อปี ค.ศ 1780 จึงทำให้ทราบว่ากรดแลกติกเป็นผลที่เกิดขึ้นจากการหมักจุลินทรีย์ จากการสำรวจการผลิตกรดแลกติกทั่วโลกพบว่ามีการผลิตอยู่ประมาณ 50,000 ตันต่อปี โดยสองในสามส่วนที่ผลิตได้ ได้มาจากกระบวนการหมัก ส่วนที่เหลือผลิตได้จากกระบวนการทางเคมี กรดแลกติกที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 85 ใช้กันอยู่ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยกรดแลกติกทำหน้าที่เป็นตัวปรับสภาพความเป็นกรดในอาหารเพื่อให้เกิดรสชาติของความเปรี้ยวที่พึงประสงค์ของอาหารและเครื่องดื่ม ตลอดจนการใช้ในอาหารแปรรูปและผลิตภัณฑ์ขนม กรดแลกติกยังสามารถใช้เป็นสารกันบูดเพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้กรดแลกติกในเวชภัณฑ์ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นส่วนผสมของแลกเกอร์ และสารโพลีเมอร์ได้อีกด้วย กรดแลคติกบริสุทธิ์สามารถเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ที่เรียกว่า พอลิแลกเตต เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี

2.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของกรดแลกติก

คุณสมบัติทางกายภาพ

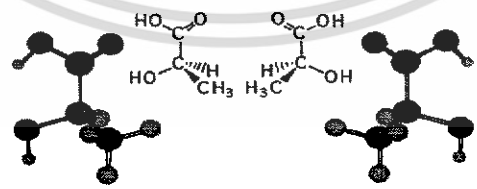
ตารางที่2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

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

ที่มา : Niju และคณะ 2004

คุณสมบัติทางเคมี

กรดแลกติกโดยทั่วไปมีชื่อทางเคมีว่า 2- hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid ซึ่งสูตรโมเลกุล $C_3H_6O_3$ กรดแลกติกมี 2 ไอโซเมอร์ ดังรูป



L (+) Lactic D (-) Lactic

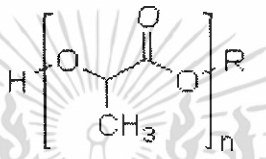
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ L(+) Lactic acid และ D(-) Lactic acid

ที่มา Nijju และคณะ 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนรูปของ L(+) Lactic acid และ D(-) Lactic acid เกิดจากการหมุนของเอทิลีนออกไซด์บริจด์ (ethylene oxide bridge) ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่หนึ่งและอะตอมที่สองโดยเกิด tautomeric shift ของไฮดรอกซิลกรุ๊ป (hydroxyl group) บนคาร์บอนอะตอมที่สองไปเป็นคาร์บอนนิลกรุ๊ป (carbonyl group) ของคาร์บอกซิล (carboxyl) กรดแลคติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสี กรดแลกติกสามารถละลายน้ำ เอทานอล อะซีโตน อีเทอร์ และไม่สามารถละลายในคลอโรฟอร์มปิโตรเลียมอีเทอร์ และคาร์บอนซัลไฟด์ (Narayanan และคณะ,2004)

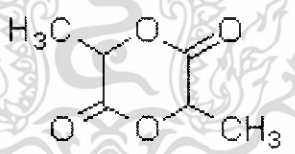
กรดแลกติกมารวมกันหลายๆ โมเลกุล ทำให้เกิดกรดพอลิแลกติก ดังรูป



รูปที่ 2.2 กรดพอลิแลกติก

ที่มา : http://www.cem.msu.edu/~smithmr/Lactide.htm

กรดแลกติกที่เกิดเป็นไซคลิกพอลิเมอร์ (cyclic polymers) เช่น lactide (3,6-dimethylp-dioxane-2,5-dione) ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติก โครงสร้างไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลกติก ดังรูปที่ 3



รูปที่ 2.3 ไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลกติก

ที่มา : http://www.cem.msu.edu/~smithmr/Lactide.htm

กรดแลกติกที่สิ่งมีชีวิตได้จะมีปริมาณความเข้มข้นต่ำ โดยกรดแลกติกความเข้มข้นสูงเป็นอันตรายต่อร่างกายทั้งภายนอกและภายใน เมื่อกรดสัมผัสกับผิวหนังจะเหมือนถูกไฟลวก เมื่อกรดถูกดวงตาสามารถทำให้ตาบอดได้ ในกรณีที่กรดถูกดวงตาหรือผิวหนังควรล้างออกด้วยน้ำสะอาดหลายๆครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กระบวนการผลิตกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ ทางเคมีและชีวภาพ

2.2.1 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี แบ่งได้ 4 ขั้นตอน

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

$$CH_3CHO + HCN \xrightarrow{\text{catalyst}} CH_3CHOHCN \quad (1)$$

Acetaldehyde *hydrogen cyanide* *lactonitrile*

ขั้นตอนที่ 2 นำ lactonitrile มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟูริกจะได้ กรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียมซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง ดังสมการที่ 2

$$CH_3CHOHCN + H_2O + 1/2H_2SO_4 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + 1/2(NH_4)_2SO_4 \quad (2)$$

Lactonitrile sulphuric acid lactic acid ammonium salt

ขั้นตอนที่ 3 นำกรดแลกติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ คือเมทิลแลคเตต นำเมทิลแลคเตตมากลั่นและย่อยจะได้กรดแลกติก ส่วนเมทานอล hydrogen cyanide และสารปนเปื้อนอื่นๆ จะถูกกำจัดออกโดยนำมาผ่านถ่านกัมมันต์ และการทำ ionexchange ดังสมการที่ 3 และ 4

$$CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOCOOCH_3 + H_2O \quad (3)$$

lactic acid *methanol* *methyl lactate*

$$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \quad (4)$$

methyl lactate *lactic acid* *methanol*

2.2.2 การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกมี 2 ชนิด คือ โฮโมแลกติกแบคทีเรียและเฮเทอโรแลกติกแบคทีเรีย ซึ่งขั้นตอนในการผลิตแลกติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงดังสมการที่ 5 และ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Glucose lactic acid

สมการที่ 5 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลกติกของโฮโมแลกติกแบคทีเรีย

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

Glucose lactic acid ethanol carbon dioxide

สมการที่ 6 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลกติกของเฮเทอโรแลกติกแบคทีเรีย

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

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

Paul และ Fitzpatrick (2002) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมและมีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งไนโตรเจนสังเคราะห์ที่มีราคาแพง โดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด และสารสกัดจากมอลต์ลงไป แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ เป็นผลิตผลพลอตได้จากโรงงานผลิตมอลต์เปรียบเทียบกับยีสต์สกัด โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้ให้ผลผลิตเทียบเท่ากับยีสต์สกัดแต่มีข้อเสียคือเมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิต ผลผลิตที่ได้จะไม่มีความบริสุทธิ์ และต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการที่ทำให้ผลผลิตมีความบริสุทธิ์

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส กาแลกโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์ และแป้ง โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงเมื่อใช้กลูโคส ฟรุกโตส และมอลโตสเป็สารตั้งต้น

Bulut และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ได้แก่ ซูโครส กลูโคส โมลาส ฝักถั่วและรำสาลี โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงขึ้นเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

2.3 การนำกรดแลกติกมาประยุกต์ใช้

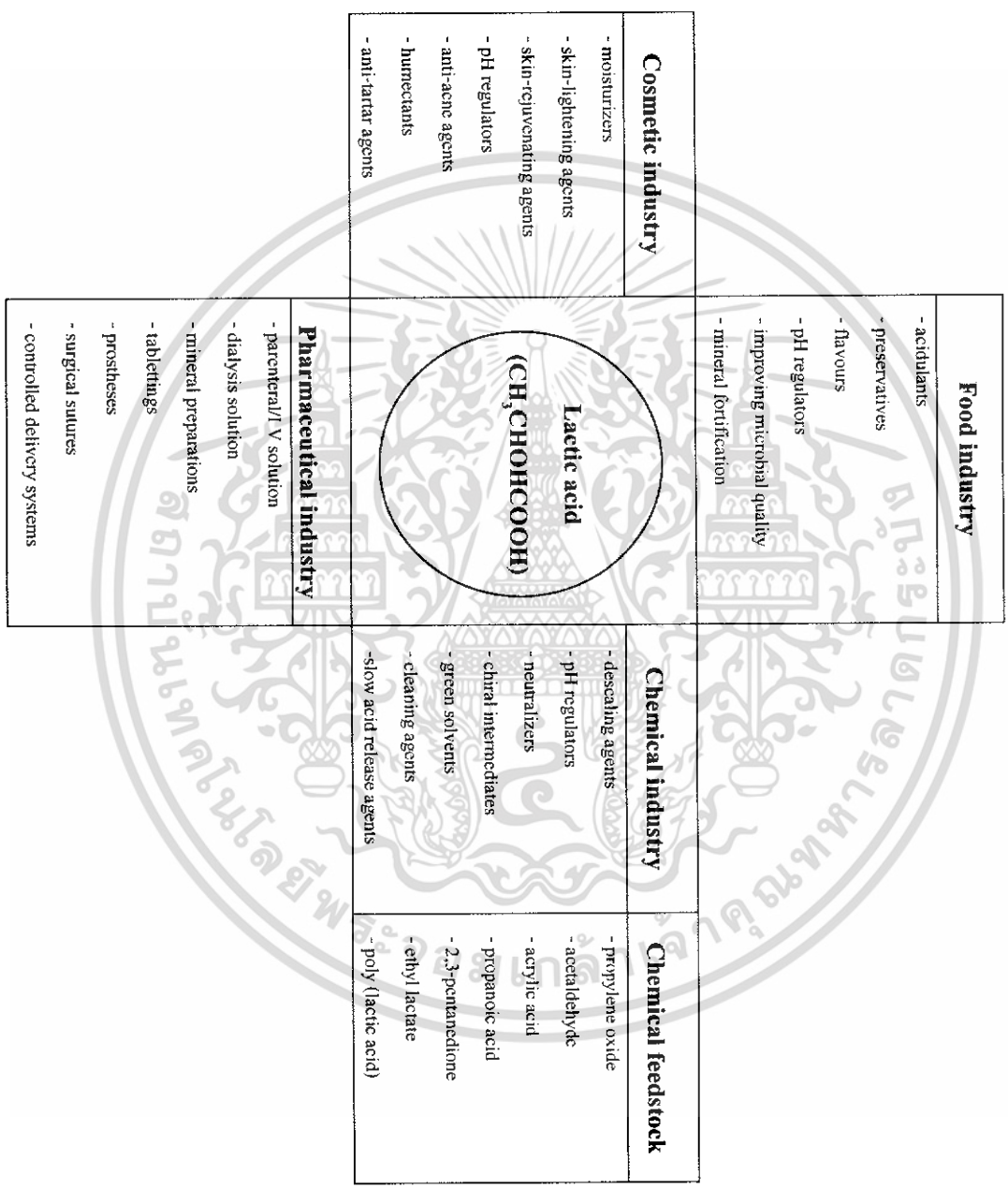
มีการนำกรดแลกติกมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในอาหาร เครื่องสำอาง เภสัชกรรม และอุตสาหกรรมเคมี และได้รับความสนใจมากขึ้นในการนำกรดแลคติกในรูปโมโนเมอร์ไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้โดยวิถีชีวภาพ กรดแลกติกสามารถผลิตได้โดยวิธีการหมักทางชีวภาพหรือการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งเรื่องวิถีของการสังเคราะห์กรดแลกติกของทั้ง 2 รูปแบบนั้น ถูกนำมาเป็นตัวตัดสินใจในการเลือกใช้ เพราะจำเป็นต้องตระหนักถึงผลที่จะเกิดกับสิ่งแวดล้อมและปิโตรเลียมในธรรมชาติที่มีอย่างจำกัด ในการผลิตกรดแลกติกมีความพยายามที่จะผลิตกรดที่มีประสิทธิภาพออกมาและใช้วัตถุดิบที่ราคาต่ำ จึงมีการใช้จุลินทรีย์มาเกี่ยวข้องในการผลิตกรดแลคติกเกิดขึ้น โดยร่วมกับกระบวนการหมักและใช้วัตถุดิบที่ราคาถูกได้ดี และได้กรดแลคติกที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายรูปแบบต่อไป ดังรูปที่ 4

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตกรดแลกติก

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก เรียกว่า แลกติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria ; LAB) ความหมายของ แลกติกแอซิดแบคทีเรียหมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกและมีความสามารถในการหมักนมให้เกิดตะกอนได้ นอกจากนี้ยังรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย ต่อมาได้พบว่าแบคที่เรียแบคทีเรียแลกติกมีเพียงแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น จึงได้มีการแยกกลุ่มแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มโคลิฟอร์มออก จากนั้นได้ให้ความหมายของแบคทีเรียแลคติกว่า ต้องเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะสำคัญ คือ ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างสปอร์มีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดแลกติก มีรูปร่างเป็นทรงกลม และแท่ง



รูปที่ 2.4 โดยแกรมการใช้กรดแลกติกทางการค้าและการนำไปประยุกต์ในรูปแบบต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตกรดแลกติก

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก เรียกว่า แลกติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria ; LAB) ความหมายของ แลกติกแอซิดแบคทีเรียหมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกและมีความสามารถในการหมักนมให้เกิดตะกอนได้ นอกจากนี้ยังรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย ต่อมาได้พบว่าแบคที่เรียแบคทีเรียแลกติกมีเพียงแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น จึงได้มีการแยกกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มออก จากนั้นได้ให้ความหมายของแบคทีเรียแลคติกว่า ต้องเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะสำคัญ คือ ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างสปอร์มีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดแลกติก มีรูปร่างเป็นทรงกลม และแท่ง

2.4.1 ลักษณะโดยทั่วไป

แบคทีเรียแลคติกสามารถย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม หรือเป็นรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์ catalase (Axelson, 1993) สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในการหมักคาร์โบไฮเดรตได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาล โดยได้จากกระบวนการ substrate – level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน เช่น วิตามินต่าง ๆ amino acid, pyrimidine สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน ไม่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนน้อย อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2- 53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30- 40 องศาเซลเซียส ส่วนช่วงพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.58 – 6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่พีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลาง หรือเป็นด่าง (Salminen และ Wright, 1993)

2.4.2 แหล่งที่พบ

แบคทีเรียแลคติกสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์จากเนื้อและปลา ไวน์ ผลไม้ และน้ำผลไม้ อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ (Salminen และ Wright, 1993)

2.4.3 ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการอาหารพิเศษ หรือ เฉพาะในการเจริญเติบโต (Fastidious microorganism) มีความต้องการสารอาหารต่างๆ ที่สำคัญได้แก่

2.4.3.1 คาร์โบไฮเดรต (Salminen และ Wright, 1993)

แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภทจาก monosaccharide ประเภท pentose เช่น arabinose, ribose และ xylose เป็นต้น และ hexose เช่น fructose และ mannose disaccharide เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

maltose trisaccharide เช่น maltotriose polymer เช่น แป้งนอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตพวก *oligosaccharides* เช่น *raffinose* และ *fructooligosaccharide* เป็นต้น ซึ่งในระบบทางเดินอาหารไม่มีเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดนี้ได้ในกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตจะได้ผลผลิต 2 แบบ คือ homofermentative ได้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว และ heterofermentative ได้กรดแลคติก กรดอะซิติก หรือ เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

2.4.3.2 ไนโตรเจน (Salminen และ Wright, 1993)

แบคทีเรียแลคติกสามารถเติบโตได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารมากหลายสายพันธุ์ต้องการ *กรดอะมิโนหลายชนิด* และจะเจริญได้น้อยมากหากไม่มีแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโนที่แบคทีเรียแลคติกต้องการ เช่น serine และ arginine เป็นต้น

2.4.3.3 วิตามิน

วิตามินที่แบคทีเรียแลคติกใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่ thiamine (B1), riboflavin (B2), pyridoxine (B6), folic acid (B9), cyanocobalamine (B12) และ nicotinic acid โดยที่ *Bifidobacterium infanntis* สามารถสังเคราะห์วิตามิน B1, B2, B6, B9 และ B12 ได้เป็นจำนวนมาก ส่วน *B. brevis* และ *B. lingum* สามารถสังเคราะห์วิตามิน B1, B2, B6, B9 และ B12 ได้เป็นจำนวนน้อย และ *B. adolescentis* ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามิน B1, B2, B6, B9 และ B12 ได้ นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์ยังต้องการ nicotinic acid, pantothenic acid, biotin, riboflavin และ folinic acid

2.4.4 ความทนทานของแลคโตบาซิลไลต่อการยับยั้งการเจริญโดยระบบทางเดินอาหาร

มีปัจจัยหลายอย่างที่ควบคุมจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร สิ่งที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อันดับแรกคือน้ำย่อยจากกระเพาะอาหารซึ่งความสามารถในการยับยั้งจะสัมพันธ์กับพีเอช และความเข้มข้นของกรดเกลือ นอกจากนี้ในกระเพาะอาหารยังมีเอนไซม์บางชนิด เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งจะทำลายแบคทีเรีย ส่วนในลำไส้นั้นจุลินทรีย์ต้องทนต่อเกลือน้ำดี (bile salt) ซึ่งจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังต้องอยู่รอดในที่มีความตึงผิวต่ำ และกลไกอีกอันหนึ่งซึ่งควบคุมจุลินทรีย์ในลำไส้คือภูมิต้านทานของสัตว์ Gilliland (1979) ได้รายงานถึงการทนกรดในกระเพาะอาหารของ *Lactobacillus* ชนิดต่าง ๆ คือ *L. casei* ทนกรดได้ดีกว่าชนิดอื่น ๆ คืออยู่รอดอย่างสมบูรณ์ใน 3 ชั่วโมงที่อยู่ในสารละลาย gastric juice สังเคราะห์ซึ่งมีพีเอช 3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วน *L. acidophilus* และ *L. plantarum* สามารถทนกรดได้ดีเช่นกัน นอกจากนี้ Shirota (1962) ได้รายงานว่า *L. acidophilus* และ *L. casei* สามารถทนกรดที่ระดับพีเอช 4.0 ได้นานถึง 21 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5 การสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นของแบคทีเรียแลคติก

2.4.5.1 กรดแลคติก

แบคทีเรียแลคติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลคติก ทำให้พีเอชของอาหารลดลงมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในทางเภสัชกรรม และอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Torriani และคณะ *(1997)* ซึ่งมีการทดสอบกรดแลคติกที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในผักสลัด พบว่าถ้าเติมกรดแลคติกร้อยละ 1 ลงไปจะมีผลในการทำลายแบคทีเรียเกือบทุกกลุ่มที่ใช้ทดสอบ แต่ยับยั้งแบคทีเรียทั้งหมดและ faecal coliform ได้เพียงบางส่วน และเมื่อเติมกรดแลคติกร้อยละ 0.5 ลงไป จะไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในผัก

2.4.5.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึม ในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* และจะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหาร เนื่องจาก *Lactobacillus* ไม่มีเอนไซม์ catalase ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย H_2O_2 ในน้ำนมดิบ H_2O_2 สามารถทำปฏิกิริยากับไทโอไซยาเนตมี lactoperoxidase เป็นตัวเร่งได้ผลิตผลที่ยับยั้งจุลินทรีย์และยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร Gilliland และ Speck (1989) พบว่า H_2O_2 ที่สร้างจาก *L. acidophilus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้

2.4.5.3 แบคทีริโอซิน(Bacteriocin)

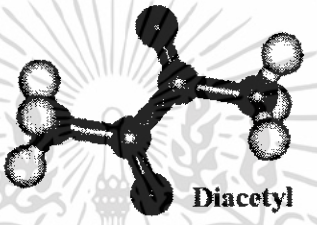
แบคทีริโอซิน คือสารโปรตีน มีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้รวดเร็ว ผลิตจากแบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus fermentu, L. heveticus, L. acidophilus, L. plantarum Pediococcus acidilactici* และ *P. pentosaceus*

แบคทีริโอซินจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ แบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus* ที่เรียกว่า nisin มีการนำไปใช้ในการถนอมอาหารมากที่สุด จากการรายงานที่ผ่านมาเกี่ยวกับการสร้างแบคทีริโอซิน ได้แก่ *L. acidophilus* มักมีการสร้าง acidophilin และ lactocidin ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินยับยั้ง *S. aureus* แบคทีเรียแกรมบวก enteropathogen และแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ (Wood และ Hodge, 1985) *L. salivarius* subsp. *salicinius* T140 สร้างแบคทีริโอซินคือ salivacin 140 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Staphylococcus aureus, Yersinia enterocolitica* และ *Listeria monocytogenes* (Arihara และคณะ, 1998) *L. salivarius* subsp. *salivarius* CRL 1328 สร้างแบคทีริโอซินซึ่งสามารถทนต่อความร้อนและสามารถฆ่าเชื้อก่อโรคในระบบสืบพันธุ์ เช่น *Neisseria gonorrhoeae* (Ocana, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5.4 ไดอะซิทิล(Diacetyl)

ไดอะซิทิลเป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก เป็นสารให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย ไดอะซิทิลที่มีความเข้มข้น 200 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรีย ส่วนที่ความเข้มข้น 300 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่า 350 μg/ml



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของสารไดอะซิทิล

(*http://www.diacetyl.dk/*)

2.2.5.5 รูทีริน (Ruterin)

รูทีรินเป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน แต่เป็น β-hydroxy propionaldehyde ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายได้ดีที่พีเอช ปานกลาง ได้จากแบคทีเรียพวก *L. reuteri* สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โปรโตซัว และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella* sp. *Staphylococcus* sp., *Listeria* sp. และ *Clostridium sp.*

2.4.6 สารต้านเชื้อราจาก lactic acid bacteria (LAB)

เพื่อใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพ (biopreservative)

2.4.6.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

ในกระบวนการหมักของ LAB นั้นจะมี 2 แบบคือ homofermentative และ heterofermentative โดยกรดแลคติคเป็นสารหลักที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ homofermentative โดยกรดแลคติคนั้นจะมีผลทำให้พีเอชของอาหารลดลง ซึ่งก็มีผลให้เชื้อจุลินทรีย์อื่นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เพราะ H^+ อิออนจะซึมผ่าน cell membrane เข้าสู่ภายในเซลล์ของเชื้อราทำให้ cytoplasm มีสภาพเป็นกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงซึ่งส่งผลให้ electrochemical proton gradient ภายในเซลล์จุลินทรีย์เสียไปด้วย

สำหรับกระบวนการหมักแบบ hetero-fermentative ของ LAB จะได้ acetic acid เป็นสารหลัก และผลิต propionic acid ในปริมาณเล็กน้อย แต่กรดทั้งสองชนิดจะมีค่า pKa ที่สูงมากกว่า lactic acid โดยกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก็จะเหมือนกับของ lactic acid คือจะมีผลต่อ electrochemical proton gradient และไปยับยั้ง amino acid uptake ภายในเซลล์ของเชื้อรา โดยฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราจะให้ผลดีที่พีเอช ต่ำกว่า 4.5 นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ lactic acid ร่วมกับ acetic acid และ propionic acid จะสามารถยับยั้ง การเจริญของยีสต์ได้ดีกว่าการใช้กรดเพียงชนิดเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ในการยับยั้งเชื้อรา

นอกจาก organic acid ที่ได้จากกระบวนการหมักแล้ว ยังมี end product อื่นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ คือ hydrogen peroxide และ diacetyl LAB ส่วนใหญ่มี enzyme flavoprotein oxidase ทำให้สามารถผลิต hydrogen peroxide ได้โดย hydrogen peroxide นี้ก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยจะทำให้เกิด oxidizing effect ภายในเซลล์ และจะไปทำลายโครงสร้างโมเลกุลของ cellular protein สำหรับ diacetyl (2,3-butanedione) ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นที่ได้จากการทำเนยโดย LAB ก็มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการใช้ diacetyl สำหรับเป็นสารต้านเชื้อรานั้นต้องใช้ในปริมาณสูงจึงจะเห็นผล (200 mM) ซึ่งก็จะมีผลต่อรสและกลิ่นของผลิตภัณฑ์

2.4.6.2 สารประกอบโปรตีน *(Proteinaceous compounds)*

Ribosome ของ LAB สามารถสังเคราะห์ peptide หรือ protein ได้ ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราของ LAB จะสูญเสียไปเมื่อมีการ treat ด้วย proteolytic enzyme ซึ่งต่อมาพบว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราเป็นพวก proteinaceous compounds โดยจากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* spp. ของ *Lactobacillus casei* พบว่าฤทธิ์จะลดลงเมื่อใส่ trypsin หรือ pepsin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในหญ้าหมัก (silage) พบว่า มีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง aflatoxin ต่อ *Aspergillus flavus* โดยสารที่มีฤทธิ์นี้เป็นสารกลุ่ม peptide (< 1 kDa) มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้กว้าง ทนความร้อนและออกฤทธิ์ได้ดีที่พีเอช 3-6 แต่จะถูกทำลายได้ด้วย proteinase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.6.3 สารรูทีริน (Reuterin)

Reuterin เป็นสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum) พบครั้งแรกจากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* โดย reuterin เป็นสารที่ได้จากการ oxidize glycerol โดย LAB ในสภาพ anaerobic โดยทั่วไป LAB จะไม่มี oxidative pathway สำหรับ glycerol หรือ glycerol ไม่สามารถถูกใช้เป็น c-source เดี่ยวได้ ดังนั้นวิธีการเดียวที่จะใช้ glycerol ของ LAB ได้ คือ การทำให้ LAB เข้าสู่ intermediate state ของ 3-hydroxypropionaldehyde (reuterin, 3-HPD) พบว่า reuterin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ รา โดยพบฤทธิ์ต้านเชื้อต่อ *Candida, Torulopsis, Saccharomyces, Aspergillus* และ *Fusarium* spp. และพบว่าการเติม glycerol ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus coryniformsis* จะช่วยเพิ่มฤทธิ์ของสารต้านเชื้อราได้

2.4.6.4 กรดไขมัน (Fatty acid)

จากการแยกสารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 ในอาหารเหลว พบว่ามี fatty acid คือ 3-hydroxylated fatty acid ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยฤทธิ์ต้านเชื้อราจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของ chain ที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่า caprylic (C8) acid และสายที่ยาวกว่านี้จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงสุด มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ของ fatty acid และ monoglyceride ต่อการเจริญของ *Candida albicans* พบว่าที่ความเข้มข้น 10 mM ของ fatty acid มีเพียง capric (C_{10}) acid และ lauric (C_{12}) acid ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์นี้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า fatty acid จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดีกว่าเชื้อรา โดยค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของ hydroxylated fatty acid ต่อเชื้อราและยีสต์จะอยู่ในช่วง 10-100 µg/ml ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับ amphotericin B ซึ่งมีค่า MIC อยู่ในช่วง µg/ml เช่นกัน

2.4.6.5 กรดฟีนิลแลคติค (Phenyllactic acid)

จากการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* 21 B ในอาหารเหลวพบว่าเชื้อ LAB สามารถผลิต phenyllactic acid และ 4-hydroxy-phenyllactic acid ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเส้นใยหลายสายพันธุ์ โดย phenyllactic acid มีค่า MIC อยู่ในช่วง mg/ml ได้มีการนำเชื้อ L. plantarum มาเป็น starter สำหรับการผลิตขนมปังร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าช่วยยืดอายุ shelf life และป้องกันเชื้อราบนขนมปังได้ สำหรับการทดลองในอาหารสัตว์ โดยนำเชื้อ L. plantarum เลี้ยงในหญ้าหมัก พบว่าจะช่วยเพิ่ม aerobic stability และลดปริมาณยีสต์ และเชื้อราได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า phenyllactic acid จะช่วยเสริมการออกฤทธิ์ของสารต้านเชื้อราอื่นๆ ที่ผลิตโดย LAB ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ *Lactobacillus* สายพันธุ์ต่างๆ (Robert และคณะ, 1992)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	สารยับยั้งที่ผลิต
L. acidophilus	acidolin
	acidophilin
	lactacin B
L. bulgaricus	bulgaricin
L.helveticus	lactocin 27
	helvecitin J
L.plantarum	plantacin B
	plantaricin A
	plantaricin SIK 83
L.reuteri	reutein
L.sake	sakacin A
	lactocin S

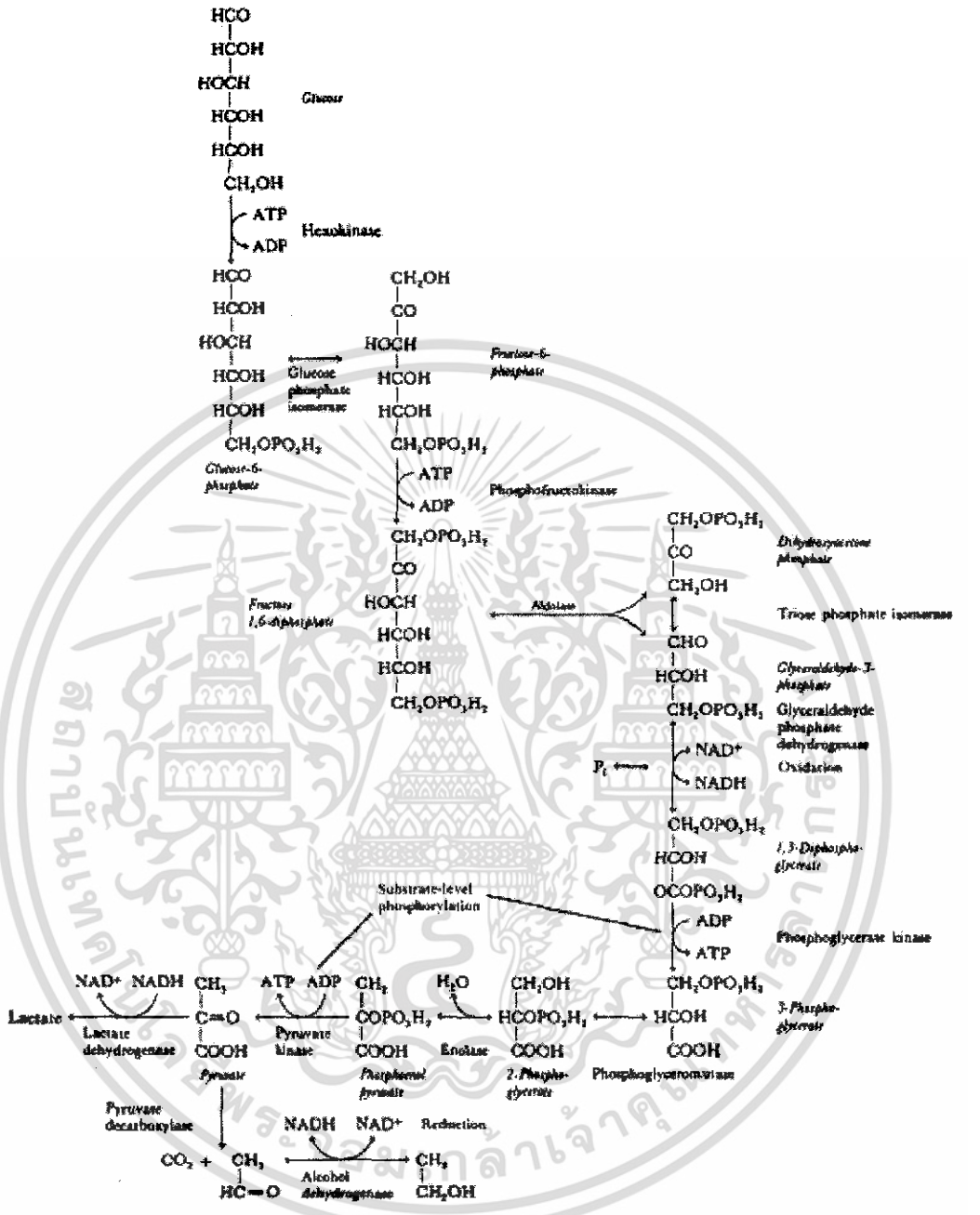
Lactobacillus sp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบริเวณช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์เพศหญิง เป็น Facultative หรือ strictly aerobe หรือ microaerophile การเพาะเลี้ยงเชื้อมักทำในอาหารเลี้ยงเชื้อในบริเวณที่มีแบคทีเรียชนิดนี้เจริญอยู่ ปรับ pH โดยผลิตกรดแลกติกออกมาและยังพบว่าเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ *Lactobacillus sp.* จัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ

1. กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลกติก โดยวิธี Embden- Meyerhof- Parnas (EMP) จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ Fructose-1, 6-bisphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketo- lase ดังนั้นจึงสามารถหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนตไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.6 วิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของกลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli (www.brighton73.freeseve.co.uk)

72608

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลกติกโดยวิธี (EMP) จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase ดังนั้นจึงสามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโตส

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กลุ่ม Obligately heterofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโตส ผ่านทางวิถี ฟอสโฟกลูโคเนตเป็นแลคเตต เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์

รูปที่ 2.8 วิถีฟอสโฟกลูโคเนต

(www.brighton73.freeseve.co.uk)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แลคโตบาซิลลัส *(Lactobacillus sp.)* เป็นแลกติกแคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของฟีโนไทป์ คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของโมเลกลุเปอร์เซ็นต์ G +C ภายในสกุลสูง ระหว่างร้อยละ 32 – 53 (Bd,Tm) สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 2 – 53 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีและเหมาะสมที่ 30- 40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริยอยู่ในช่วง 5.5 – 6.2 หรืออาจเจริญได้ที่พีเอช 5.0 หรือต่ำกว่านี้ได้ (Sneath และคณะ , 1984)

ตารางที่ 2.3 ลักษณะและความแตกต่างของ *Lactobacillus sp.*

ลักษณะ	**Obligately homofermentative**	**Facultatively heterofermentative**	**Obligately heterofermentative**
การหมักน้ำตาลเพนโตส	-	+	+
การสร้างก๊าซ CO_2 จากกลูโคส	-	-	+
การสร้างก๊าซ CO_2 จากกลูโคเนส	-	+	+
เอนไซม์ FDP-aldolase	+	+	-
เอนไซม์ Phosphoketolase	-	+	+
	Lb. acidophilus	*Lb. casei*	*Lb. brevis*
	Lb. delbruckii	*Lb. curvatas*	*Lb. buchneri*
	Lb. helveticus	*Lb. plantarum*	*Lb. fermentum*
	Lb. salivarius	*Lb. sakei*	*Lb. reutri*

ที่มา : Salminen และคณะ , 1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ในกลุ่มแลคโตบาซิลลัสที่น่าสนใจคือ *Lactobacillus casei*

Scientific classification

Kingdom:	Bacteria
Division:	Firmicutes
Class:	Bacilli
Order:	Lactobacillales
Family:	Lactobacillaceae
Genus:	*Lactobacillus*
Species:	*Lactobacillus casei*

จุลินทรีย์ *L. casei* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างเป็นแท่ง หรือบางครั้งจะเป็น rod เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการอยู่รอด ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีการสร้างสปอร์ เซลล์มีขนาดประมาณ 0.7-1.1 x 2.0-4.0 μm เป็นกลุ่มแบคทีเรียสร้างกรดแลคติคที่สำคัญระดับวงการอุตสาหกรรม เหมือนแบคทีเรียตัวอื่น *L. casei* มีความสามารถในการทนสภาวะกรดได้ดี ไม่สามารถสังเคราะห์ porphyrins และมีความสามารถในการหมักกรดแลคติค จัดเป็นพวก Heterofermentative คือสามารถผลิตกรดแลคติคจากน้ำตาลเฮกโซส ภายใต้วิถีชีวเคมี Embden-Meyerhof และจากการใช้น้ำตาลเพนโตส ในวิถีชีวเคมี 6-phosphogluconate/phosphoketolase สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 15 องศา-เซลเซียส แต่จะไม่เจริญถ้าอุณหภูมิเกิน 45 องศาเซลเซียส การเจริญเติบโตจำเป็นต้องใช้ วิตามินบี กรดโฟลิค calcium pantothenate และไนอะซิน เป็นปัจจัยช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์

L.casei เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการปรับสภาพตัวเองให้อยู่รอดในสภาพแวดล้อมต่างๆได้ ดี และสามารถแยกเชื้อได้หลายทาง เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมักทั่วไป พืชที่มีการกองทับถมกันจนเกิดการหมักชื้น และกระทั่งในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ทั่วไป ในระดับอุตสาหกรรม *L. casei ถูกนำมาใช้เป็นโปรไบโอติคผลิตเป็นอาหารเสริมของคนที่มีประโยชน์แก่ร่างกายผู้ที่บริโภค* เช่น นมเปรี้ยว เนยแข็งหรือชีส ซึ่งจะทำให้อาหารมีกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์และถูกปากผู้บริโภค

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่สำคัญในท้องตลาดเช่น ยาคูลท์ (Yakult, *Yakuruto*') หรือโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ได้จากการหมักของนมที่ผ่านการแยกเอาไขมันออก และมีการเติมแต่งรสหวานเพิ่มเข้าไปด้วยน้ำตาลหรือสารให้รสหวานโดยใช้แบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์พิเศษที่ชื่อว่า *Lactobacillus casei Shirota.* เนื่องจากสายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์ตามธรรมชาติทั่วไป ค้นพบมาจากในระบบย่อยอาหารของคน 1 ขวด บริโภคมีจุลินทรีย์ดังกล่าวทีมีชีวิตถึง 8,000 ล้านเซลล์ ดังนั้นยาคูลท์มีประโยชน์ต่อสุขภาพมากโดยเฉพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเรื่องของลำไส้และระบบขับถ่าย ของผู้บริโภคเป็นอย่างมากและยังได้รับกลิ่นของกรดซิตริคที่เป็นธรรมชาติอีกด้วย

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของ Lactic Acid Bacteria (LAB)

2.5.1 แหล่งคาร์บอน

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

Yun และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตกรดแลกติก จากเชื้อ *Enterococcus faecalis* RYK 1แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกาแลกโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์และแป้ง พบว่าในน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตสและน้ำตาลมอลโตส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 18.18 17.95 และ 16.80 ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลกาแลกโตส น้ำตาลแลกโตส กลีเซอรอล โซโลส เวย์และแป้งจะให้ปริมาณกรดแลกติก 2.7 1.26 2.24 1.68 1.83 และ 1.19 ตามลำดับซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำ

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด โดยนำมาย่อยกับเอนไซม์ และจึงนำผลิตกรดแลกติก ด้วยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RYK 1 พบว่า เมื่อใช้ข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลีเป็นสารตั้งต้นจะให้ปริอมาณกรดแลกติกมากว่า กรัมต่อลิจร ต่อชั่วโมง เมื่ออาหารประกอบด้วยแป้งสาลีที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 200 กรัมต่อลิตร แป้งข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงถึง 5.36 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณเซลลจะสูงถึง 14.08กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้แป้งสาลีเพียงอย่างเดียว

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส แลกโตส กาแลกโตส ไซโลส มอลโตส ที่สามารถให้ปริมาณกรดที่สูง โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่า กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเศษอาหารเหลือทิ้งจากโรงอาหารโดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 19.5 กรัมต่อ 200 กรัมสารตั้งต้น

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

Wee และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ปริมาณต่างๆได้แก่ 50 *75 100 และ 125 กรัมต่อลิตร* พบว่าที่ปริมาณน้ำตาล *125 กรัมต่อลิตร*ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาออิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ถั่วเหลืองและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในเวย์และกลูโคสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดีและเหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกได้แก่ ยีสต์สกัด

Kolozik และคณะ (1999) พบว่าเมื่อเติมยีสต์สกัดลงไปในเวย์จะทำให้ชีวมวลและปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นแต่เมื่อไม่เติมยีสต์สกัดการเจริญของเซลล์และปริมาณกรดจะน้อย

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

2.5.3 แหล่งแร่ธาตุ

Fitzpatrick และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่มีการเติมแมงกานีสในรูป $MnSO_4.H_2O$ ร่วมกับยีสต์สกัดลงไปในเวย์ พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดจะสั้นลงและเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตสได้ดี แต่เมื่อไม่มีการเติมแมงกานีสเวลาที่ใช้ในการผลิตจะนานขึ้น และเชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลแลกโตสไปใช้ได้เท่าที่ควร

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

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

2.5.4 อุณหภูมิ

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5 ความเป็นกรดเป็นด่าง

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

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

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

2.6 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)

2.6.1 ทฤษฎีและความรู้ทั่วไป

เทคนิควิธีโครมาโตกราฟฟี่ชนิดของเหลวความดันสูง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เทคนิควิธีโครมาโตกราฟฟี่ชนิดของเหลวความดันสูง (HPLC) เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่นิยมกันอย่างมาก เพราะว่าง่ายต่อการใช้งาน, มีประสิทธิภาพวิธีที่สูง และไม่มีข้อจำกัดใดๆ ในเรื่องของการระเหยหรือความเสถียรของสารประกอบตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

ก่อนทศวรรษ 1970 วิธีการ Chromatographic method ได้นำมาใช้ในการทำงานของนักวิทยาศาสตร์น้อยมาก ต่อมาในช่วงทศวรรษ1970 กระบวนการการแยกสารเคมีมีวิธีการต่างๆ มากมาย เช่น open- column chromatography , paper chromatography และ thin-layer chromatography แต่วิธีการเหล่านี้ก็ยังไม่เพียงพอต่อการหาปริมาณและการแยกสารประกอบที่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันได้ ในช่วงทศวรรษ 1970 นี้ วิธีการ Pressure liquid chromatography ได้นำมาใช้เพื่อลดช่วงเวลาการไหลผ่าน ดังนั้นการลดเวลาในการทำสารประกอบให้บริสุทธิ์ ถูกแยกโดย Column chromatography แต่อัตราการไหลไม่คงที่ซึ่งเป็นข้อโต้เถียงกันว่า หากอัตราการไหลหรือความดันคงที่จะทำให้การแยกสารประกอบได้ผลที่ดีขึ้นหรือไม่ High pressure liquid chromatography ถูกพัฒนาขึ้นมาในกลางทศวรรษที่1970 และถูกพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็วพร้อม ๆ กันกับการพัฒนาอุปกรณ์ที่นำมาใช้ทำเป็น Column และมีการเชื่อมต่อกับตัวตรวจวัด (detector) ในปลายทศวรรษที่1970 วิธีการใหม่ๆ เช่น Reverse phase liquid chromatography มีความสามารถที่จะทำการแยกสารประกอบที่มีความคล้ายคลึงมากๆได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

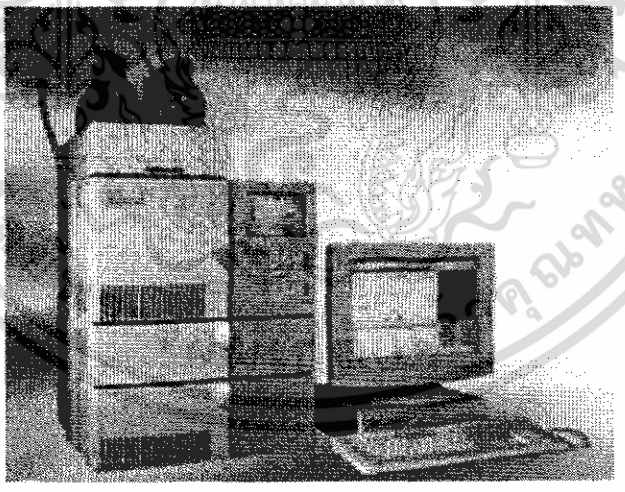
ในช่วง ทศวรรษที่ 1980 เทคนิควิธีโครมาโตกราฟฟี่ชนิดของเหลวความดันสูง ได้นำมาใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไปเพื่อการแยกสารประกอบเคมี ซึ่งวิธีการนี้ทำให้การแยก การจำแนก การทำให้บริสุทธิ์ และการหาปริมาณของสารประกอบได้ดีกว่าวิธีอื่นที่กล่าวมา มีระบบคอมพิวเตอร์และระบบกลไกอัตโนมัติทำให้เพิ่มความสะดวกต่อการใช้เทคนิควิธีโครมาโตกราฟฟี่ชนิดของเหลวความดันสูงมากขึ้น ชนิดของ Column ก็ดีกว่าColumn ที่ได้ผลิตขึ้นได้แก่ Micro-Column, Affinity Column

ทศวรรษที่ผ่านมา มีการดำเนินงานด้านการพัฒนา Micro-Column และ Column ชนิดพิเศษอื่นๆ กันอย่างกว้างขวาง โดยทั่วไปแล้ว HPLC column สามารถวัดความยาวได้เป็นหลักร้อยในหน่วยมิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร Micro-Columnหรือ Capillary Column โดยทั่ว ๆไป มีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 3 -200 ไมโครเมตร (1/1000 มิลลิเมตร) ส่วน Fast HPLC จะใช้ Column ที่สั้นกว่าซึ่งมีความยาวของ Column ประมาณ 30 มิลลิเมตร และภายใน Column จะบรรจุด้วยเศษชิ้นส่วน (particles) ที่เล็กกว่า

ในปัจจุบันนี้มีชนิดของ Column ให้เลือกได้มากมาย เพื่อความเหมาะสมในการแยกสารประ- กอบเคมี และ detector มีหลายชนิดเช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่าเทคนิควิธีโครมาโตกราฟฟี่ชนิดของเหลวความดันสูงเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยในการตัดสินใจในงานวิจัยทางด้าน Biotechnological, Biomedical และ Biochemical ทางด้านPharmaceutical industry มีการใช้ประมาณ 50 % ของผู้ใช้ HPLC ทั้งหมด แต่ปัจจุบันนี้ HPLC ได้ถูกนำมาใช้ทางด้าน Energy, Cosmetic, Food และ Environmental industries ด้วย



รูปที่ 2.9 ตัวอย่างเครื่อง HPLC ของ Shimadzu

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 ทฤษฎีการปฏิบัติ

1) Stationary phase ใน HPLC หมายถึง ของแข็งที่บรรจุอยู่ใน column ซึ่ง mobile phase จะไหลผ่านอย่างต่อเนื่อง สารละลายตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าไปยัง mobile phase ที่ไหลผ่าน injector port สารละลายตัวอย่างจะไหลไปพร้อม mobile phase องค์ประกอบสารละลายที่แพร่ไป จะเกิดปฏิกิริยากับ stationary phase แบบ non- covalent ปฏิกิริยาของ stationary phase และตัวอย่าง ร่วมกับ mobile phase จะทำให้เกิดการแพร่หรือการแยกตัวขององค์ประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ stationary phase มากกว่า ทำปฏิกิริยากับ mobile phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกมาจาก column ได้ช้ากว่า และมี retention time นานกว่า ตรงกันข้ามกับตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ mobile phase มากกว่า stationary phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกจาก column ได้เร็วกว่าและมี retention time น้อยกว่า

2) Mobile phase ใน HPLC หมายถึง ตัวทำละลายที่จะใช้กับ column หรือ stationary phase อย่างต่อเนื่อง mobile phase เปรียบเสมือนตัวพาสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสารละลายตัวอย่างถูกฉีดเข้าไปยัง mobile phase ผ่านไปยัง injector port สารละลายตัวอย่างจะไหลผ่าน column ไปพร้อม ๆ กันกับ mobile phase องค์ประกอบของสารละลายที่แพร่ผ่านไปจะทำปฏิกิริยากันแบบ non-covalent กับ column ปฏิกิริยาทางเคมีของ mobile phase + ตัวอย่าง กับ column เป็นการควบคุมการแพร่และการแยกตัวขององค์ประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างทีมีปฏิกิริยาที่รุนแรงกับ mobile phase มากกว่า stationary phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกมาจาก column เร็วกว่านและมี retention time สั้นกว่า แต่ถ้าตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงกับ stationary phase มากกว่า mobile phase จะทำให้ตัวอย่างหลุดออกาจาก column ได้ช้ากว่า และมี retention time นานกว่า mobile phase สามารถเปลี่ยนได้เพื่อควบคุมการเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่าง และ stationary phase ซึ่ง mobile phase มีหลายชนิดได้แก่ isocratic , gradient และ polytypic

3) Injector for HPLC ตัวอย่างที่ถูกเข้าไปใน HPLC จะผ่านเข้าไปใน injection port โดยทั่วไป injection port ใน HPLC นั้นประกอบด้วย injection valve และ sample loop ตัวอย่างจะถูกละลายใน mobile phase ก่อนที่จะถูกฉีดเข้าไปใน sample loop ผ่านทาง injection valve การหมุนรอบของ valve จะเป็นการปิด - เปิด เพื่อฉีดตัวอย่างเข้าไปยัง mobile phase ที่ไหลอยู่ ปริมาตรของ loop ประมาณ 10 ไมโครลิตรถึงมากกว่า 500 ไมโครลิตร สำหรับ HPLC ที่มีความทันสมัยการฉีดตัวอย่างเข้าไปจะใช้ระบบกลไกอัตโนมัติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) HPLC pumps มีหลายชนิดสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC เช่น reciprocating piston pumps ประกอบด้วย motor เล็ก ๆ สำหรับดันลูกสูบให้เคลื่อนที่ไป หน้า -หลัง อย่างรวดเร็ว มีห้อง hydraulic ปริมาตร 35-400 ไมโครลิตร จังหวะที่ลูกสูบถูกดึงมาด้านหลัง the separate column vale จะถูกปิด แล้วลูกสูบจะดูดตัวทำละลายจากที่เก็บ Mobile phase ในจังหวะที่ลูกสูบดันไปข้างหน้า pump จะดันสารตัวทำละลายออกสู่ column จากที่เก็บ ช่วงของอัตราการไหลสามารถเปลี่ยนได้โดยการเปลี่ยนจังหวะปริมาตรของลูกสูบแต่ละรอบ หรือเปลี่ยนจังหวะความถี่ pump ชนิดที่มีสองหรือสามหัว ประกอบด้วยห้องสูบเหมือนกัน ซึ่งทำให้มีมุมต่างกัน 180 หรือ 120 องศา ระบบ pump นี้มีการปั๊มได้อย่างสม่ำเสมอ เพราะว่าเมื่อปั๊มรอบหนึ่งเต็มปั๊มรอบต่อไปจะส่งรอบต่อ

5) Detector สำหรับ HPLC คือ องค์ประกอบหนึ่งที่ตอบสนองต่อสารประกอบตัวอย่างที่หลุดออกมาและให้ peak ปรากฏบน chromatograph ในภายหลัง detector จะอยู่ตรงตำแหน่งที่ถัดจาก stationary phase เพื่อคอยตรวจสอบสารประกอบที่หลุดออกมาจาก column ความกว้างและความสูงของ peak โดยทั่วไปสามารถปรับให้มีความหยาบ ละเอียดได้ และพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบก็สามารถควบคุมได้

6) Degaser เป็นอุปกรณ์ที่สำคัญสำหรับทำลายแก๊สที่เกิดขึ้นใน mobile phase เพราะ แก๊สที่เกิดขึ้นมีผลต่อการ detect และทำให้ column เสียหาย

2.6.3 การประยุกต์ใช้ HPLC

1) Preparative HPLC หมายถึงการใช้ HPLC ในการทำสารประกอบให้บริสุทธิ์ แยกเป็นสารเดี่ยว ๆ ที่สำคัญคือระดับความบริสุทธิ์ของสารละลาย ซึ่งเป็นจำนวนของสารประกอบที่ถูกผลิตขึ้นต่อหน่วยเวลา สิ่งที่จะได้จากการวิเคราะห์ HPLC คือ ข้อมูลเกี่ยวกับ สารประกอบตัวอย่าง ซึ่งข้อมูลเหล่านั้นได้แก่ ชนิด ปริมาณ และการแยกออกจากกันของสารประกอบ

2) Chemical Separations ในการแยกสารเคมีสามารถใช้ HPLC ทำได้ โดยอาศัยประโยชน์จากคุณสมบัติของสารประกอบที่มีอัตราการแพร่ภายใน Column และ Mobile phase ที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถแยกสารประกอบเคมีหลาย ๆ ชนิดออกจากกันได้ และในการใช้ HPLC ในการแยกสารประกอบเคมีนี้สิ่งที่เป็นตัวควบคุมหรือมีอิทธิพลต่อการแยกของสารเคมีคือ การเลือกใช้ stationary phase และ mobile phase

3) Purification หมายถึงขบวนการแยกหรือขบวนการสกัดสารประกอบเคมีที่เราต้องการออกจากสารประกอบอื่นหรือสิ่งเจือปนต่าง ๆ สารประกอบแต่ละตัวจะมีลักษณะของ peak ภายใต้เงื่อนไขของ chromatographic ที่จะสามารถรับรู้ได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับว่าสารประกอบที่จะทำการแยกคืออะไร และสัมพันธ์กับสารตัวอย่างอย่างไร chromatographer อาจต้องเลือกเงื่อนไข เลือกคุณสมบัติของ mobile phase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ติดตามกระบวนการแยก ตลอดจนกระทั่งสารประกอบที่ต้องการมีการรวมกันและหลุดออกจาก stationary phase การแพร่ของสารประกอบและสารปนเปื้อนอื่น ๆ จะแพร่ผ่าน column แตกต่างกันพอที่จะได้สารประกอบที่ต้องการมีความบริสุทธิ์ได้

4) Identification การจำแนกชนิดของสารประกอบโดยใช้ HPLC นั้น เป็นขั้นตอนหนึ่งของการตรวจสอบด้วย HPLC ในการจำแนกสารประกอบใด ๆ ก็ตาม สิ่งที่ควรเลือกเป็นอันดับแรกคือ detector เมื่อเลือกมาแล้วมาติดตั้งไว้ในตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะทำการตรวจสอบ พารามิเตอร์ของขบวนการตรวจสอบนี้ จะให้ peak ของสารประกอบตัวอย่างอย่างชัดเจน ซึ่งสังเกตได้จาก peak ที่ปรากฏบน chromatograph การจำแนก peak จะใช้ retention time และใช้ peak ที่แยกออกจาก peak ที่ไม่ต้องการ ซึ่งขบวนการตรวจสอบจะแสดงออกมา การเปลี่ยนแปลง retention time ของสารประกอบ พารามิเตอร์หลาย ๆ ตัวสามารถตรวจจับได้ การจำแนกชนิดของสารประกอบโดยใช้ HPLC กระทำได้โดยการค้นคว้าจากหนังสือ, วารสาร และการลองผิดลองถูก ตัวอย่างของสารประกอบที่เราทราบแล้วว่าเป็นอะไรจะเป็นประโยชน์ต่อการจำแนกชนิดของสารประกอบที่เรายังไม่ทราบได้ การจำแนกชนิดของสารประกอบเพื่อยืนยันความถูกต้องนั้นควรใช้วิธีการตรวจสอบตั้งแต่ 2 วิธีขึ้นไปประกอบกัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการ

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กับเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) การหาน้ำตาลกลูโคส ดูในภาคผนวก

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ของบริษัท Shimadzu

รุ่น C-R7 Ao plas

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอ(Autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMAZU รุ่น LIBROR EB-40000H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200S

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

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องอบรมลมร้อน ของบริษัท Binder

ตู้บ่มปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT123

เครื่องเขย่าของบริษัท Gallenkamp

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX^{R}

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^{R}

กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท PYREX^{R}

*บีกเกอร์ (beaker)*ของบริษัท PYREX^{R}

ดิวเวต (แก้ว)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิเปตต์ (pipette)

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

เข็มเขี่ยเชื้อ (niddle)

คิวเวต (แก้ว)

3.2 สารเคมี

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)

เปปโตน (peptone)

แลคโตส (lactose)

ดี-กลูโคส (D-glucose)

ซูโครส (sucrose)

ดี-มอลโตส (D-maltose)

ฟรุคโตส (fructose)

อาหารสำเร็จรูป เอ็มอาร์เอส (MRS)

วุ้น (agar)

น้ำกลั่น

ยูเรีย (urea)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)

แมงกานีสซัลเฟส ($MnSO_4.4H_2O$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)

กรดซัลฟิวริก เข้มข้น(conc.H_2SO_4)

สารละลายพีนอล 5 %

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส(KH_2PO_4)

กรดฟอสฟอริก(H_3PO_4)

เมธทานอล

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ไฮโดรคลอริก (HCl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

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

3.3.1.1 การเก็บรักษาเชื้อในการวิจัย

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อจำนวน 1 ลูป เขี่ยเชื้อแล้วลาก (streak) ลงในอาหารแข็ง (MRS agar) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Idris และ Suzuna, 2006) เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันจุกสำลีที่ทับปิดปากหลอดทดลองให้สนิท เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อหรือลงในอาหารใหม่ (Subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.3.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว (MRS broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 rpm (Wagner และคณะ, 1994) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

สารสกัดยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลกลูโคส	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส	1	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟส	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.1	กรัมต่อลิตร

ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.2-7.0 (Idris และ Suzuna, 2006) แล้วนำอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้ว ไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (แยกฆ่าเชื้อสารละลายน้ำตาลโดยแยกน้ำตาลมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายกับน้ำกลั่นโดยแบ่งน้ำกลั่นบางส่วนจาก 1,000 มิลลิลิตร มาทำการละลาย โดยฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งไอน้ำที่ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที)

3.5 การศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

3.5.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

โดยใช้สูตรอาหารที่ทำให้เชื้อผลิตกรดแลกติดได้จากข้อ 3.4 โดยทำการผันแปรชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เติมลงไปในอาหารสังเคราะห์ดังนี้

สูตรที่ 1 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 ซึ่งใช้กลูโคส 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 โดยเปลี่ยนสารอาหารจากกลูโคส 40 กรัมต่อลิตรเป็น ดี-กลูโคส 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

สูตรที่ 3 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 โดยเปลี่ยนสารอาหารจากกลูโคส 40 กรัมต่อลิตรเป็น ดี-มอลโตส 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

สูตรที่ 4 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 โดยเปลี่ยนสารอาหารจากกลูโคส 40 กรัมต่อลิตรเป็น ฟรุคโตส 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

สูตรที่ 5 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 โดยเปลี่ยนสารอาหารจากกลูโคส 40 กรัมต่อลิตรเป็น ซูโครส 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

สูตรที่ 6 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 โดยเปลี่ยนสารอาหารจากกลูโคส 40 กรัมต่อลิตรเป็น น้ำตาลทราย 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

เตรียมอาหารแต่ละสูตรแล้วใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรปริมาณ 166.25 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5-7.0 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (แยกฆ่าเชื้อสารละลายน้ำตาลโดยแยกน้ำตาลมาละลายกับน้ำกลั่นโดยแบ่งน้ำกลั่นบางส่วนจาก 1,000 มิลลิลิตร มาทำการละลาย โดยฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งไอน้ำที่ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที)โดยให้ปริมาตรของอาหารและหัวเชื้อรวมกันคิดเป็นร้อยละ 70 ของปริมาตรฟลาสก์ (เติมอาหาร 166.25 มิลลิลิตร รวมกับหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.3.1.2 ประมาณ 8.75 มิลลิลิตร) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ คือแต่ละสูตรอาหารจะทำการเตรียม 3 ฟลาสก์ อาหารในฟลาสก์ใบแรกใช้ในการทำตัวเปรียบเทียบ (Blank) ส่วนอีก 2 ฟลาสก์ทำการเติมหัวเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง (Stationary flask) โดยในขณะทำการทดลองให้ทำการเก็บน้ำหมักทุก ๆ 12 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 96 วิเคราะห์หาปริมาณชีวมวลตามวิธีของ AOAC; 2000 ปริมาณกรดแลกติกโดย HPLC (กรัมต่อลิตร) และวัดปริมาณน้ำตาลโดยวิธีการวิเคราะห์ของ Dubois (กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อลิตร) ปริมาณผลได้ หรือ %Yield (กรัมกรดแลกติกต่อกรัมกลูโคส) และ อัตราการผลิตต่อชั่วโมง (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

3.5.2 ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

เลือกแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อผลิตกรดแลกติกได้ดีที่สุดจากข้อ 3.5.1 โดยผันแปรความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ดังนี้

สูตรที่ 1 : สูตรอาหารที่เลือกจากข้อ 3.5.1 ใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 2 : สูตรอาหารที่เลือกจากข้อ 3.5.1 ใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 : สูตรอาหารที่เลือกจากข้อ 3.5.1 ใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณ 40 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 : สูตรอาหารที่เลือกจากข้อ 3.5.1 ใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร

เตรียมอาหารแต่ละสูตรแล้วใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรปริมาณ 166.25 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5-7.0 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (แยกฆ่าเชื้อสารละลายน้ำตาลโดยแยกน้ำตาลมาละลายกับน้ำกลั่นโดยแบ่งน้ำกลั่นบางส่วนจาก 1,000 มิลลิลิตร มาทำการละลาย โดยฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งไอน้ำที่ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที)โดยให้ปริมาตรของอาหารและหัวเชื้อรวมกันคิดเป็นร้อยละ 70 ของปริมาตรฟลาสก์ (เติมอาหาร 166.25 มิลลิลิตร รวมกับหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.3.1.2 ประมาณ 8.75 มิลลลิลิตร) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ คือแต่ละสูตรอาหารจะทำการเตรียม 3 ฟลาสก์ อาหารในฟลาสก์ใบแรกใช้ในการทำตัวเปรียบเทียบ (Blank) ส่วนอีก 2 ฟลาสก์ทำการเติมหัวเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง (Stationary flask) โดยในขณะทำการทดลองให้ทำการเก็บน้ำหมักทุก ๆ 12 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 96 วิเคราะห์หาปริมาณชีวมวลตามวิธีของ AOAC.,2000 ปริมาณกรดแลกติกโดย HPLC(กรัมต่อลิตร) และวัดปริมาณน้ำตาลโดยวิธีการวิเคราะห์ของ Dubois(กรัมต่อลิตร) ปริมาณผลได้ หรือ %Yield (กรัมกรดแลกติกต่อกรัมกลูโคส) และ อัตราการผลิตต่อชั่วโมง (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

3.5.3 ศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพการผลิตกรดแลกติก ในฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร

เลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกที่ดีที่สุดจากข้อ 3.5.2 และสภาวเหมาะสมต่างๆที่ได้จากงานทดลองร่วมกันอีก 3 กลุ่ม (มัทนา และคณะ, 2550 ; ณัฐวุทธิ และจิราภรณ์, 2550, เชิดศักดิ์ และคณะ, 2550) มาทำการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร และ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เพื่อทำการเปรียบเทียบผลผลิตกรดแลกติกที่ได้ ในขณะเดียวกันมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ในปริมาณ 2% ลงไป เพื่อศึกษาดูผลของการเกิดกรดแลกติกที่อาจเพิ่มขึ้น เนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นตัวสารที่ทำให้ปริมาณการหมักกรดเพิ่มขึ้นตามรายงานของ Ohkouchi (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบที่ 1: หมักในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้อัตราการเติมอาหารตามสูตรโดยเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้เป็นไปตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ฟลาสก์ โดย ฟลาสก์ที่ 2 มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณ 2% ลงไป (โดยฟลาสก์ที่ 1 จะไม่มีการเติมสารดังกล่าว) เพื่อเปรียบเทียบผลของกรดแลกติกที่ได้กับฟลาสก์แรก และแบบถังหมัก และเตรียมอาหารเปล่าที่ไม่ใส่เชื้อเพื่อใช้เป็น blank อีก 1 ฟลากส์ (ประมาณ 500 มิลิลิตร)

แบบที่ 2: หมักถังหมัก (Fermentor) ขนาด 2 ลิตร โดยใช้อัตราการเติมอาหารตามสูตรโดยเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้เป็นไปตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ และเติมแคลเซียม-คาร์บอเนต ปริมาณ 2% ลงไปเพื่อเปรียบเทียบผลของกรดแลกติกที่ได้กับแบบฟลาสก์ และเตรียมอาหารเปล่าที่ไม่ใส่เชื้อเพื่อใช้เป็น blank อีก 1 ฟลากส์ (ประมาณ 500 มิลิลิตร)

ทำการเติมหัวเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง (Stationary flask) โดยในขณะทำการทดลองให้ทำการเก็บน้ำหมักทุก ๆ 12 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 96 วิเคราะห์หาปริมาณชีวมวลตามวิธีของAOAC, 2000 วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติ (เฉพาะกรณีนี้จะวิเคราะห์ทุกๆ 24 ชั่วโมง) โดย HPLC (กรัมต่อลิตร) และวัดปริมาณน้ำตาลโดยวิธีการวิเคราะห์ของ Dubois (กรัมต่อลิตร) ปริมาณผลได้ หรือ %Yield (กรัมกรดแลกติกต่อกรัมกลูโคส) และ อัตราการผลิตต่อชั่วโมง (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) โดยทำการเปรียบเทียบผลที่ได้ต่างๆ ระหว่างการหมักกรดในระดับฟลากส์และระดับถังหมัก

3.6 การวิเคราะห์ผล

1. วัดชีวมวลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Shimadzu, Kyoto, Tapan)

2. วัดมวลชีวมวลโดยวัดน้ำหนักแห้ง (กรัม) โดยนำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3, 000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำใส่โถดูดความความชื้น (desicator) ทิ้งไว้ให้เย็น วัดน้ำหนักของชีวมวลที่ได้ (AOAC, 2000)

3. การวัดปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร) โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยน้ำหมักที่ได้จากการเก็บตัวอย่างชั่วโมงต่างๆ มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลาครึ่งชั่วโมงจากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกโดย นำส่วนใสไปกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใช้ Inersil C8-3 column ใช้ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3.0) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลสาร์ เป็นตัวชะที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก ข)

4. การวัดปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) โดยวิธีการวิเคราะห์ของ Dubois (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ปริมาณผลได้ หรือ %Yield (กรัมกรดแลกติกต่อกรัมกลูโคส) และ อัตราการผลิตต่อชั่วโมง (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

6. เปรียบเทียบและสรุปผลของปริมาณกรดแลกติกที่ได้ ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei ATCC* 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสม

3.7 วิเคราะห์ทางสถิติ

แต่ละการทดลองเป็นแบบสุ่มอิสระโดยสมบูรณ์ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ค่าทางสถิติใช้ SPSS 13.0 (*Statistical Package for Social Science*) การเปรียบเทียบใช้การทดสอบของ Duncan (new multiple range test) ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในการพิจารณาถึงการมีนัยสำคัญทางสถิติว่ามีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

4.1.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่ต่างกัน 6 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลทราย พบว่าในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลฟรุกโตส และ น้ำตาลซูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน โดยมีช่วงการเจริญเติบโตสูงสุด (maximum log) ณ ชั่วโมงที่ 96 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 620 นาโนเมตรได้เท่ากับ 3.190, 3.332, 3.910 และ 3.610 ตามลำดับ ส่วนในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลแลคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน จะมีช่วงที่มีการเจริญสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 36 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้ 2.255 และในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลทราย เป็นแหล่งคาร์บอน จะมีช่วงที่มีการเจริญสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 84 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้ 3.175 ดังแสดงในรูปที่ 4.1 หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วงที่การเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) โดยเก็บตัวอย่างเชื้อครั้งสุดท้าย ณ ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งจะสังเกตได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อมีความสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปอย่างต่อเนื่อง

4.1.2 การศึกษาปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

การศึกษาปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 6 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลทราย พบว่าน้ำตาลกลูโคสสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 22.2468 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 คำนวณเป็นผลได้ (yield) และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.698 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.3090 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังในตารางที่ 4.1 รองลงมาคือแหล่งคาร์บอนที่ใช้น้ำตาลทรายผลิตกรดได้ 20.0204 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.532 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.2781 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่น้ำตาลซูโครสผลิตกรดได้

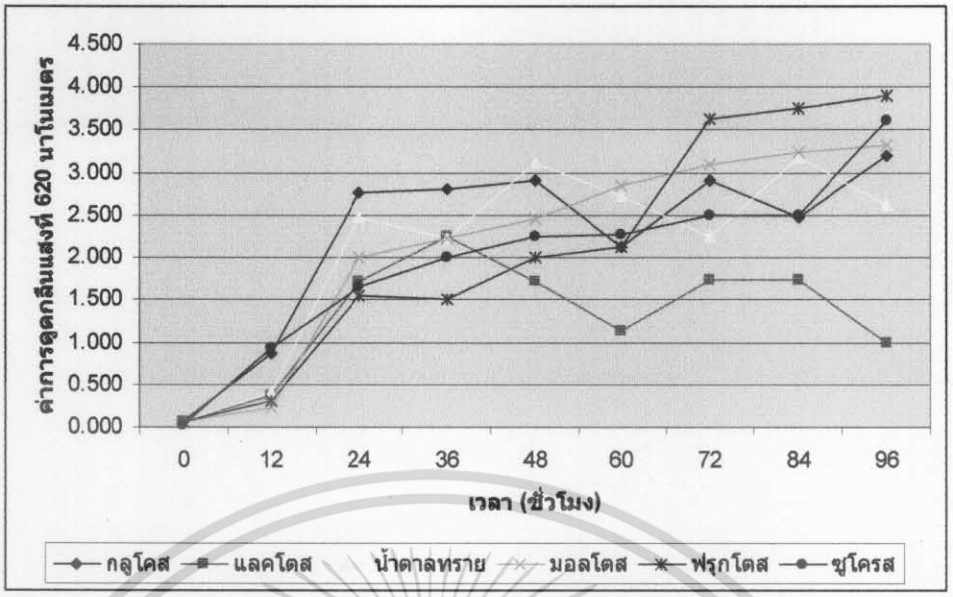
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16.3322 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 84 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.476 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.1944 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง น้ำตาลแลคโตสผลิตกรดได้ 16.2443 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 84 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.454 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.1932 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง น้ำตาล ฟรุกโตสผลิตกรดได้ 15.8722 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.454 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.2204 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และน้ำตาลมอลโตสผลิตกรดได้ 15.4684 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.461 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.2148 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับดังในตารางที่ 4.1 เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าน้ำตาลแลคโตส ฟรุกโตส มอลโตส และซูโครสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลทรายก็ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่น้ำตาลทั้ง 2 ตัวหลังนี้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ 4 ตัวแรก ดังแสดงในภาคผนวก ง และรูปที่ 4.3 ซึ่งการใช้น้ำตาลกลูโคสจะให้ค่าปริมาณกรดสูงที่สุด ดังแสดงใน รูปที่ 4.2 ดังนั้นจึงนำน้ำตาลกลูโคสเพียงตัวเดียวมาทำการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกต่อไป ซึ่งผลข้างต้นนี้ตรงกับ Bulut และคณะ (2004) ที่ศึกษาเรื่องการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือใช้จากธรรมชาติภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน

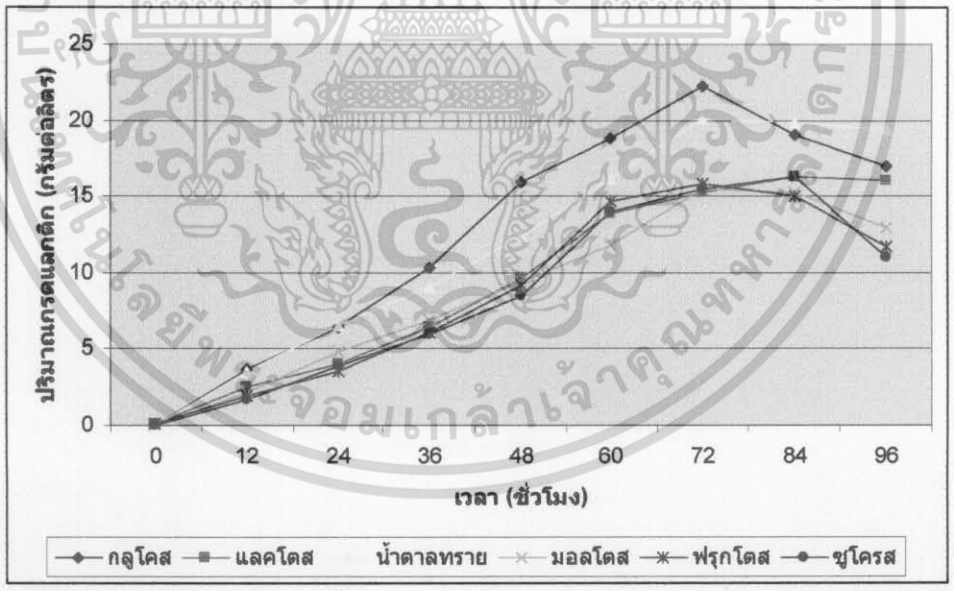
ตารางที่ 4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

แหล่งคาร์บอน	ระยะการหมัก (ชั่วโมง)	พีเอช	ปริมาณกรด (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของกรด (กรัมกรดต่อกรัมน้ำตาล)	อัตราการผลิตกรด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
น้ำตาลกลูโคส	72	3.28	22.2468	0.698	0.309
น้ำตาลแลคโตส	84	5.15	16.2443	0.454	0.193
น้ำตาลทราย	72	5.12	20.0204	0.532	0.278
น้ำตาลมอลโตส	72	3.37	15.4684	0.461	0.215
น้ำตาลฟรุกโตส	72	3.18	15.8722	0.454	0.220
น้ำตาลซูโครส	84	3.66	16.3322	0.476	0194

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

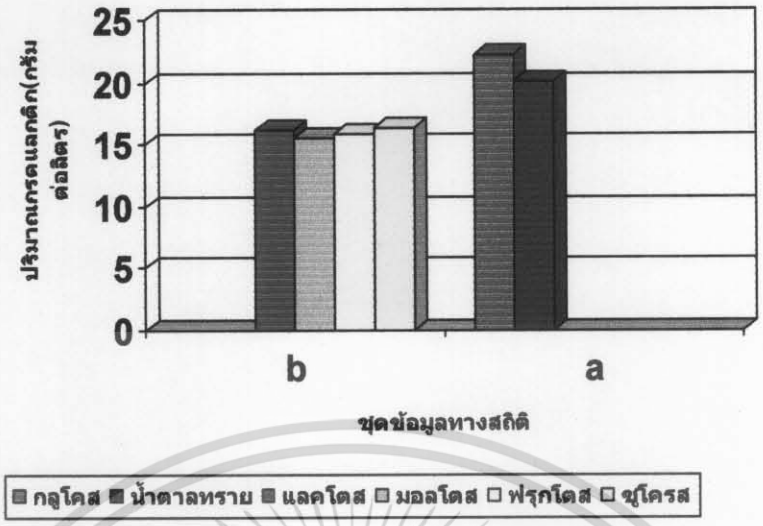


รูปที่ 4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5-7.0 ที่สภาวะนิ่ง



รูปที่ 4.2 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5-7.0 ที่สภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

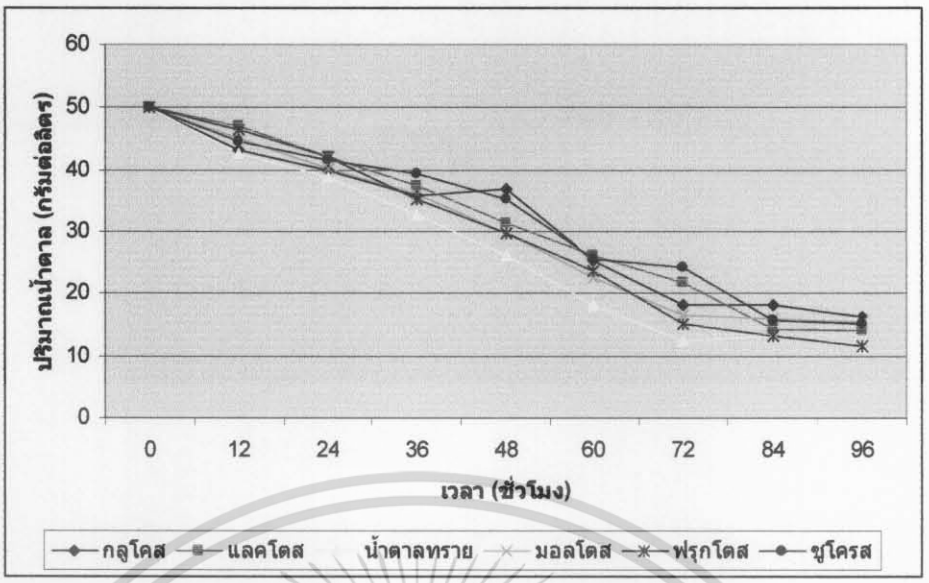


รูปที่ 4.3 กราฟแสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ ของการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

4.1.3 การศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

ในอาหารสังเคราะห์ 6 สูตรที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบต่างกัน 6 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลทราย โดยในแต่ละสูตรจะมีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ 50 กรัมต่อลิตร และในระหว่างกระบวนการหมัก เชื้อจะใช้น้ำตาลในกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งทำให้ความเข้มข้นหรือปริมาณน้ำตาลลดลง และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดเปลี่ยนแปลงไปดังนี้ น้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 16.207 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 67.59 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป น้ำตาลแลคโตสลดลงเหลือ 14.0001 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 71.99 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป น้ำตาลซูโครสลดลงเหลือ 15.122กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 69.76 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป น้ำตาลมอลโตสลดลงเหลือ 15.470 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 69.06 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ไป น้ำตาลฟรุกโตสลดลงเหลือ 11.536 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76.93 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ดังแสดงในรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

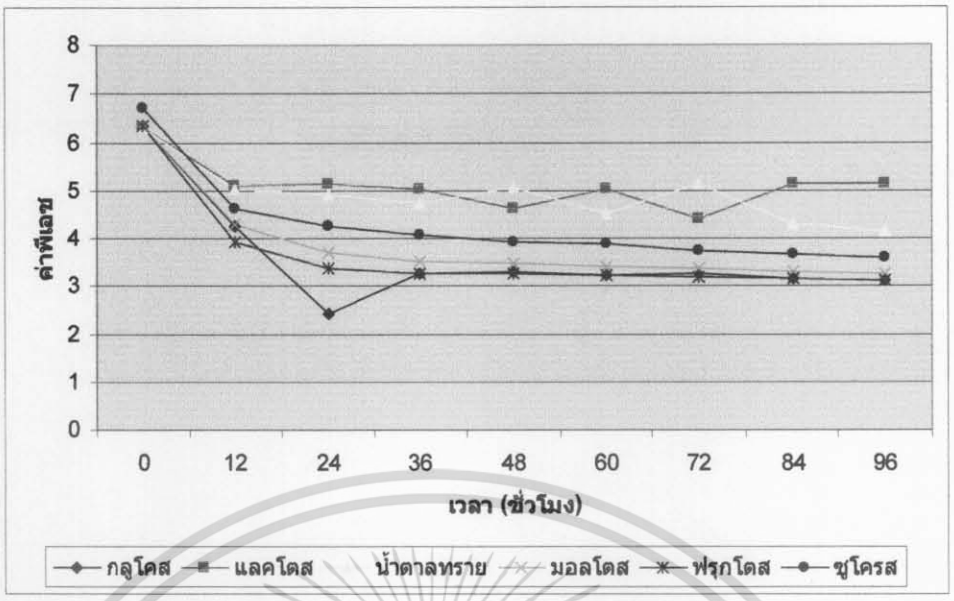


รูปที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5-7.0 ที่สภาวะนิ่ง

4.1.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

จากการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 6 สูตร จะมีแนวโน้มใกล้เคียงกันคือ ในชั่วโมงที่ 0 (เริ่มต้นกระบวนการหมัก) ค่าความเป็นกรดของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลทราย คือ 6.35, 6.32, 6.71, 6.34, 6.34 และ 6.33 ตามลำดับ โดยค่าพีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 60 หลังจากนั้นค่า พีเอชจะมีการเปลี่ยนแปลงไปอีกเพียงเล็กน้อย โดยมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงค่าพีเอช ระหว่าง 3.11 ถึง 5.15 ดังแสดงในรูปที่ 4.5 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wenge Fu และ A.P.Mathew (1999) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับสภาวะพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกให้ได้ปริมาณสูงสุดจากวัตถุดิบเหลือใช้ทางธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



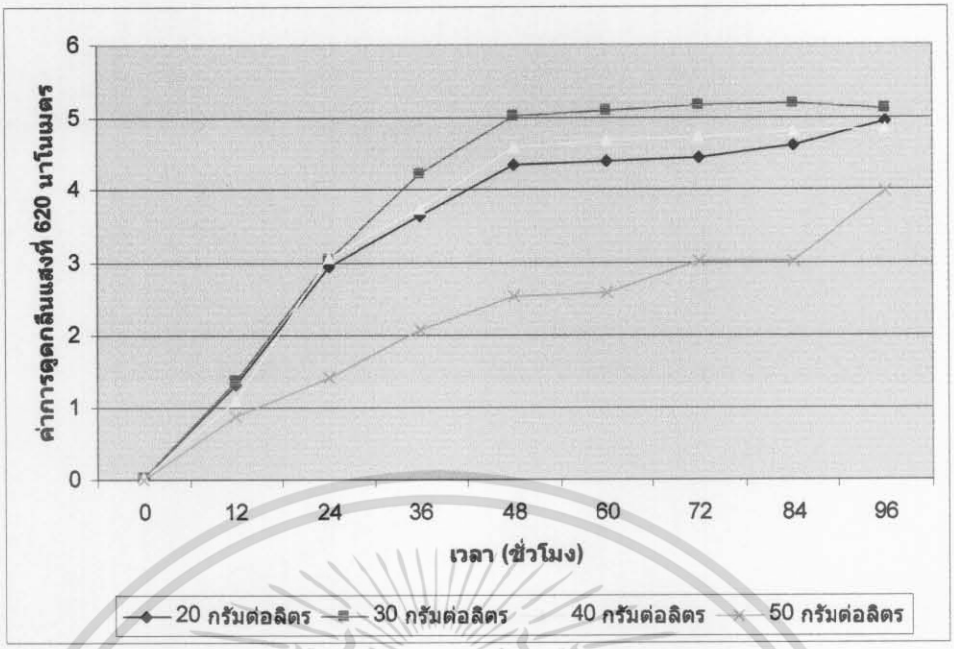
รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5-7.0 ที่สภาวะนิ่ง

4.2 การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

4.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆกันเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นเป็น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ทั้งสิ้น 4 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการใช้อาหารสังเคราะห์ทั้ง 4 สูตรนั้นมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน โดยมีช่วงการเจริญเติบโตสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 96 โดยน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นที่ 20, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เท่ากับ 4.950, 4.850 และ 3.990 ตามลำดับ ส่วนช่วงการเจริญเติบโตสูงสุดของกลูโคสความเข้มเข้น 30 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 84 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เท่ากับ 5.190 หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วงที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ โดยเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้าย ณ ชั่วโมงที่ 96 ดังแสดงดังรูป 4.6 โดยสังเกตได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อมีความสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปอย่างต่อเนื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

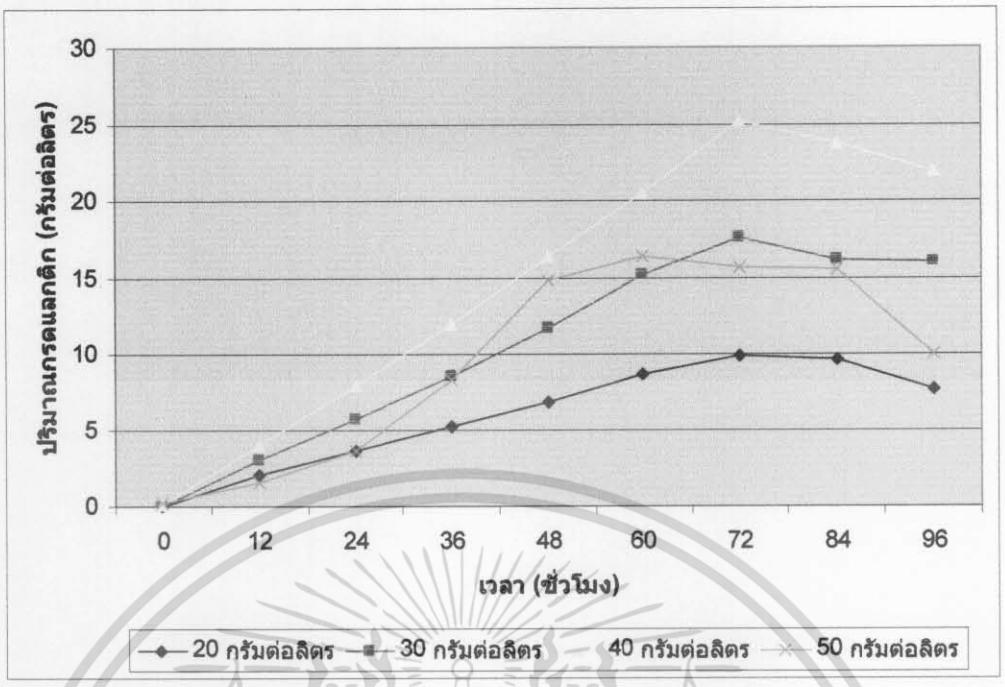


รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆกันเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5-7.0 ที่สภาวะนิ่ง

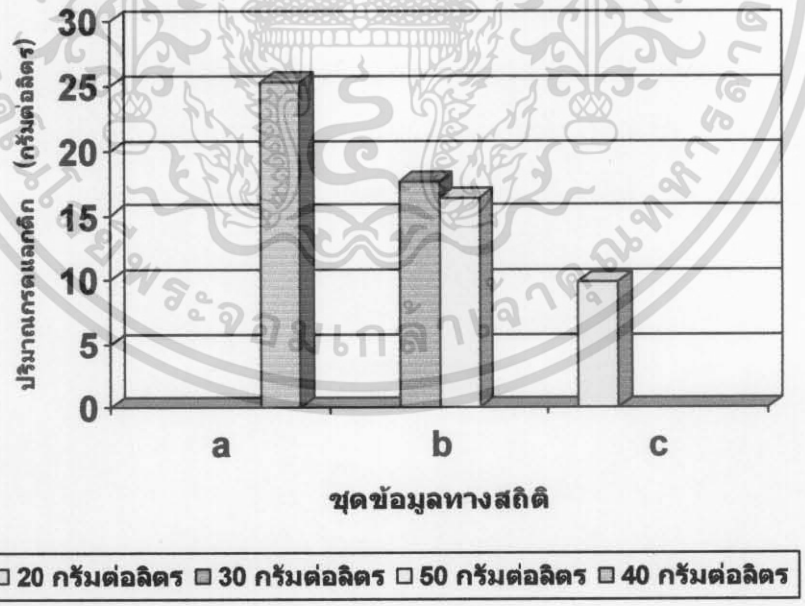
4.2.2 การศึกษาปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆกันเป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษาปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าที่น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้ 8.6214 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 60 คำนวณเป็นผลได้และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.5830 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.1437กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้ 17.5642 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 72 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.900 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.2439 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้ 25.3222 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 72 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.984 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.3517 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้ 16.3466 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 60 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.502 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.2724 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.7 และเมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แบ่งช่วงความแตกต่างได้ออกเป็น 3 ส่วน พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

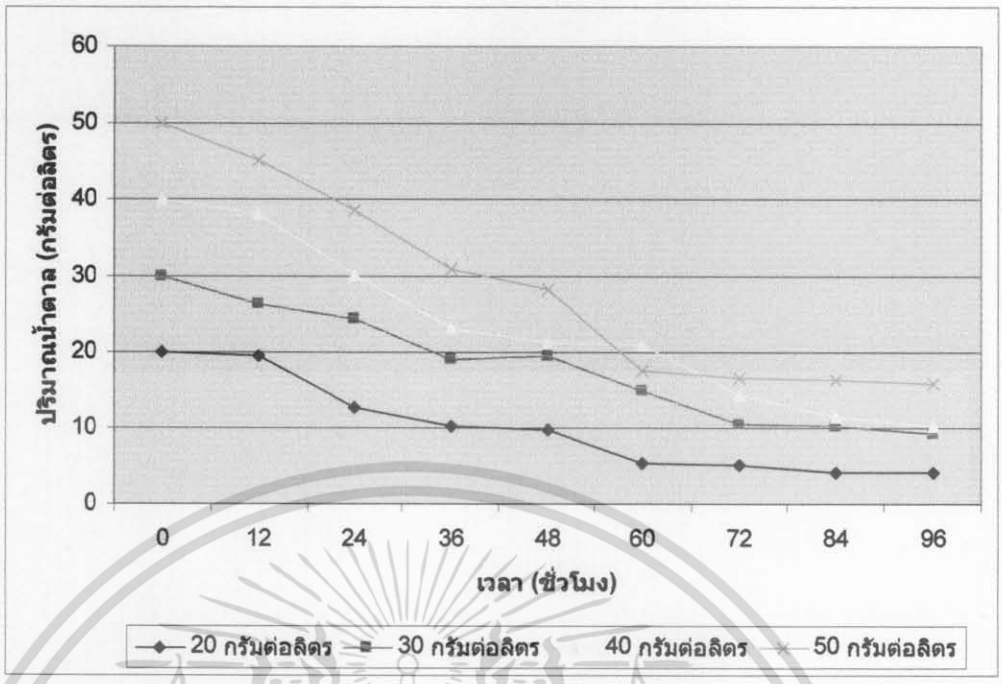


รูปที่ 4.7 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆกันเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5-7.0 ที่สภาวะนิ่ง



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ ของการผลิตกรดแลกติกจากความเข้มข้นกลูโคสที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



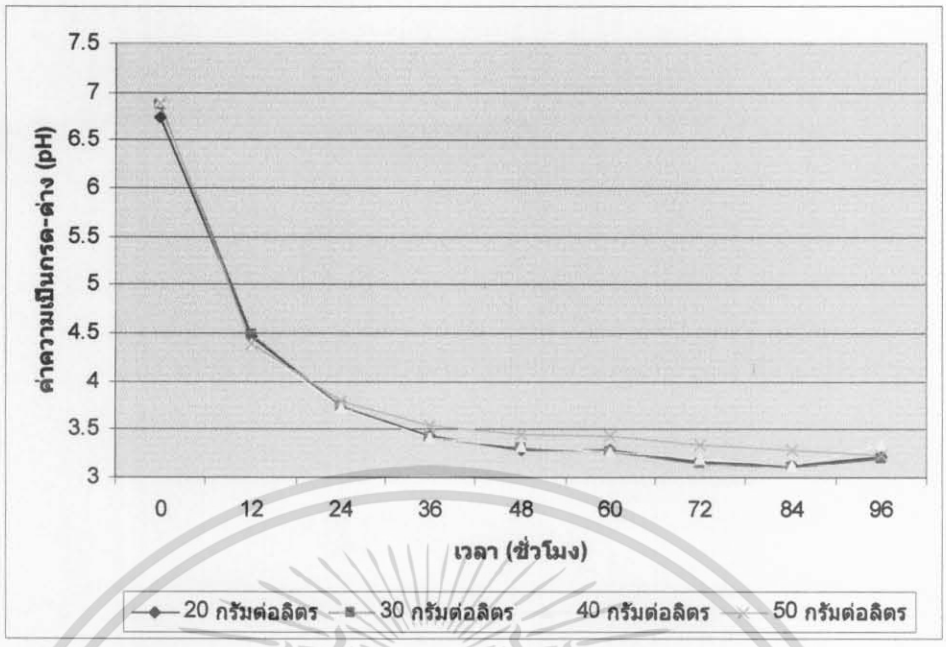
รูปที่ 4.9 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงโดยการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส์ พีเอช 6.5-7.0 ที่สภาวะนิ่ง

4.2.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

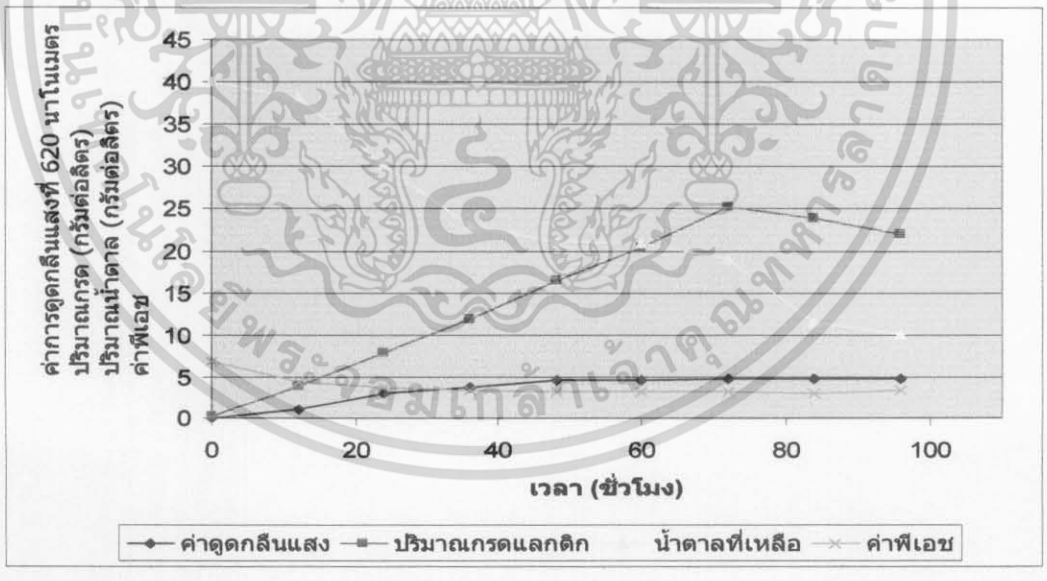
จากการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 4 สูตร จะมีแนวโน้มใกล้เคียงกันคือ ในชั่วโมงที่ 0 (เริ่มต้นกระบวนการหมัก) ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร คือ 6.74, 6.87, 6.90 และ 6.89 ตามลำดับ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 60 และหลังจากนั้นค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีการเปลี่ยนแปลงไปอีกเพียงเล็กน้อย โดยมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 3.19 ถึง 3.35 ดังแสดงในรูปที่ 4.10

จากข้อมูลของผลการทดลองเบื้องต้นนั้นเมื่อเรานำค่า การเจริญเติบโตของเซลล์(การดูดกลืนแสง) ปริมาณกรดแลกติกที่ได้ ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป และค่าการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างที่ได้จากการศึกษากระบวนการหมักกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ พบว่าเมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จะผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุดนั้น มาทำการแสดงผล ค่าต่างๆ ที่ได้จะสัมพันธ์กันดังรูปที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5-7.0 ที่สภาวะนิ่ง



รูป4.11 การเปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าการเจริญเติบโต ปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและค่าพีเอช ที่เกิดจากการหมักกรดแลกติกที่ความเข้มข้นกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5-7.0 ที่สภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสม ในระดับฟลาสก์และระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

4.3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหารสำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863

จากการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ซึ่งจากการศึกษาพบว่า

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กลูโคส 40 กรัมต่อลิตร

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ผสมกับ เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร (มัทนา และคณะ, 2550)

แหล่งของแร่ธาตุที่เหมาะสม คือ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) 0.03 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.1 กรัมต่อลิตร (ณัฐวุทธิ และจิราภรณ์, 2550)

อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียสและพีเอช 6.5 (เชิดศักดิ์ และคณะ, 2550)

สภาวะที่เหมาะสม คือ สภาวะนิ่ง (Arasaratnam และคณะ, 1996) และในถังหมักใบกวนความเร็วรอบ 100 rpm (Quesada-Chanto, 1994)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นที่ 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ภายในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร 2 ชุดคือชุดแรกจะไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) แต่ชุดที่ 2 กับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ลงไป 2% ทำการหมักกรดแลกติก พบว่าเราสามารถหาค่าการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงและการหาน้ำหนักแห้งได้เฉพาะการหมักในฟลาสก์ 2 ลิตรชุดแรกเท่านั้น เพราะเนื่องจากที่เหลือมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาค่าดังกล่าวได้ เมื่อนำฟลาสก์ชุดแรกมาทำการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง พบว่ามีช่วงการเจริญเติบโตสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 84 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เท่ากับ 4.130 และเมื่อนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ได้เท่ากับ 0.029 กรัม หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วงที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ โดยเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้าย ณ ชั่วโมงที่ 96 ดังแสดงดังรูป 4.12 โดยสังเกตได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักแห้งของเซลล์

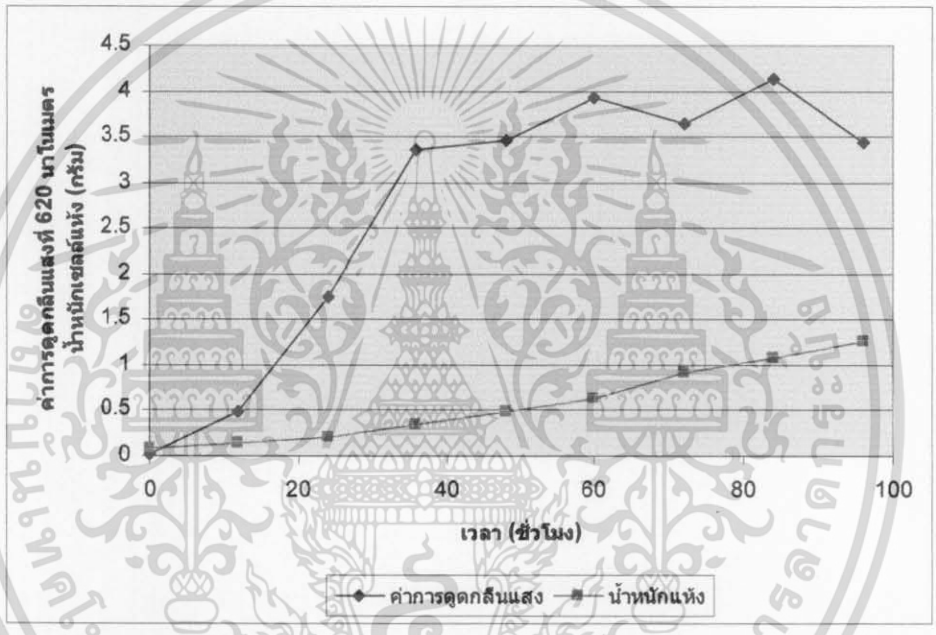
4.3.3 การศึกษาปริมาณน้ำตาลที่มีการเปลี่ยนแปลงโดยการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

จากการทดลองจะใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยในระหว่างกระบวนการหมัก เชื้อจะใช้น้ำตาลในกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งทำให้ความเข้มข้นหรือปริมาณน้ำตาลลดลง และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสภายในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ชุดแรก ลดลงเหลือ 23.58 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 40.05 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป และชุดที่สอง ลดลงเหลือ 19.94 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 50.15 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสภายในถังหมักขนาด 2 ลิตร ลดลงเหลือ 18.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 53.05 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไปดังแสดงในรูปที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

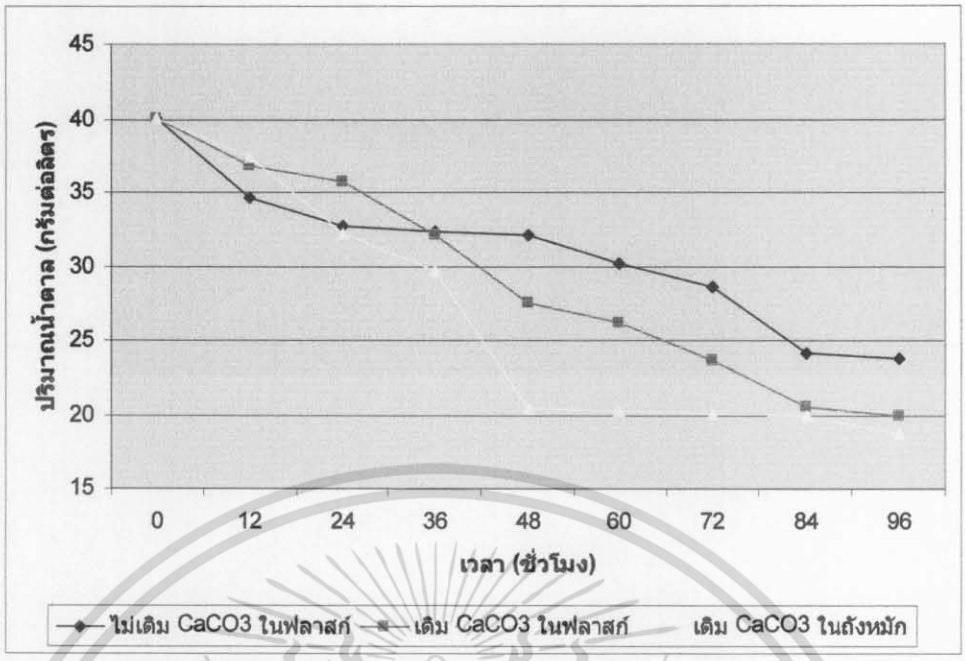
4.3.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

จากการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 2 แบบ มีแนวโน้มใกล้เคียงกันคือ ในชั่วโมงที่ 0 (เริ่มต้นกระบวนการหมัก) ค่าพีเอชของน้ำตาลกลูโคสในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรชุดแรกและชุดที่สอง คือ 6.85 และ 7.36 ตามลำดับ และภายในถังหมักขนาด 2 ลิตร คือ 6.88 โดยค่าพีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 60 และหลังจากนั้นค่าพีเอชจะมีการเปลี่ยนแปลงไปอีกเพียงเล็กน้อย โดยมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงพีเอช ระหว่าง 3.00 ถึง 6.63 ดังแสดงในรูปที่ 4.14

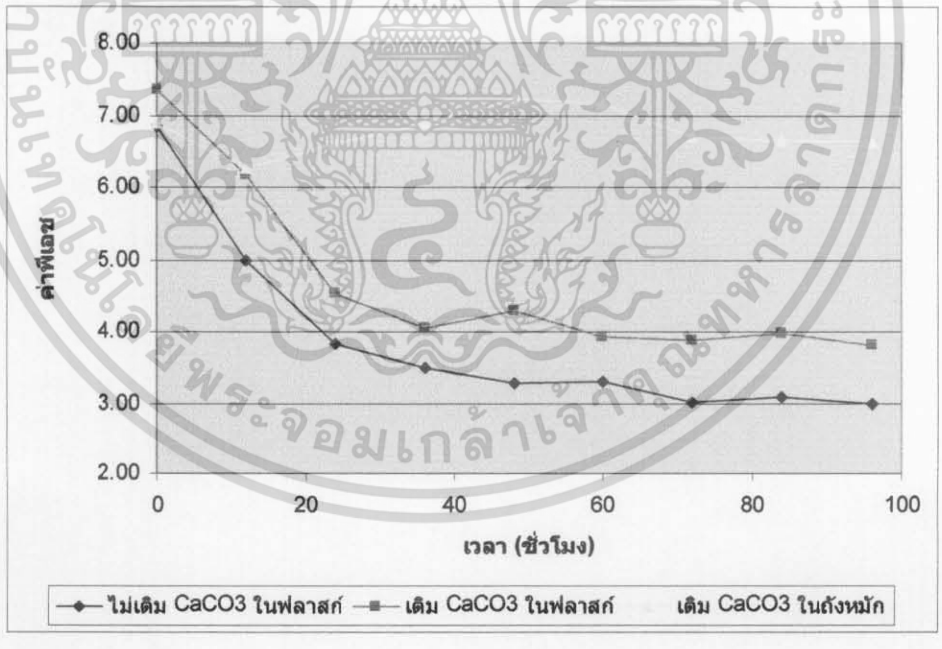


รูปที่4.12 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร ในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร และน้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีการเปลี่ยนแปลงโดยการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร



รูปที่ 4.14 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

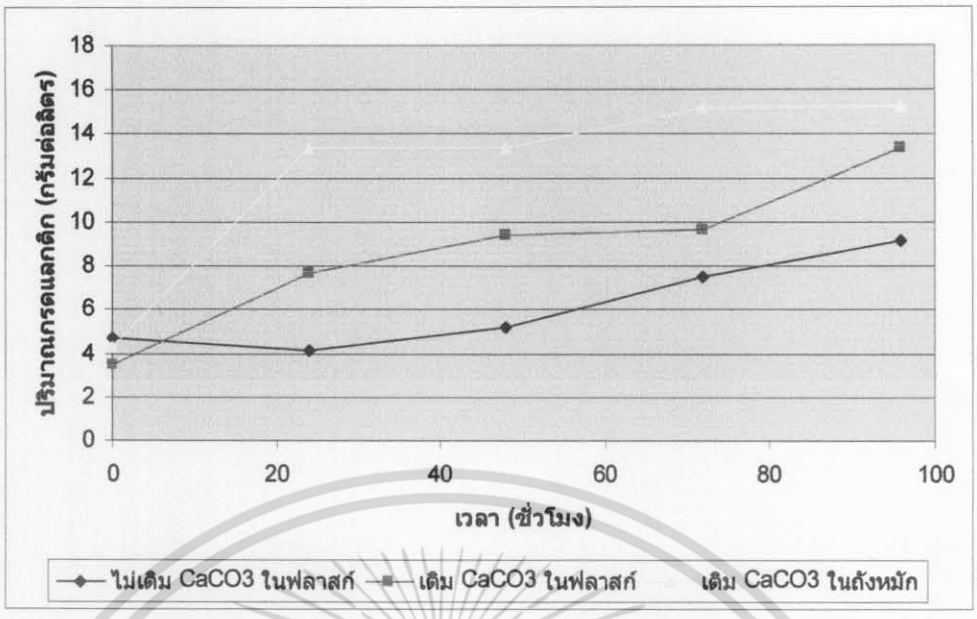
4.3.5 การศึกษาปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

การศึกษาปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการหมักในฟลากส์ขนาด 2 ลิตร ชุดแรกผลิตกรดแลกติกได้ 9.162 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.558 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.095 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ชุดที่สองผลิตกรดแลกติกได้ 13.350 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.666 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.1391 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนการหมักกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ผลิตกรดแลกติกได้ 15.723 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 96 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.720 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.160 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.15 และเมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่า การหมักกรดแลกติกในถังหมักไม่มีความแตกต่างกันกับแบบฟลาสก์ที่ 2 แต่ทั้งถังหมักและฟลาสก์ที่ 2 แต่ต่างกันกับฟลาสก์แรกอย่างมีนัยสำคัญ ดังภาคผนวก ง และรูปที่ 4.16 แต่ในถังหมักนั้นก็มีกรดแลก- ติกมากกว่าฟลาสก์ทั้ง 2 ชุด ดังนั้นสรุปได้ว่า แคลเซียมคาร์บอเนตมีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตกรดแลก-ติกได้จริง สอดคล้องกับงานวิจัยเรื่องการเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกด้วยสารแคลเซียมคาร์บอเนตของ Ohkouchi และ Inoue (2006)

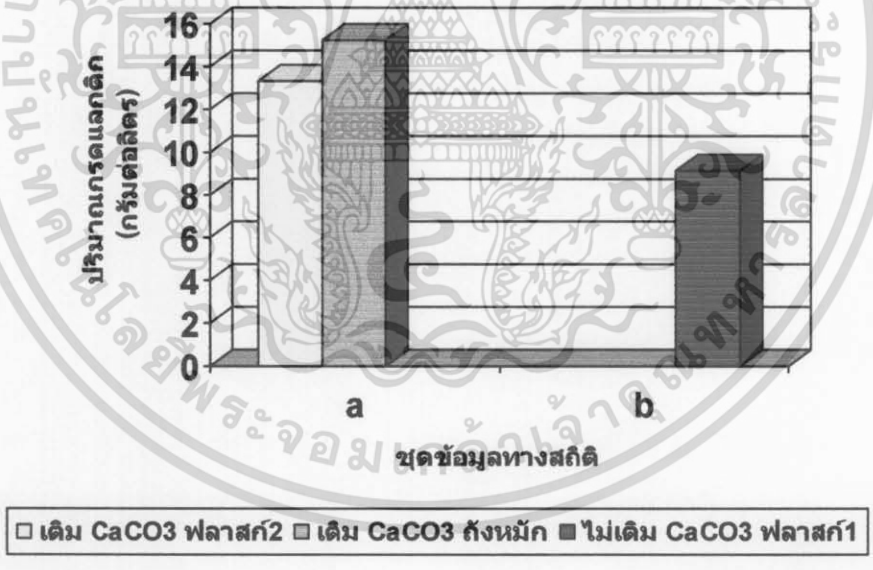
ตารางที่ 4.3 ผลของการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ทำการหมักภายในฟลากส์ขนาด 2 ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

ชนิดการหมัก	ระยะการหมัก (ชั่วโมง)	พีเอช	ปริมาณกรด (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของกรด (กรัมกรดต่อกรัมน้ำตาล)	อัตราการผลิตกรด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
ฟลากส์ ชุด 1	96	3.00	9.1623	0.5580	0.095
ฟลาสก์ ชุด 2	96	3.80	13.3504	0.6655	0.139
ถังหมัก	96	6.63	15.2726	0.7197	0.159

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



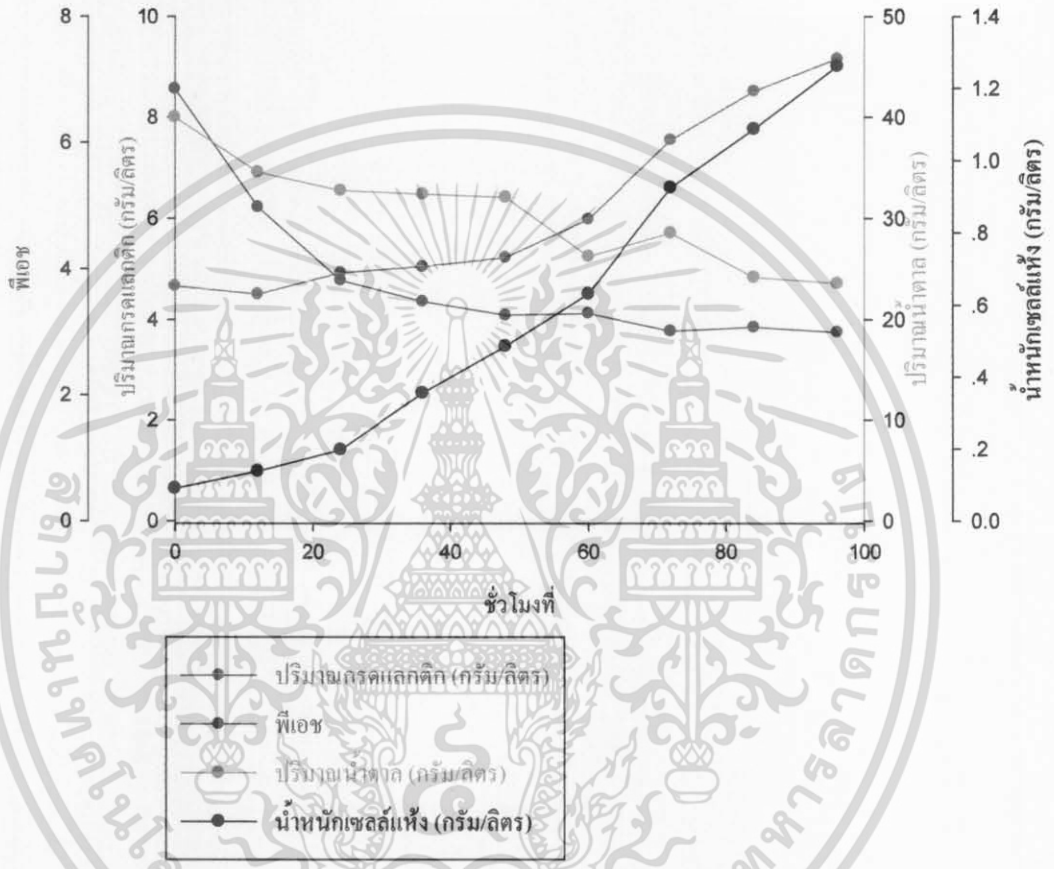
รูปที่ 4.15 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC ในสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร



รูปที่ 4.16 กราฟแสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ ของการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกจากอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในระดับฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร

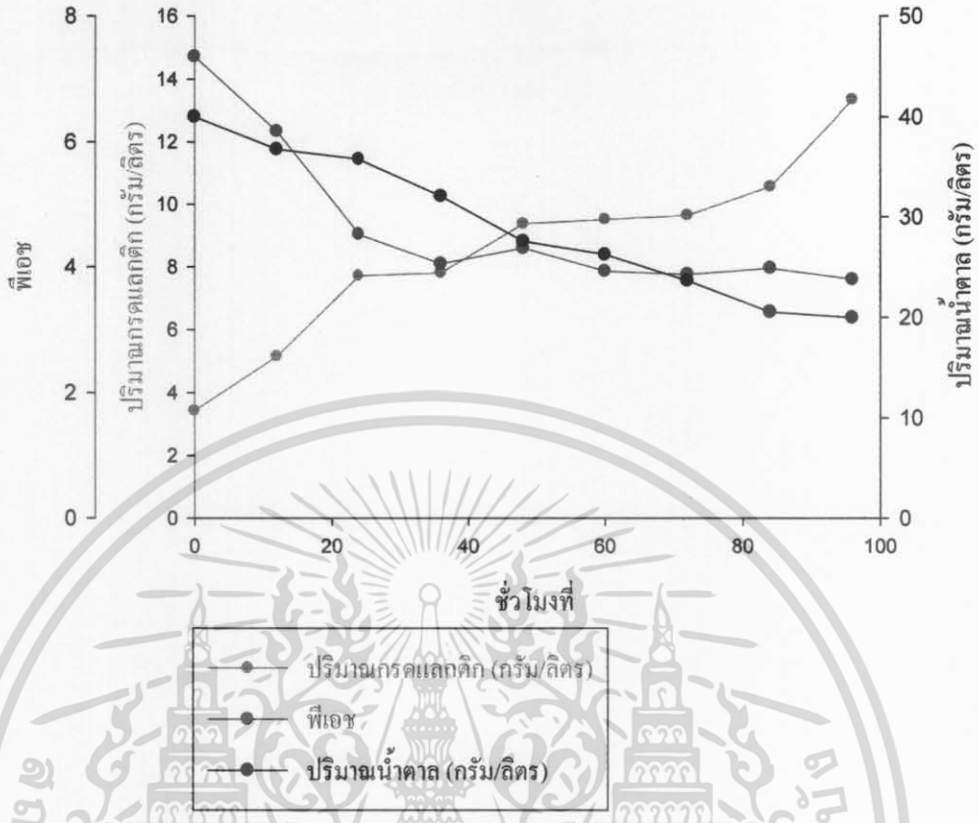
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อเรานำผลที่ได้ต่างๆ จากการหมักกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหารและสภาวะแวดล้อม ดังที่กล่าวข้างต้น (ข้อ 4.3.1) โดยรายงานผลเป็นกราฟผลรวมแยกตามระบบการหมัก ทั้ง 3 แบบ คือ แบบฟลาสก์ขาด 2 ลิตร ที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต แบบฟลาสก์ขาด 2 ลิตร ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต และ แบบถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ได้ดังรูป ที่ 4.14, 4.15 และ 4.16 ตามลำดับดังต่อไปนี้



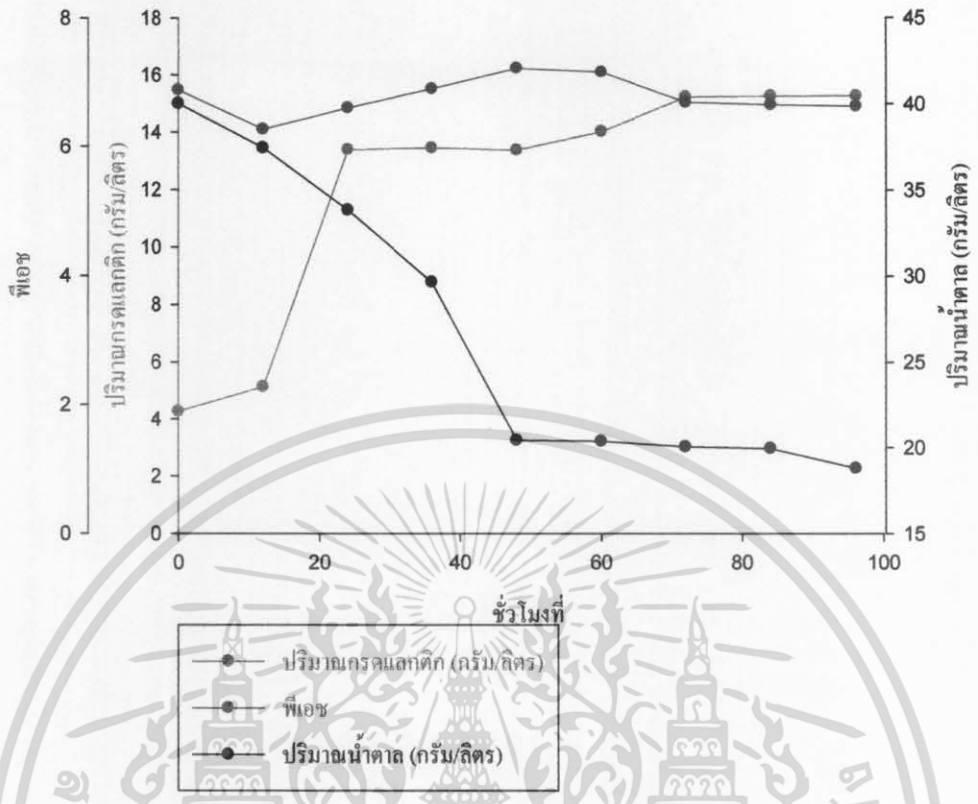
รูปที่ 4.14 กราฟแสดงผลที่ได้ต่างๆ ในการหมักกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ชุดแรก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงผลที่ได้ต่างๆ ในการหมักกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ชุดที่สอง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 กราฟแสดงผลที่ได้ต่างๆ ในการหมักกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC ใน ถังหมักขนาด 2 ลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่ต่างกัน 6 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลทราย พบว่าน้ำตาลกลูโคสให้ผลผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูงที่สุดคือ สูงสุด คือ 22.247 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 คำนวณเป็นผลได้ (yield) และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.698 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.3090 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับ Bulut และคณะ (2004) ที่ศึกษาเรื่องการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือใช้จากธรรมชาติภาย ใต้เงื่อนไขเดียวกัน รองลงมาคือแหล่งคาร์บอนที่ใช้น้ำตาลทรายผลิตกรดได้ 20.020 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.532 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.278 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อนำค่าที่ได้มาทำการเปรียบเทียบทางสถิติเพื่อดูความแตกต่าง พบว่าผลของกรดแลกติกที่ได้จากการใช้กลูโคส มีความแตกต่างกันกับการใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ยกเว้นน้ำตาลทราย แต่เนื่องจากการทดลองพบว่า น้ำตาลกลูโคสให้ผลที่สูงที่สุดในการนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ดังนั้นจึงเลือกน้ำตาลกลูโคสนำมาศึกษาถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติก โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้ 25.322 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 72 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.984 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และ 0.352 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดจากทุกความเข้มข้น

ดังนั้นเมื่อทำการทดลองเสร็จสิ้นในขั้นต้น เราสามารถสรุปได้ว่า การใช้น้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มาใช้ร่วมในสูตรอาหารสังเคราะห์เพื่อทำการหมักและผลิตกรดแลกติก จะได้ปริมาณกรดแลกติกในปริมาณสูงสุด จากการศึกษาจากแหล่งคาร์บอนหรือน้ำตาลทั้ง 6 ชนิด เบื้องต้น

และเมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรด ระหว่างการหมักในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับการหมักในถังหมัก (fermentor) ขนาด 2 ลิตร โดยที่นำงานทดลองของ Ohkouchi และ Inoue (2006) เรื่องการเพิ่มประสิทธิภาพด้านปริมาณของกรดแลกติกที่จะได้ เมื่อมีการเติม *แคลเซียมคาร์บอเนต* ($CaCO_3$) ลงไปในสูตรอาหารสังเคราะห์ร่วมกันในปริมาณ 2% จากการทดลองพบว่า เมื่อเราทำการทดลองผ่านไปโดยให้ทำการหมักในฟลาสก์ 2 แบบ คือ แบบที่ 1 ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 9.162 กรัมต่อลิตร แบบที่ 2 เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 13.350 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับในถังหมักที่มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 15.273 กรัมต่อลิตร จะเห็นว่าเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่เจริญในฟลาสก์สามารถอธิบายเรื่องการผลิตกรด แลกติกได้มากขึ้นเมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตและเมื่อเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุดนั้นก็สอดคล้องกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักสามารถควบคุมความเร็วรอบของใบพัดกวนในอัตราเร็วที่เหมาะสมได้ซึ่งในการทดลองนี้กำหนดให้ ทำให้เชื้อสามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึงและในถังหมักสามารถควบคุมค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ได้ การเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปเพื่อให้แคลเซียมคาร์บอเนตแตกตัวจะเกิดเป็นแคลเซียมแลคเตท และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งเป็นตัวสะเทิน (neutralizer) ในระหว่างการหมัก แต่เมื่อ แคลเซียมคาร์บอเนตมีความเข้มข้นมากถึง 10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ กลายเป็นผลึกของแคลเซียมแลคเตทได้ยาก ทำให้การสกัดสารละลายแลคเตทได้ยากตามไปด้วย (Ohkouchi และ Inoue, 2006)

ดังนั้นในการศึกษาเรื่องแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *L. casei* ครั้งต่อไป พอจะใช้งานทดลองนี้เป็นแนวในการการเริ่มต้นการศึกษาเรื่องความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน คือ ควรเริ่มต้นที่ 40-50 กรัมต่อลิตร และพบว่าเชื้อที่เจริญในถังหมัก จะมีช่วงเวลาของการผลิตสารเพื่อให้ได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดมากกว่า ดังนั้นจึงเห็นว่าการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีประโยชน์ใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดแลคติกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชลัท ศานติวรางคณา. 2534. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเครื่องดื่มจากเวย์ ปัญหาพิเศษ ภาควิชาอุตสาหกรรม คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

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

วนปรัสต์ กัลยาวงษ์, ศิริวรรณ พูลพันธุ์, วิทยา ปั้นสุวรรณและอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2545. การเจริญและการสร้างสารให้กลิ่นรสของแบคทีเรียแลคติกในหางนมจากเนยแข็ง การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28 กรุงเทพฯ. 565.

วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2532. เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการนมและผลิตภัณฑ์นม ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

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

ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ. 2526. การผลิตผลิตภัณฑ์นมและการจัดการเอกสารการฝึกอบรมเกี่ยวกับเทคโนโลยีอาหารนม ชุดที่ 3 สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์. เชียงใหม่. 262.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

supplementation of whey permeate fermentation to produce lactic acid for biodegradable plastics. *International Dairy Journal* (13) :575-580.

Gardner, W. H. 1972. Acidulants in food processing. Hand book of food additive 2nd ed. Vol 1:225-270.

Huang ,L. P. Jin, B. Lant, P. Zhou, J. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of Potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal* (23) : 265-276.

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

Kadam, S. R. Patil, SS. Bastawde, KB. Khire, J. M. and Gokhale, D.V. 2006. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry* (41) :120-126.

Kulozik, U. and Wilde, J. 1999. Rapid lactic acid production high cell concentrations in whey ultrafiltration by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme and Microbial Technology* (24) :297-302.

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

Nancib, N. Nancib, A. Boudjelal, A. Benslimane, C. Blanchard, F. Boudrant, J. 2001. The effect of supplementation by different nitrogen source on the production of lactic acid a from date juice by *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus*. *Bioresource Technology* (78) : 149-153.

Nancib, A. Nancib, N. Meziane Cherif, D. Boubendir, A.Fick, M. Boudrant, J. O, Seph. 2005. Joint effect of on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus*. *Bioresource Technology* (96) :63-67.

Narayanan, N. Roychoudhury, P. K. Srivastava, A. 2004. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* Vol.7 No2 :167-179.

Oh, H. Wee, Y. J. Yun, J. S. Han, S. H. Jung, S. Ryu, H. W. 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology* (96) : 1492-1498.

Ohkouchi, Y., Inoue, Y.,2006. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011.*Bioresource Technology* 97, 1554-1562.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

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.

Senthuran, A.Senthuran, V. Hatti-Kaul, R. Mattiasson, B. 1999. Lactic acid production by Immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reator : a step towards optimization. *Journal of Biotechnology* (73) :61-70.

Sodergard, A. and Stolt, Milael.2002. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Prog. Polym.Sci* (27) : 1123-1163.

Tanaka, T. Hoshina, M. Tanabe, S. Sakai, K. Ohtsubo, S. and Taniguchi, M. 2006. Prodution of D-latic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology* (97) : 211-217.

www.raritanval.edu/departments/science/molecules.html

www.technica.net/NF/NF3/biodegradable.htm

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

www.genome.jgi-psf.org/draft_microbes/lacca/lacca.home.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (glucose)	40	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟส ($MnSO_4 . 4H_2O$)	0.03	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	0.1	กรัม

วิธีการ

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ค่าประมาณ 6.2-7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้นึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศา-เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

2. ชั่งน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร (สูตรอาหารปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร) ปรับพีเอชให้ได้ค่าประมาณ 6.2-7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้นึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศา-เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 10 นาที

3. นำอาหารและสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้มาเทรวมกันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

1.2 อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (glucose)	40	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟส ($MnSO_4 . 4H_2O$)	0.03	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	0.1	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ค่าประมาณ 6.2-7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้นึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศา-เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

2. ชั่งน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร (สูตรอาหารปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร) ปรับพีเอชให้ได้ค่าประมาณ 6.2-7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้นึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศา-เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 10 นาที

3. นำอาหารและสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้มาเทรวมกันขณะที่ยังร้อนอยู่ เพื่อป้องกันการแข็งตัวของวุ้นภายใต้สภาวะปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

2. สารเคมี

สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) พีเอช 3

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้เป็นพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ความเข้มข้น 0.1 โม-ลาร์ (ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : กรดฟอสฟิวริก (H_3PO_4) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ตวงกรดฟอสฟิวริก 3.4 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส วิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dobois, 1956)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. คิวเวตแก้ว
3. ปิเปต
4. แท่งแก้วคนสาร

สารเคมี

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

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
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. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1 มิลลิลิตร

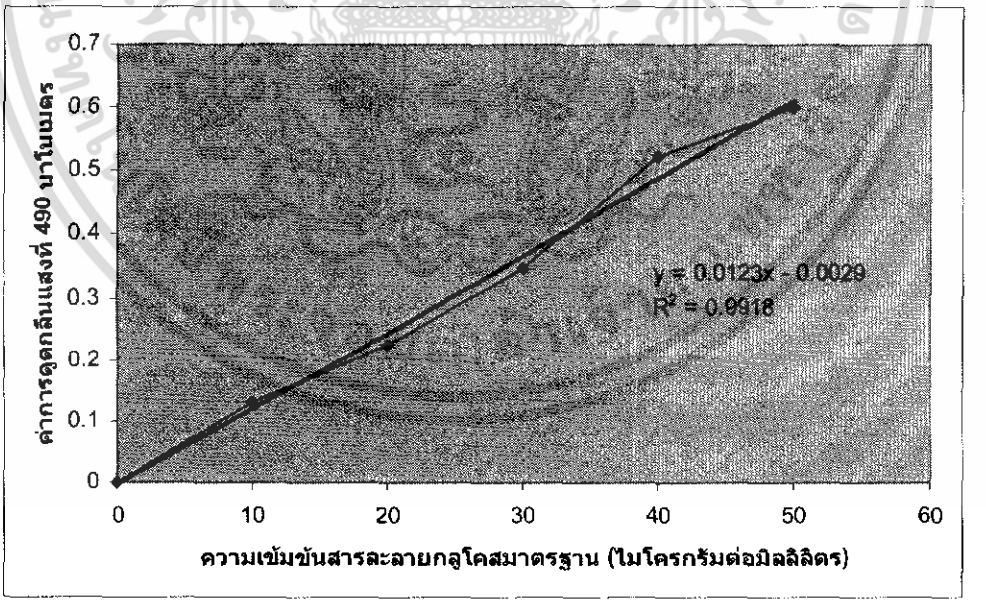
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงที่ผิวหน้าของของเหลวโยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด

3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าและนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

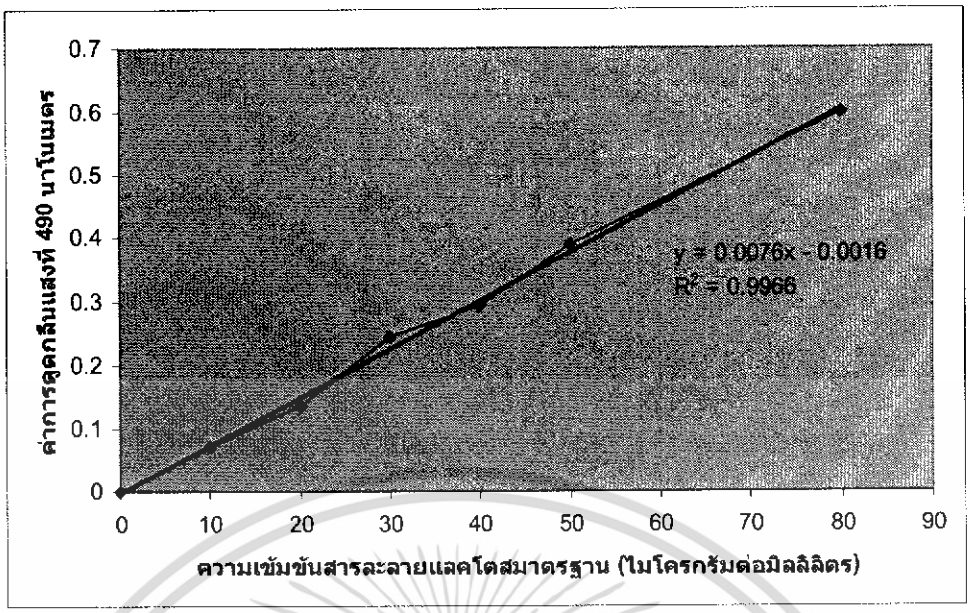
5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร) X (อัตราการเจือจาง)}}{\text{(ความชันของกราฟมาตรฐาน) X 1,000}}$$

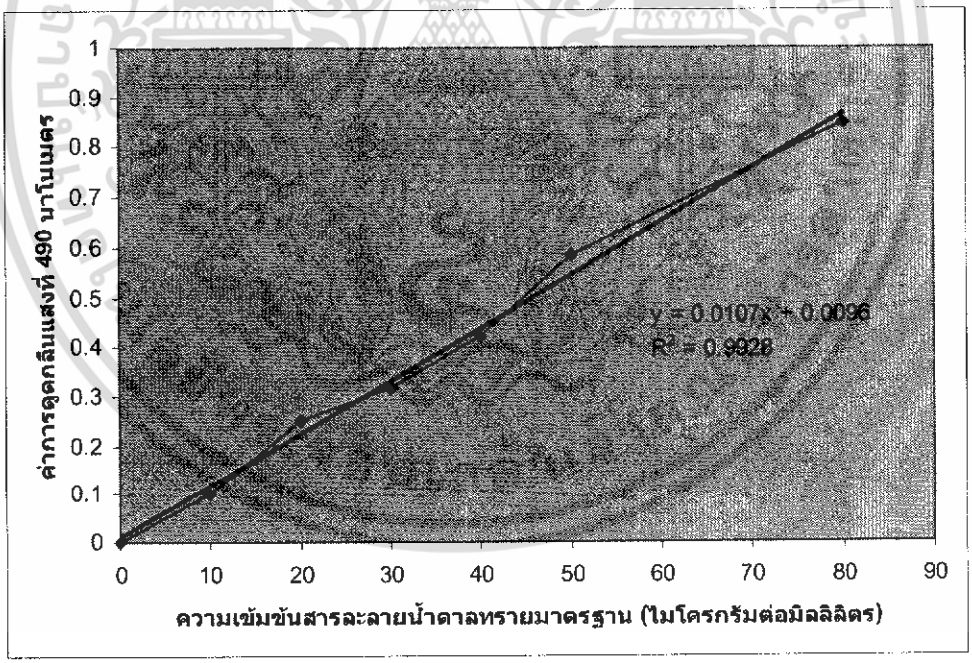


รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

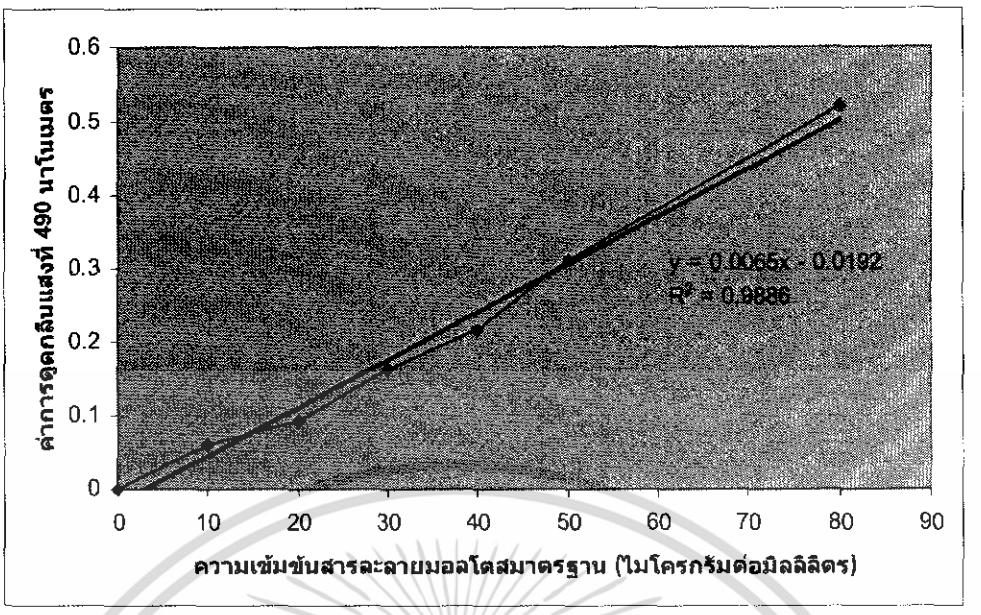


รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตส

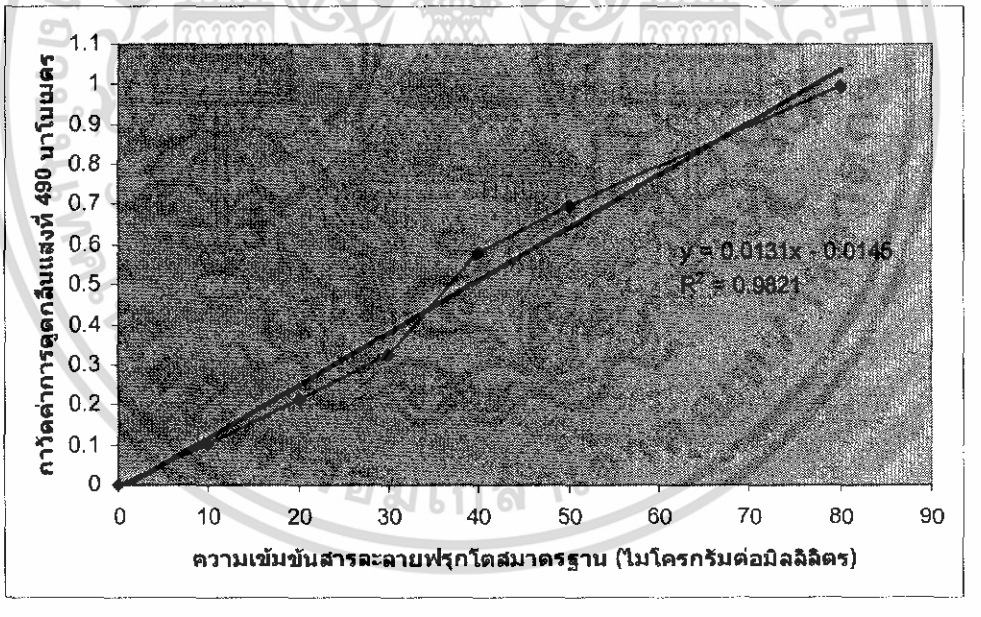


รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทราย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

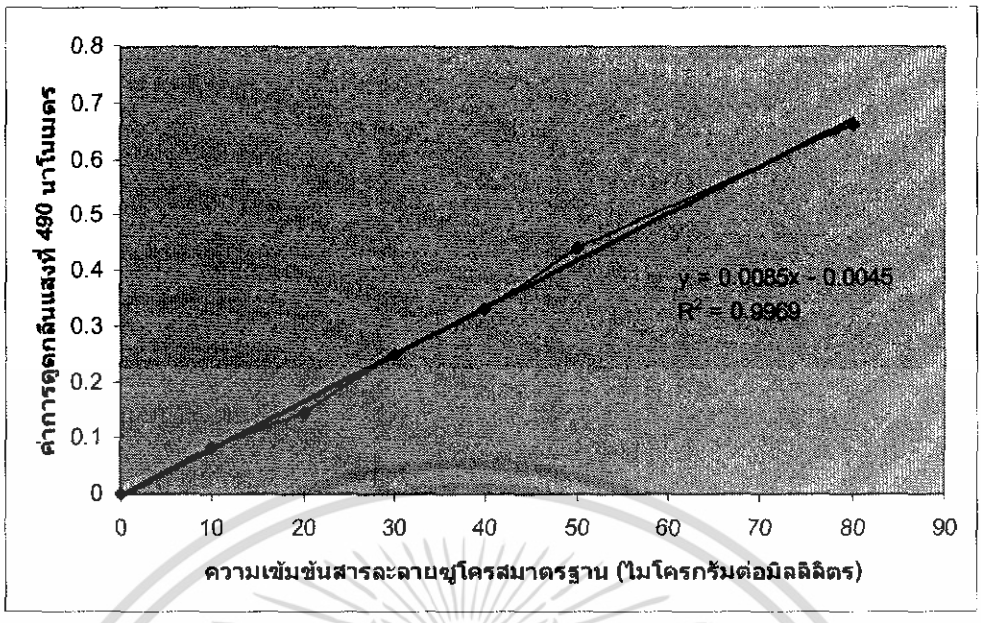


รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส



รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส

2. น้ำหนักเซลล์แห้ง

วิธีการ

1. เตรียมหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยของเซลล์ 10มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนลอยที่แช่แข็งเก็บไว้สำหรับการวิเคราะห์ค่าปริมาณน้ำตาล และกรดแลคติก
4. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองและนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 1-2 ครั้ง
5. รินส่วนลอยน้ำทิ้ง นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
6. ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
7. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งจาก

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วยเครื่อง HPLC

3.1 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

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

3.2 ขั้นตอนการเปลี่ยน MOBILE PHASE

1. ปิด Pump HPLC
2. เท Mobile phase ใหม่ลงในบีกเกอร์
3. เปิด Drain ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ยก Sinker ออกจาก Mobile phase แล้วจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มี Mobile phase ใหม่อยู่
5. รอจน Pump ดูด Mobile phase ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20-30 มิลลิลิตร
6. ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของ Sinker ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาดแล้วนำ Sinker จุ่มลงในขวดของ Mobile phase ใหม่
7. ในระหว่างขั้นตอนที่ 1-6 ถ้า Pump หยุดทำงาน ให้กดปุ่ม Purge อีกครั้ง
8. ให้สังเกตว่าสายของ Sinker มีฟองอากาศอยู่รึเปล่า ถ้ายังมีให้กด Purge ให้ Pumpทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
9. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจน Pump หยุดทำงานเองหรือให้กด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน
10. ปิด Drain valve ที่ Pump แล้วสั่งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : การเปลี่ยน Mobile phase ต้องคำนึงถึงด้วยว่า Mobile phase เก่าและใหม่เข้ากันหรือเปล่า ถ้าไม่สามารถเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันได้ต้องใช้สารอื่นเป็นตัวเชื่อมกลางโดย run mobile phase ตัวเชื่อมกลางอย่างน้อย 20 นาที

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

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

3.3 ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง

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

6.1 Rhecdyne Manual Injector

ล้าง syringe ให้สะอาดด้วย solvent 5 ครั้ง

↓

ล้าง syringe ด้วย sample ที่ inject 3 ครั้ง

↓

ดูด sample โดยไม่มีให้ฟองอากาศใน syringe แล้ว

set ปริมาตร ให้ได้ตามที่จะฉีดเข้าระบบ HPLC

↓

แทงเข็มเข้าไปใน injector ให้สุดโดย injector ต้องอยู่ตำแหน่ง **INJECT**

↓

ปิด injector ไปที่ตำแหน่ง LOAD

↓

ฉีด sample เข้าไปใน sample loop ของ injector

(ถ้าต้องการ fill sample ให้เต็ม loop ต้องฉีด sample มากกว่า valumn ของ loop ≥ 5 เท่า)

↓

เมื่อ HPLC system พร้อมให้บิด injector มาตำแหน่ง INJECT

(กรณีที่ไม่มี Auto-start ให้กดปุ่ม START ที่ C-R7)

↓

รอประมาณ 5-10 วินาที แล้วดึง syringe ออกจาก injector

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

↓

ล้าง needle port ด้วยน้ำกลั่น 5-10 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยอากาศ 10-20 มิลลิลิตร โดยใช้ syringe พลาสติกขนาด 5-25 มิลลิลิตร ที่ต่อด้วย needle port cleaner

↓

ล้างด้วย syringe ที่ใช้ฉีด sample ด้วย solvent 20-30 ครั้ง

3.4 ขั้นตอนการปิดเครื่อง

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

หมายเหตุ : กรณีที่จะหยุดใช้ เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

3.5 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

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

หมายเหตุ

1. การเปลี่ยน mobile phase ที่ใช้งานมาเป็น mobile phase ที่ใช้เก็บ column ต้องระวังการผสมกันระหว่าง mobile phase ทั้ง 2 ว่า สามารถผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันได้ดีต้องมี mobile phase ขั้นกลางอย่างละ 30 นาที
2. การล้างใช้ flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที หรือน้อยกว่าขึ้นกับชนิดของ column

ตัวอย่าง การล้างเครื่อง โดยมี mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็น buffer solution และ mobile phase ที่เก็บ column เป็น 70% MeOH

Buffer solution 30 นาที

↓

น้ำกลั่น HPLC 30 นาที

↓

70% MeOH 30 นาที

↓

ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)

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

3.7 ขั้นตอนการใช้งาน

1. กดปุ่มเปิด Power ที่เครื่อง C-R7A ในกรณีที่มี 2 Drive ให้ใส่แผ่น System disk ใน Drive 1 และแผ่นเก็บข้อมูลใน Drive 2 ในกรณีที่มี Board สำหรับเชื่อม HPLC กับ C-R7A ให้ทำการเชื่อสัญญาณระหว่างเครื่องทั้งสองโดยพิมพ์ **OPEN TRS 7** และ **ENTER** หลังจากปรากฏหน้าจอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กด WIN 1จะปรากฏหน้าจอ Menu ของ WIN 1 เลือกหัวข้อ 2 แล้วตามด้วย **ENTER** จะปรากฏ

เลือก **L** เพื่อเรียก Analysis File ในกรณีเคยสร้าง File เก็บไว้

E ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูกโหลดขึ้นมาใช้งาน

R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่าใน Analysis File ที่โหลดขึ้นมาใช้งานอยู่

A ในกรณีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File กับทุก ๆ ครั้งของการฉีด

การสร้าง Analysis File ใหม่

- เลือก **E** จะปรากฏหน้าจอของ Analysis File
- แก้ไข Parameter ดังต่อไปนี้ WIDTH 5

  DRIFT(uV/min) 0

  และ T.DBL(min) 1000
- กด **EXIT** เพื่อออกจากหน้าจอ จะปรากฏคำถาม | Save FILE? Y: yes N:no | กด **Y** จะปรากฏ

```
Part 1:
File Name 2:
```

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

```
Part 1:
File Name 2: ALCOHOL
```

หลังจากการ save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN 1

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

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

เลือก S เมื่อต้องการตั้งชื่อ File สำหรับ Save จะปรากฏ

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 จากนั้นรอสังเกตเห็นเส้น Baseline ค่อนข้างเรียบ จากนั้นทำการ Zero สัญญาณจาก Detector โดยปรับปุ่ม Zero ที่ Detector จนกว่าจะสามารถ Set 0 ที่ Detector ได้

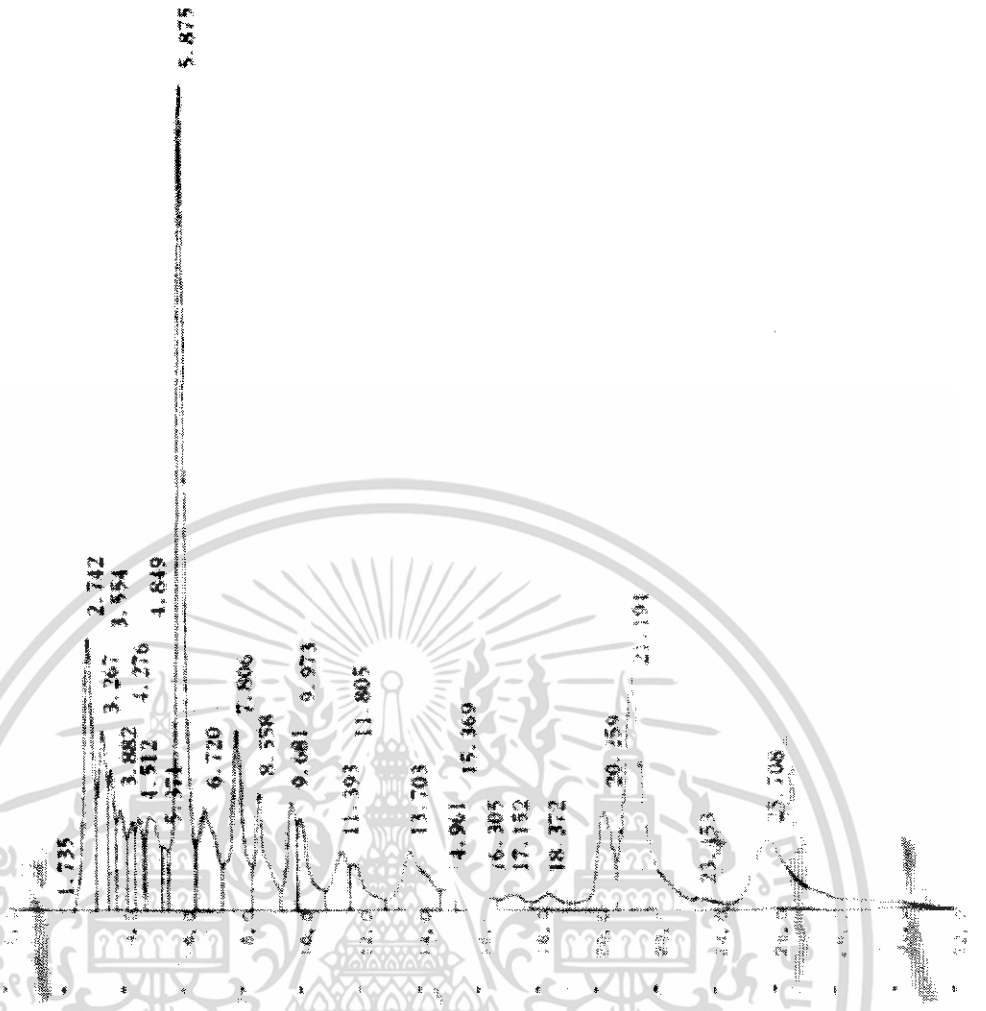
5. ทำการ Test slope ของสัญญาณที่ส่งมาโดยการกด S ที่เครื่อง C-R7A เครื่องจะใช้เวลาทดสอบประมาณ 10 เท่าของค่า Width ที่ตั้งไว้ใน Analysis File หลังจากการทดสอบสิ้นสุดค่า Slope ที่ได้จะถูก Save ใน Analysis File อัตโนมัติถ้าต้องการแก้ไขให้กลับเข้าสู่หน้า

6. Menu ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis File

7. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณ และให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START

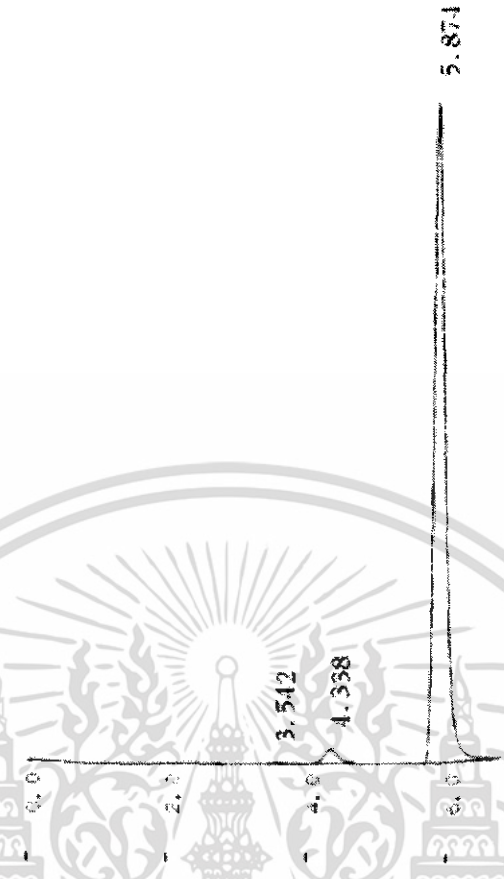
ในกรณีที่เครื่อง C-R7A สามารถเชื่อต่อและควบคุมการทำงานของ HPLC ได้จะสามารถขอดูค่าต่าง ๆ ของเครื่อง HPLC ผ่านเครื่อง C-R7A ได้จากหน้า Menu ของ WIN1 โดยเลือก **7:LC Monitor** ตามด้วย ENTER

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

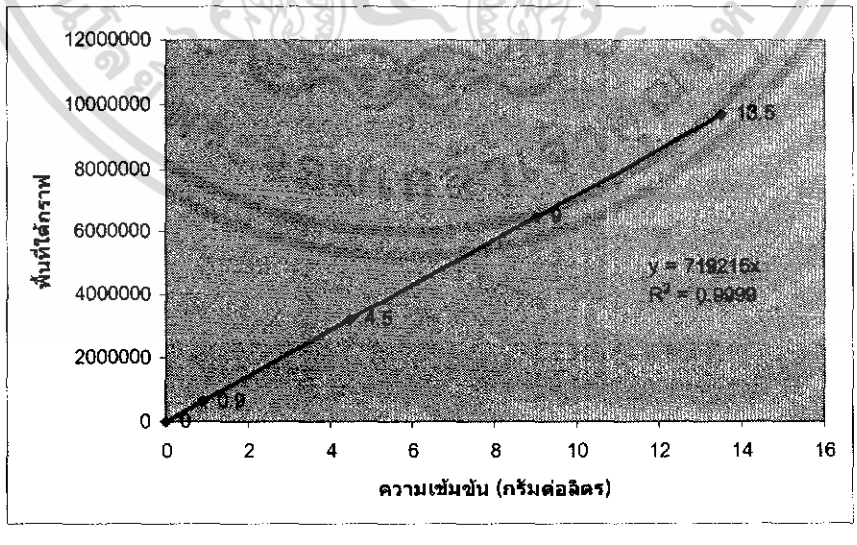


รูปที่ 7 โครมาโทแกรมแสดงค่า Retention time ของกรดแลกติก ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 , Retention time ของกรดแลกติกเท่ากับ 5.875 (โดยเทียบช่วงของค่า Retention time กับโครมาโทแกรมของกรดแลกติกมาตรฐาน รูปที่ 8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 โครมาโทแกรมแสดงค่า Retention time ของกรดแลกติกบริสุทธิ์ ได้ค่า Retention time ของกรดแลกติก เท่ากับ 5.874



รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานของกรดแลกติกที่ได้จากกรดแลกติกบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตางรางผลการทดลอง

1. ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก

ตารางที่1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร					
	กลูโคส	แลคโตส	น้ำตาลทราย	มอลโตส	ฟรุกโตส	ซูโครส
0	0.063	0.055	0.059	0.065	0.053	0.017
12	0.867	0.381	0.419	0.236	0.316	0.933
24	2.775	1.705	2.485	2.000	1.550	1.660
36	2.810	2.255	2.220	2.220	1.510	2.010
48	2.915	1.720	3.115	2.465	2.000	2.245
60	2.120	1.135	2.720	2.845	2.120	2.280
72	2.920	1.740	2.255	3.100	3.635	2.500
84	2.485	1.740	3.175	3.250	3.755	2.500
96	3.190	0.995	2.620	3.332	3.910	3.610

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)					
	กลูโคส	แลคโตส	น้ำตาลทราย	มอลโตส	ฟรุกโตส	ซูโครส
0	0.0124	0.1123	0.04258	0.0021	0.0871	0.0098
12	3.6982	2.5648	3.5112	2.2214	1.8996	1.7624
24	6.4521	4.0488	6.5104	4.8662	3.5482	3.8477
36	10.3346	6.4329	9.0786	6.8332	6.1240	5.9892
48	15.9023	9.6152	12.4265	9.4412	9.2015	8.4552
60	18.8447	13.8472	16.1206	11.8401	14.6217	13.9863
72	22.2468	15.2113	20.0204	15.4684	15.8722	15.4876
84	19.0314	16.2443	19.8657	15.2658	15.0022	16.3322
96	16.9902	16.1001	19.4084	12.9876	11.6532	10.9722

ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง (กรัมต่อลิตร)					
	กลูโคส	แลคโตส	น้ำตาลทราย	มอลโตส	ฟรุกโตส	ซูโครส
0	50	50	50	50	50	50
12	43.2250	46.9512	42.6595	45.2456	46.5523	44.5785
24	39.9525	42.0213	38.7254	40.2033	41.9812	41.6565
36	35.8212	37.3224	32.6524	35.9568	35.2034	39.4425
48	36.8859	31.5112	26.0221	29.7896	29.7841	35.2215
60	25.2121	26.1021	18.2663	22.6354	23.6645	25.6634
72	18.1338	21.8452	12.3802	16.4335	15.0573	24.2259
84	18.2042	14.2106	13.2561	16.0426	13.1254	15.7437
96	16.2068	14.0001	11.2066	15.4698	11.5364	15.1215

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4 ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง					
	กลูโคส	แลคโตส	น้ำตาลทราย	มอลโตส	ฟรุกโตส	ซูโครส
0	6.35	6.32	6.33	6.34	6.34	6.71
12	4.26	5.09	5.04	4.29	3.91	4.61
24	2.41	5.12	4.91	3.71	3.39	4.26
36	3.25	5.04	4.75	3.53	3.28	4.08
48	3.29	4.62	5.08	3.48	3.25	3.93
60	3.24	5.02	4.53	3.42	3.22	3.89
72	3.28	4.40	5.12	3.37	3.18	3.73
84	3.15	5.15	4.29	3.30	3.15	3.66
96	3.12	5.15	4.14	3.25	3.11	3.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก

ตารางที่5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและความเข้มข้นต่างกัน

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร			
	G_{20}	G_{30}	G_{40}	G_{50}
0	0.020	0.019	0.017	0.012
12	1.320	1.350	1.085	0.866
24	2.930	3.045	3.060	1.415
36	3.640	4.220	3.730	2.055
48	4.350	5.020	4.600	2.530
60	4.400	5.110	4.680	2.570
72	4.450	5.182	4.740	3.010
84	4.610	5.190	4.810	3.020
96	4.950	5.130	4.850	3.990

หมายเหตุ

G_{20} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

G_{30} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

G_{40} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

G_{50} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่6 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและความเข้มข้นต่างกัน

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)			
	G_{20}	G_{30}	G_{40}	G_{50}
0	0.0042	0.0041	0.0898	0.1895
12	2.0542	3.0564	4.0046	1.5951
24	3.5955	5.7684	7.8564	3.6679
36	5.2011	8.5038	11.9224	8.2102
48	6.8246	11.6958	16.4566	14.8417
60	8.6214	15.2252	20.5216	16.3466
72	9.8384	17.5642	25.3222	15.6475
84	9.6232	16.2102	23.8569	15.5014
96	7.6142	16.0065	22.0101	10.0012

หมายเหตุ

G_{20} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

G_{30} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

G_{40} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

G_{50} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและความเข้มข้นต่างกัน

ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง (กรัมต่อลิตร)			
	G_{20}	G_{30}	G_{40}	G_{50}
0	20	30	40	50
12	19.5115	26.2154	38.1365	45.2250
24	12.5810	24.2150	30.1458	38.6525
36	10.2560	19.0581	22.9874	30.8212
48	9.6518	19.5264	21.2016	28.1859
60	5.2310	14.7589	20.9814	17.4125
72	5.1121	10.4125	14.2571	16.4338
84	4.1526	10.2154	11.5372	16.2042
96	4.2150	9.1142	10.1132	15.9068

หมายเหตุ

G_{20} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

G_{30} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

G_{40} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

G_{50} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่8 ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและความเข้มข้นต่างกัน

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง			
	G_{20}	G_{30}	G_{40}	G_{50}
0	6.74	6.87	6.90	6.89
12	4.47	4.48	4.40	4.40
24	3.74	3.75	3.73	3.80
36	3.43	3.42	3.42	3.55
48	3.29	3.31	3.33	3.46
60	3.29	3.27	3.28	3.43
72	3.17	3.15	3.20	3.35
84	3.13	3.11	3.13	3.29
96	3.21	3.19	3.35	3.23

หมายเหตุ

G_{20} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

G_{30} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

G_{40} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

G_{50} คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ศึกษาการเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

ตารางที่9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรและน้ำหนักแห้งของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมภายในฟลาสก์ชุดที่หนึ่ง

ชั่วโมงที่	ค่าการเจริญเติบโตของเซลล์ในฟลาสก์ชุดที่หนึ่ง	
	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 620 นาโนเมตร	น้ำหนังแห้ง
0	0.023	0.090
12	0.491	0.138
24	1.760	0.197
36	3.355	0.355
48	3.460	0.486
60	3.940	0.631
72	3.640	0.925
84	4.130	1.087
96	3.450	1.262

ตารางที่10 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)		
	A	B	C
0	4.6678	3.4294	4.2595
24	4.0927	7.7172	13.3898
48	5.2267	9.3800	13.3784
72	7.5532	9.6462	15.2333
96	9.1623	13.3504	15.2725

หมายเหตุ

A คือ ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มเลี้ยงในฟราสก์ขนาด 2 ลิตร

B คือ เติมแคลเซียมคาบอร์เนต บ่มเลี้ยงในฟราสก์ขนาด 2 ลิตร

C คือ เติมแคลเซียมคาบอร์เนต บ่มเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่11 ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม

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

หมายเหตุ

A คือ ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มเลี้ยงในฟราสก์ขนาด 2 ลิตร

B คือ เติมแคลเซียมคาบอร์เนต บ่มเลี้ยงในฟราสก์ขนาด 2 ลิตร

C คือ เติมแคลเซียมคาบอร์เนต บ่มเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม

ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง (กรัมต่อลิตร)		
	A	B	C
0	40	40	40
12	34.58	36.76	37.42
24	32.76	35.78	32.22
36	32.4	32.06	29.64
48	32.1	27.56	20.42
60	30.24	26.22	20.36
72	28.56	23.62	20.04
84	24.18	20.56	19.94
96	23.79	19.94	18.78

หมายเหตุ

A คือ ไม่เติมแคลเซียมคาบอร์เนต บ่มเลี้ยงในฟราสก์ขนาด 2 ลิตร

B คือ เติมแคลเซียมคาบอร์เนต บ่มเลี้ยงในฟราสก์ขนาด 2 ลิตร

C คือ เติมแคลเซียมคาบอร์เนต บ่มเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก

Oneway

ANOVA

Data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	117.297	5	23.459	11.714	.000
Within Groups	24.032	12	2.003		
Total	141.329	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Data

Duncan[a]

Lactic	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Maltose	3	15.4695	
Fructose	3	15.8707	
Lactose	3	16.2414	
Sucrose	3	16.3307	
Cane sugar	3		20.1668
Glucose	3		22.2489
Sig.		.503	.097

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลก

Oneway

ANOVA

Data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	362.882	3	120.961	32.256	.000
Within Groups	30.000	8	3.750		
Total	392.882	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Data

Duncan[a]

Lactic	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Glucose 20 g/L	3	9.8395		
Glucose 50 g/L	3		16.3489	
Glucose 30 g/L	3		17.5614	
Glucose 40 g/L	3			25.3207
Sig.		1.000	.465	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพการผลิตกรดแลกติก ในฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร

Oneway

ANOVA

Data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	58.573	2	29.286	29.286	.001
Within Groups	6.000	6	1.000		
Total	64.573	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Data

Duncan[a]

Lactic	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Flask #1	3	9.1608	
Flask #2	3		13.3501
Fermentor	3		15.2708
Sig.		1.000	.057

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้