

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ
Lactobacillus casei ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต



โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Effect of different Nitrogen sources on Lactic Acid Production by
Calcium Alginate Immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 10863**



**A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2007**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

นักศึกษา นางสาวกรรณก เกษแก้ว รหัสประจำตัว 47050502
นางสาวเพ็ญภา พหลยุทธ รหัสประจำตัว 47050521

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.สุใจ ชูจันทร์
ปีการศึกษา 2550
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ลินจง สุขคำกู	ลินจง สุขคำกู
กรรมการ ดร.จิตาภา ทิน้อย	จิตาภา ทิน้อย
กรรมการ รศ.สุใจ ชูจันทร์	สุใจ ชูจันทร์

.....
ดร. นวตพรรณ ธารนง

(รศ.ดร. นวตพรรณ ธารนง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต
นักศึกษา	นางสาวกรรณก เกษแก้ว รหัสประจำตัว 47050502 นางสาวเพ็ญภา พหลยุทธ รหัสประจำตัว 47050521
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยศึกษาแหล่งไนโตรเจนในอาหารสังเคราะห์ทั้งหมด 7 สูตร แหล่งไนโตรเจนที่ศึกษามีทั้งแหล่งอินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน และยูเรีย แหล่งอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมไนเตรท ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 ในสภาวะนิ่ง จากผลการทดลองพบว่ายีสต์สกัด 5 กรัมผสมกับเปปโตน 10 กรัม เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 31.67 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิต 0.81 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น และอัตราการผลิต 0.53 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 60 ของระยะเวลาการหมัก และได้ศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในอาหารสังเคราะห์ระดับพลาสติก 2 ลิตร และถังหมักแบบไบโพดกวนขนาด 2 ลิตร พบว่าในระดับถังหมักให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดเมื่อเทียบกับพลาสติก โดยผลิตกรดแลกติกได้ 29.57 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.81 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 36

Special Project Title Effect of different Nitrogen sources on Lactic Acid Production by Calcium Alginate Immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 10863

Name Miss Kornkanok Ketkaew
Miss PennaPha Phaholyuth

Department Applied Biology

Program Industrial Microbiology

Academic Year 2007

Special Project Advisor Associate Professor Sukjai Choojun

ABSTRACT

Optimization of nitrogen sources for lactic acid production by calcium alginate immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 10863 was studied. Seven nitrogen sources were organic as yeast extract, peptone and urea and inorganic as ammonium sulphate and sodium nitrate. *L. casei* ATCC 10863 was fermented at 37 °C, pH 6.5 in stationary state. The result showed that the suitable nitrogen source was 5 g yeast extract mixed with 10 g peptone. The lactic acid concentration was 31.67 g/l at 60 hr fermentation time, yield and productivity rate were 0.81 g/g substrate and 0.53 g/lhr, respectively. The efficiency of lactic acid production in 2 liters flask and 2 liters fermentor were investigated. The result presented that the fermentation in 2 liters fermentor showed higher yield of lactic acid than 2 liters flask. The lactic acid concentration, yield and productivity rate were 29.57 g/l, 0.81 g/g substrate and 0.75 g/lhr, respectively at 36 hr fermentation time.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงการพิเศษ ซึ่งโครงการพิเศษนี้ไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ การตอบข้อซักถามของผู้จัดทำ และช่วยปรับปรุงข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทำการทดลอง จนกระทั่งโครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ลินจง สุขลัญ ประธานกรรมการ และ ดร.จิตภา ทิน้อย กรรมการ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และช่วยปรับปรุงข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณนักศึกษาปริญญาโท ที่ให้คำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการทดลอง และสอนการใช้เครื่องมือต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณแม่บ้าน และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่คอยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับเรื่องการเปิดและปิดห้องปฏิบัติการ ในวันที่มีการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ ที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และช่วยกันคิดแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างทำการทดลอง ทำให้การทำโครงการพิเศษนี้เป็นไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนกำลังใจในการทำโครงการพิเศษครั้งนี้

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่มีความสนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงการพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กรกนก

เกษแก้ว

เพ็ญภา

พหลยุทธ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 กรดแลคติก (Lactic acid)	3
2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก	9
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก	18
2.4 ความหมายของเซลล์ที่ถูกตรึง	21
2.5 วิธีการตรึงเซลล์	22
2.6 อัลจิเนต (Alginate)	25
2.7 ข้อดีและข้อเสียของการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง	26
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	29
3.1 อุปกรณ์	29
3.2 สารเคมี	30
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ	30
3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน	31
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	36
4.1 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ	36

Lactobacillus casei ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.1 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	36
4.1.2 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	37
4.1.3 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	39
4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร	40
4.3 ผลการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติก ในอาหารสังเคราะห์ระดับพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร	42
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	47
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	53
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์	55
ภาคผนวก ค ตารางบันทึกผลการทดลอง	65

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก	4
2.2 แสดงลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียแลคติก	13
2.3 ลักษณะความแตกต่างของ <i>Lactobacillus</i> sp.	14
3.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ที่ใช้ในการทำโครงการพิเศษ	32
4.1 สรุปผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	40
4.2 แสดงค่า P-value ของการผลิตกรดแลคติก โดยใช้ถังหมักและฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T-Test	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของกรดแลกติกชนิด L (+) lactic acid และชนิด D (-) lactic acid	4
2.2 โครงสร้างทางเคมีของกรดพอลิแลกติกแอซิด	5
2.3 กลไกการผลิตกรดแลกติก ด้วยวิถีไกลโคไลซิสโดยแบคทีเรียกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ	11
2.4 กลไกการผลิตกรดแลกติก โดยแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ	12
2.5 วิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของกลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli	15
2.6 วิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของกลุ่ม heterofermentative lactobacilli	16
2.7 วิธีฟอสโฟกลูโคเนต	17
2.8 ลักษณะของ <i>Lactobacillus casei</i>	18
2.9 แสดงการเชื่อมเซลล์กับตัวพุง (carrier binding)	23
2.10 แสดงการตรึงเซลล์โดยการเชื่อมขวาง (Cross-linking method)	24
2.11 แสดงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มในช่องตาข่าย (lattice type)	25
2.12 แสดงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type)	25
2.13 แสดงโครงสร้างพอลิเมอร์ของอัลจิเนต	26
4.1 แสดงปริมาณกรดแลกติกในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	37
4.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	38
4.3 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	39
4.4 แสดงปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาล พีเอช และจำนวนเซลล์จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกโดย <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.5 แสดงปริมาณกรดแลกติก และการใช้น้ำตาลกลูโคส ของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	43
4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการหมักเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	43



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

กรดแลกติกหรือกรดนมเป็นกรดอินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในอาหาร พบตามธรรมชาติในนมเปรี้ยว ผักดองชนิดต่างๆ และเนยแข็ง เป็นต้น (Gardner, 1972) กรดแลกติกและอนุพันธ์ของกรดแลกติก เช่น lactylated mono-and diglycerides of fatty acid, glyceryl lactostearate และ glyceryl lactopalmitate ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านอาหาร เกษษกรรม อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เนื่องจากกรดแลกติกประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลและไฮดรอกซิล ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงหมู่ทางเคมีได้หลากหลาย ได้สารเคมีชนิดใหม่ที่มีประโยชน์ เช่น propylene oxide, propylene glycol, acrylic acid, 2,3-pentanedione และ lactate ester กรดแลกติกใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิแลกติกแอซิด (polylactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable plastic) ทดแทนพลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม นอกจากนี้กรดแลกติกยังใช้เป็นสารปรับความเป็นกรดต่าง ใช้เป็นวัตถุกันเสีย สำหรับอนุพันธ์ของกรดแลกติกที่อยู่ในรูปของแคลเซียมแลคเตตมีการใช้เป็นวัตถุทำให้คงรูป (Firming Agents) โดยใช้กับผลไม้ที่นำมาผลิตแยม เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพกติน ในทางการแพทย์ใช้แคลเซียมแลคเตตเป็นส่วนผสมของยาลดกรดในกระเพาะ และช่วยรักษาการขาดแคลเซียมในร่างกาย (Dailey และคณะ, 2000)

การผลิตกรดแลกติกสามารถผลิตได้จากกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ โดยการผลิตทางเคมี ข้อดีคือใช้เวลาในการผลิตกรดแลกติกที่รวดเร็วและ กรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณมาก ส่วนข้อเสียคือจะทำให้ได้กรดแลกติกที่อยู่ในรูปผสม(D,L- lactic) ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์จึงทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงและมีความยุ่งยาก รวมทั้งยังเกิดสารพิษในการผลิต การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพมีข้อดีคือ สามารถเลือกผลิตให้อยู่ในรูป D (-) Lactic หรือ L (+) Lactic โดยการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อหาผลผลิตกรดแลกติกที่ผลิตเฉพาะ L (+) Lactic และในการผลิตไม่เกิดสารพิษขึ้น ส่วนข้อเสียคือใช้เวลาในการผลิตกรดแลกติกนาน และให้ผลผลิตที่ต่ำ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยวิธีการตรึงเซลล์และศึกษาองค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

2.1 ศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

2.1.1 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

2.1.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

2.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารสังเคราะห์ระดับพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยวิธี Total Plate Count

2.3 ศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยทำการทดลองหาชนิดและปริมาณความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารสังเคราะห์ระดับพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยวิธี Total Plate Count หลังจากนั้นศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกโดย HPLC วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Phenol sulfuric) (Dobois, 1956) และวัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

1.4.2 ได้ทราบถึงแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก

1.4.3 เป็นแนวทางของการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับห้องทดลอง (lab scale) เพื่อประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กรดแลกติก (Lactic acid)

2.1.1 ความสำคัญของกรดแลกติก

กรดแลกติกหรือกรดนมได้มีการค้นพบครั้งแรก โดย Scheele นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดน ในปี ค.ศ. 1780 ในนมเปรี้ยว และได้ตั้งชื่อว่า Mjolkksyra เป็นกรดชนิดแรกๆที่มีการนำมาใช้ในอาหาร พบตามธรรมชาติในนมเปรี้ยว กะหล่ำปลี ผักดองชนิดต่างๆ เบียร์ และเนยแข็ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในเลือด และกล้ามเนื้อของสัตว์ด้วย (Gardner, 1972)

กรดแลกติกมีคุณสมบัติดูดความชื้นได้ง่ายอาจอยู่ในรูปเป็นผลึก หรือของเหลวข้น ไม่มีสี มีกลิ่นครีมอ่อนๆ ละลายน้ำได้ดี ให้รสเปรี้ยวปานกลาง ในระดับอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้กรดแลกติกเป็นสารช่วยให้ความเป็นกรด เป็นวัตถุกันเสีย เป็นส่วนผสมของสารที่ใช้ในการหมักเนื้อ เป็นสารให้กลิ่นรส เป็นสารช่วยเน้นกลิ่นรส ช่วยควบคุมความเป็นกรด ความเป็นด่าง และเป็นตัวทำละลาย เป็นต้น (FDA, 1988) ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้กรดแลกติก ได้แก่ แยม เยลลี่ เซอร์เบต ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน และเครื่องดื่มชนิดต่างๆ ซอส และผักดอง เป็นต้น (ศิวาพร, 2546)

สำหรับแคลเซียมแลคเตต มีการใช้ในผลิตภัณฑ์ผักผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพ็กติน ทำให้ผักและผลไม้มีความคงตัวมากขึ้น ช่วยเปลี่ยนแปลงของสีกลิ่นรสของผักและผลไม้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป โดยการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ โลหะที่ปนเปื้อนมาช่วยทำให้เกิดเจลลิ่งขึ้นในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ช่วยปรับปรุงคุณภาพนมผง นมข้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมสำหรับผู้ป่วยที่ขาดแคลเซียมด้วย โดยอาจจะเสริมในนม น้ำผลไม้ หรืออาหารอื่นๆ หรืออาจบริโภคน้ำในรูปแลคเตตได้เลย ส่วนผู้ขาดเหล็ก สังกะสี และแมกนีเซียม ก็สามารถบริโภคอาหารที่มีการเสริมด้วยเฟอร์รัสแลคเตต (ferrous lactate) ซิงค์แลคเตต (zinc lactate) และแมกนีเซียมแลคเตต (magnesium lactate) สำหรับในผลิตภัณฑ์ปลา เนื้อและสัตว์ปีก มีการใช้กรดแลกติกหรือเกลือแลคเตตช่วยในการยืดอายุเก็บด้วย (Dailey และคณะ, 2000)

อนุพันธ์ของกรดแลกติก เช่น lacylated mono-and diglycerides of fatty acid นิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ โดยเฉพาะในแป้งสำเร็จรูปและเนยขาว เป็นต้น ส่วน calciumstearyl-2-lactylate นิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมปัง (FDA, 1988)

2.1.2 คุณสมบัติของกรดแลกติก

คุณสมบัติทางกายภาพ

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

ลำดับ	คุณสมบัติทางกายภาพ	กรดแลกติก
1	น้ำหนัก โมเลกุล (Molecular weight)	90.08
2	จุดหลอมเหลว (Melting point)	16.8 °C
3	จุดเดือด (Boiling point)	82 °C ที่ความดัน 0.5 มิลลิเมตรปรอท 122 °C ที่ความดัน 14 มิลลิเมตรปรอท
4	ค่าคงที่ของการแตกตัว (K_a ที่อุณหภูมิ 25 °C)	1.37×10^{-4}
5	ค่าความร้อนของการเผาไหม้ (ΔH_c)	1361 กิโลจูล/โมล
6	ค่าความร้อนจำเพาะ (C_p ที่อุณหภูมิ 20 °C)	190 จูล/โมล/°C

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

คุณสมบัติทางเคมี

กรดแลกติกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid สูตรโมเลกุล $C_3H_6O_3$ ซึ่งมี 2 ซึ่งมี 2 ไอโซเมอร์ คือ ดังแสดงในรูปที่ 2.1



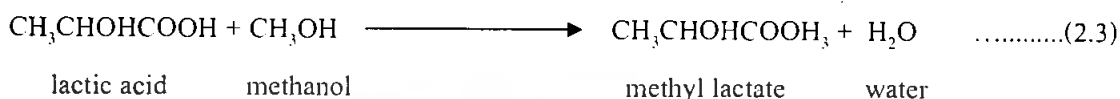
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดแลกติกชนิด L (+) lactic acid และชนิด D (-) lactic acid

ที่มา : <http://www.lactospore.com/back.htm>

การเปลี่ยนรูปของ D (-) lactic acid และ L (+) lactic acid เกิดจากการหมุนของเอทิลีนออกไซด์บริดจ์ (ethylene oxide bridge) ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่หนึ่งและอะตอมที่สองโดยเกิด tautomeric shift ของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) บนคาร์บอนอะตอมที่สองไปเป็นหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ของคาร์บอกซิล (carboxyl) กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 3 นำกรดแลกติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำอนุพันธ์เอสเตอร์ คือ เมทิลแลกเตต นำเมทิลแลกเตตมากลั่น แล้วนำมาย่อยจะได้กรดแลกติก ส่วนเมทานอล ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) และสารปนเปื้อนอื่นๆ จะถูกกำจัดออกโดยนำผ่านถ่านกัมมันต์ และวิธีแลกเปลี่ยนไอออน (ionexchange) ดังแสดงในสมการที่ 2.3 และ 2.4



ขั้นตอนที่ 4



ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

2.1.3.1 กระบวนการผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกมี 2 ชนิด คือ โฮโมแลกติกแบคทีเรีย (Homolactic bacteria) และเฮเทอโรแลกติกแบคทีเรีย (Heterolactic bacteria) ซึ่งขั้นตอนในการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ แสดงในสมการที่ 2.5 และ 2.6 (Muller, 2001)



ที่มา : Muller (2001)

นอกจากนี้ กรดแลกติกยังสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น ฟังไจ และยีสต์ ซึ่งสามารถหมักแบบกะ (batch fermentation) แบบกึ่งกะ (Fed- batch fermentation) และแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) ปัจจัยที่สำคัญในการผลิต คือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ ฟิเซ อุณหภูมิ อากาศ

Rukas และ Kotzckidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus lactis* พบว่าการหมักแบบกะโดยเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ *Lactobacillus casei* ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 30 กรัมต่อลิตร *Lactobacillus casei* ให้ปริมาณกรดแลกติก 25 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงแบบเซลล์ผสมกรดแลกติกจะสูงถึง 45 กรัมต่อลิตร

Pauli และ Fitzpatrick (2002) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และมีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งไนโตรเจนสังเคราะห์ที่มีราคาแพง โดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัดและสารสกัดจากมอลต์ลงไป แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตมอลต์เปรียบเทียบกับยีสต์สกัด โดยเชื้ออิสระ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้ให้ผลผลิตเทียบเท่ากับยีสต์สกัด แต่มีข้อเสีย คือ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิต ผลผลิตที่ได้จะไม่มีความบริสุทธิ์ และต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการทำให้ผลผลิตมีความบริสุทธิ์

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส แลคโตส กลิเซอรอล โซโลส เวช และแป้ง โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงเมื่อใช้กลูโคส ฟรุกโตส และมอลโตส เป็นสารตั้งต้น

Bulut และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ได้แก่ ซูโครส กลูโคส โมลาส ฝักถั่วและรำข้าวสาลี โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณสูงเมื่อใช้กลูโคส

Wee และคณะ (2004) ได้นำโมลาสซึ่งมีซูโครสเป็นองค์ประกอบมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาเป็นสารตั้งต้น นำมาผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 95.7 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 94.9

Huang (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณสูง ประมาณ 0.85-0.92 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 การประยุกต์ใช้กรดแลกติก

2.1.4.1 อุตสาหกรรมอาหาร (Food industry)

- สารเพิ่มความเปรี้ยว (acidulants)
- ป้องกันการเสื่อมสลายของแร่ธาตุ (mineral fortification)
- วัตถุกันเสีย (preservatives)
- ปรับปรุงคุณภาพจุลินทรีย์ (improving microbial quality)
- สารให้กลิ่นรส (flavours)
- สารควบคุมพีเอช (pH regulators)

2.1.4.2 อุตสาหกรรมยา (Pharmaceutical industry)

- ควบคุมการปลดปล่อยยาจากระบบนำส่งยา (controlled drug delivery systems)
- ไหมละลาย (surgical sutures)
- การเตรียมแร่ธาตุ (mineral preparations)
- อวัยวะเทียม (prostheses)
- ผลิตยาเม็ด (tableting)

2.1.4.3 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Cosmetic industry)

- สารควบคุมพีเอช (pH regulators)
- สารป้องกันการเกิดหินปูน (anti - tartar agents)
- สารให้ความชุ่มชื้น (moisturizers)
- สารดูดความชื้น (humectants)
- ยารักษาสิว (anti - acne agents)
- ครีมบำรุงผิว (skin - hightening agents)
- ครีมลบเลือนริ้วรอย (skin - rejuvenating agents)

2.1.4.4 อุตสาหกรรมเคมี (Chemical industry)

- สารที่ทำให้เป็นกลาง (neutralizers)
- สารประกอบโลหะเชิงซ้อน (metal complexing agents)
- สารขจัดคราบ (descaling agents)
- สารชะลอการหลั่งกรด (slow acid release agents)
- สารควบคุมพีเอช (pH regulators)
- สารทำความสะอาด (cleaning agents)
- สารที่ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม (green solvents)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4.5 ส่วนประกอบยาและสารเคมีในอุตสาหกรรม (Chemical feedstock)

- 2,3 - pentanedione
- poly (lactic acid)
- propylene oxide
- ethyl lactate
- acetaldehyde
- propanoic acid
- acrylic acid

ที่มา : Wee และคณะ (2006)

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก

แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria; LAB) จัดอยู่ในแฟมิลี Lactobacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase negative) ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีไซโตโครมทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนกรด มีทั้งลักษณะรูปร่างท่อน และรูปร่างกลม (Salminen, 1998) ในการเจริญใช้พลังงานจากกระบวนการหมัก (fermentation) น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส มีความต้องการอาหารที่สมบูรณ์ (complex medium) ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียแลกติก คือความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ซึ่งทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผักดอง เนยแข็ง แบคทีเรียแลกติกมีบทบาทในการหมักอาหาร และเครื่องดื่มหหลายชนิดด้วยเช่นกัน เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผัก และผลไม้ดอง ไข่กรอก เบียร์ ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ แบคทีเรียแลกติกต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังต้องการวิตามิน และเกลือแร่อีกหลายชนิดในการเจริญซึ่งความต้องการสารอาหารต่างๆ เหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิด และสายพันธุ์ (Priest และ Campbell, 1996) Orla-Jensen (1919)) เป็นผู้เริ่มจัดอนุกรมวิธานแบคทีเรียแลกติกอย่างเป็นระบบ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส แบ่งได้ 2 ชนิด ดังนี้

2.2.1 โฮโมแลกติกเฟอร์เมนเทชัน (Homolactic fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ โดยกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) โดยกลไกการเกิดกรดแลกติก คือ การเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูวิกแอซิด (pyruvic acid) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ด้วยวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) แล้วเปลี่ยนไพรูวิกแอซิดเป็นกรดแลกติก ดังรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 เฮเทอโรแลกติกเฟอร์เมนเทชัน (Heterolactic fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลกติก เอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก โดยกระบวนการหมักได้จากกลุ่มเฮเทอโรแลกติกเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) ดังรูปที่ 2.4

ปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกออกเป็น 12 สกุล (Salminen, 1998) ได้แก่ *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* แสดงลักษณะและความแตกต่างของแบคทีเรียแลกติกแต่ละสกุล แสดงดังตารางที่ 2.2

Lactobacillus sp. เป็นแบคทีเรียแลกติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะฟิโนไทป์ คุณสมบัติทางชีวเคมี และทางสรีระ เนื่องจาก ความแตกต่างของโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ภายในสกุลสูงระหว่างร้อยละ 32-53 (Bd.Tm) สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 22-53 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5.5-6.2 หรือเจริญได้ที่พีเอช 5.0 หรือต่ำกว่านี้ได้

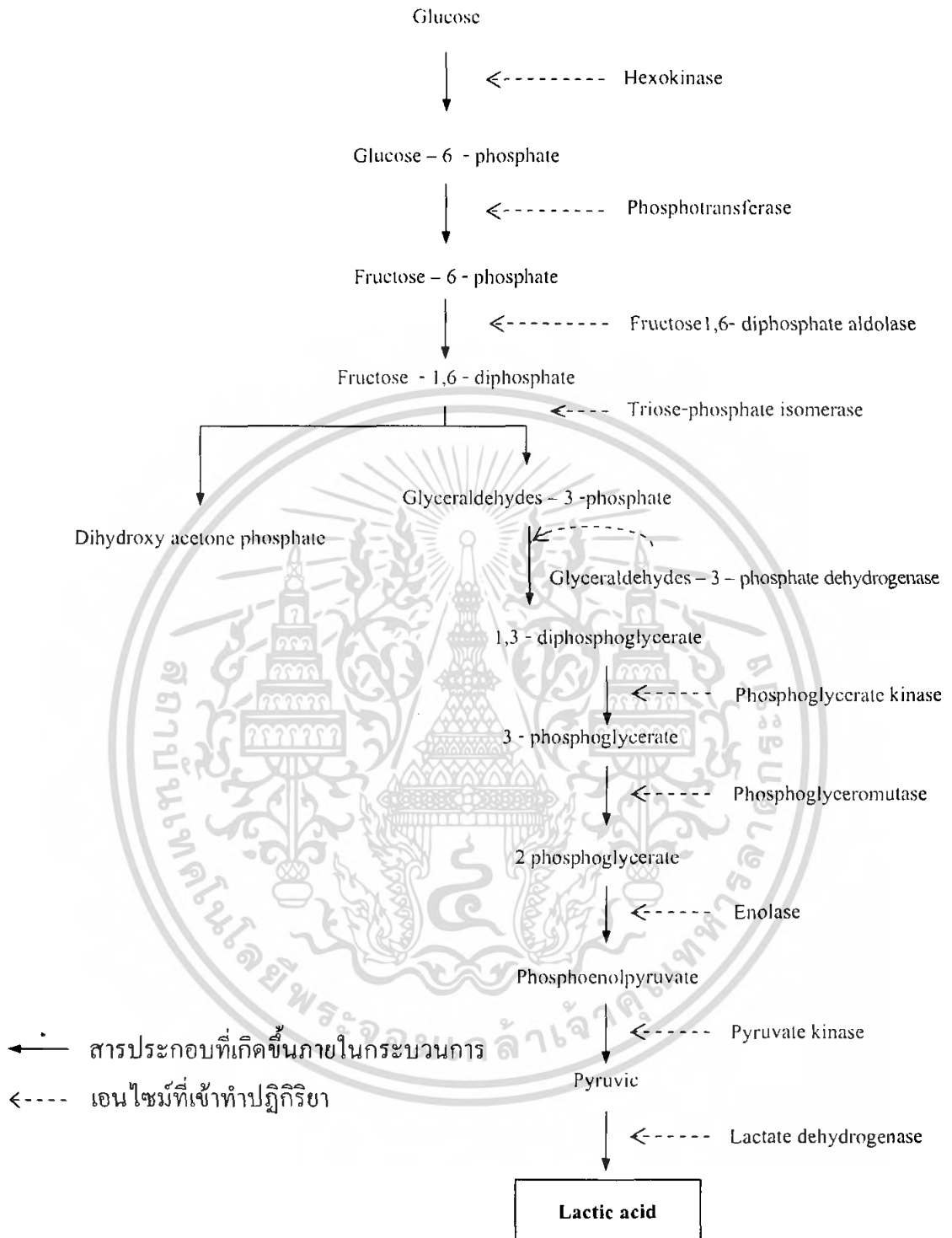
Lactobacillus sp. จัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Stiles และ Holzappel, 1997) ดังนี้คือ

Obligately homofermentative

Facutative heterofermentative

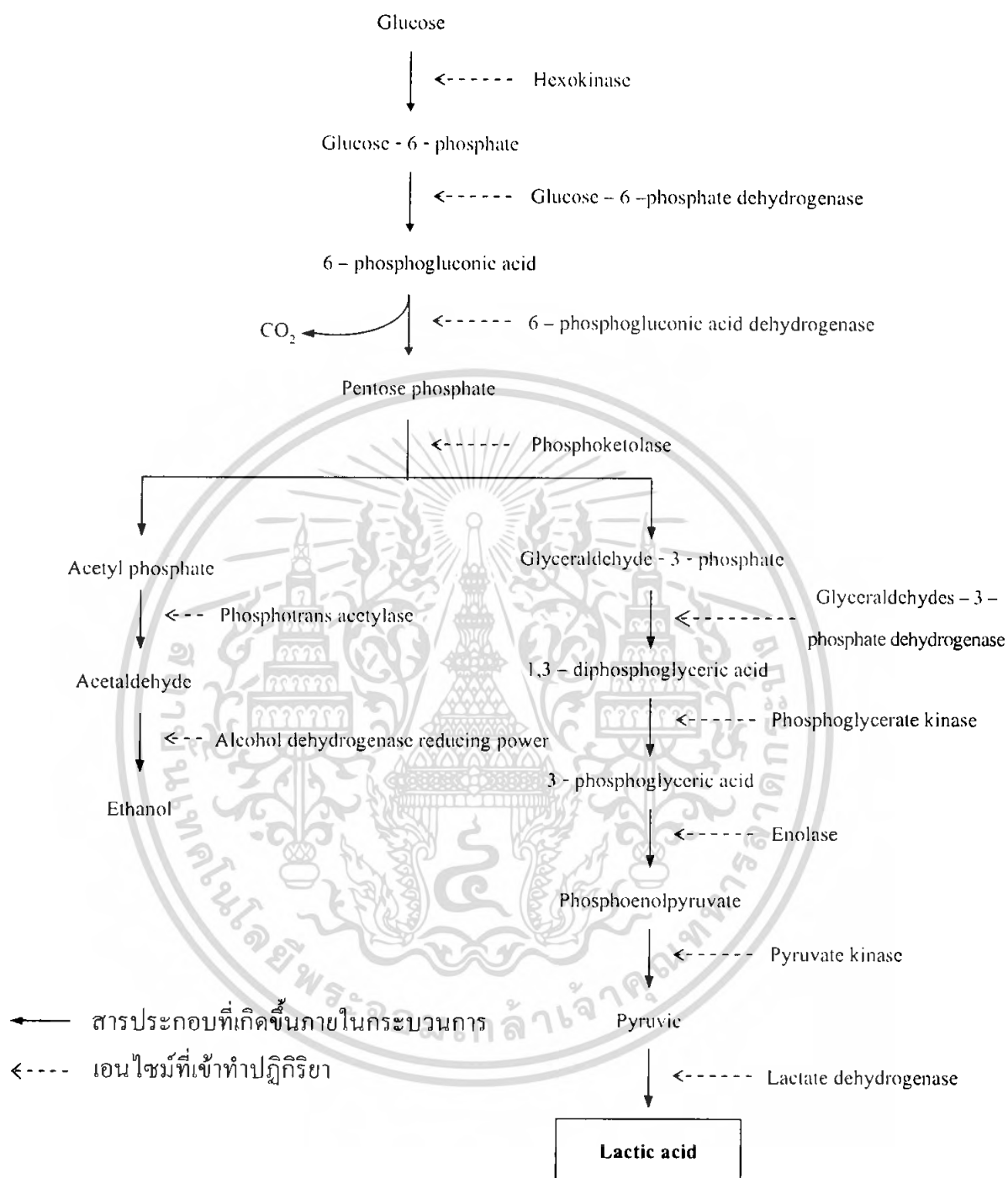
Obligately heterofermentative

ลักษณะความแตกต่างของแต่ละกลุ่ม แสดงดังตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กลไกการผลิตกรดแลกติก ด้วยวิถีไกลโคไลซิส โดยแบคทีเรียกลุ่ม โซโมเฟอร์เมนเททีฟ
ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 กลไกการผลิตกรดแลกติก โดยแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ
ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียแลกติก

ลักษณะ	รูปร่างท่อน		รูปร่างกลม							
	Carnob.	Lacnob.	Aaeroc.	Enteroc.	Lactoc. Vagoc.	Leucon. Oenoc.	Pedioc.	Streptoc.	Tetragenoc.	Weissella
1. เซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
2. ผลิต CO ₂ จากกลูโคส	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
3. เจริญที่ 10 องศาเซลเซียส	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
4. เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส		±	-	+	-	-	±	±	-	-
5. เจริญที่ความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์ 6.5%	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±
6. เจริญที่ความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์ 18%		-	-	-	-	-	-	-	+	-
7. เจริญที่พีเอช 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
8. เจริญที่พีเอช 9.6	-		+	+	-	-	-	-	+	-
9. ชนิดของกรดแลกติก	L	D,L,DL	L	L	L	D	D,DL	L	L	D,DL

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

ตารางที่ 2.3 ลักษณะความแตกต่างของ *Lactobacillus* sp.

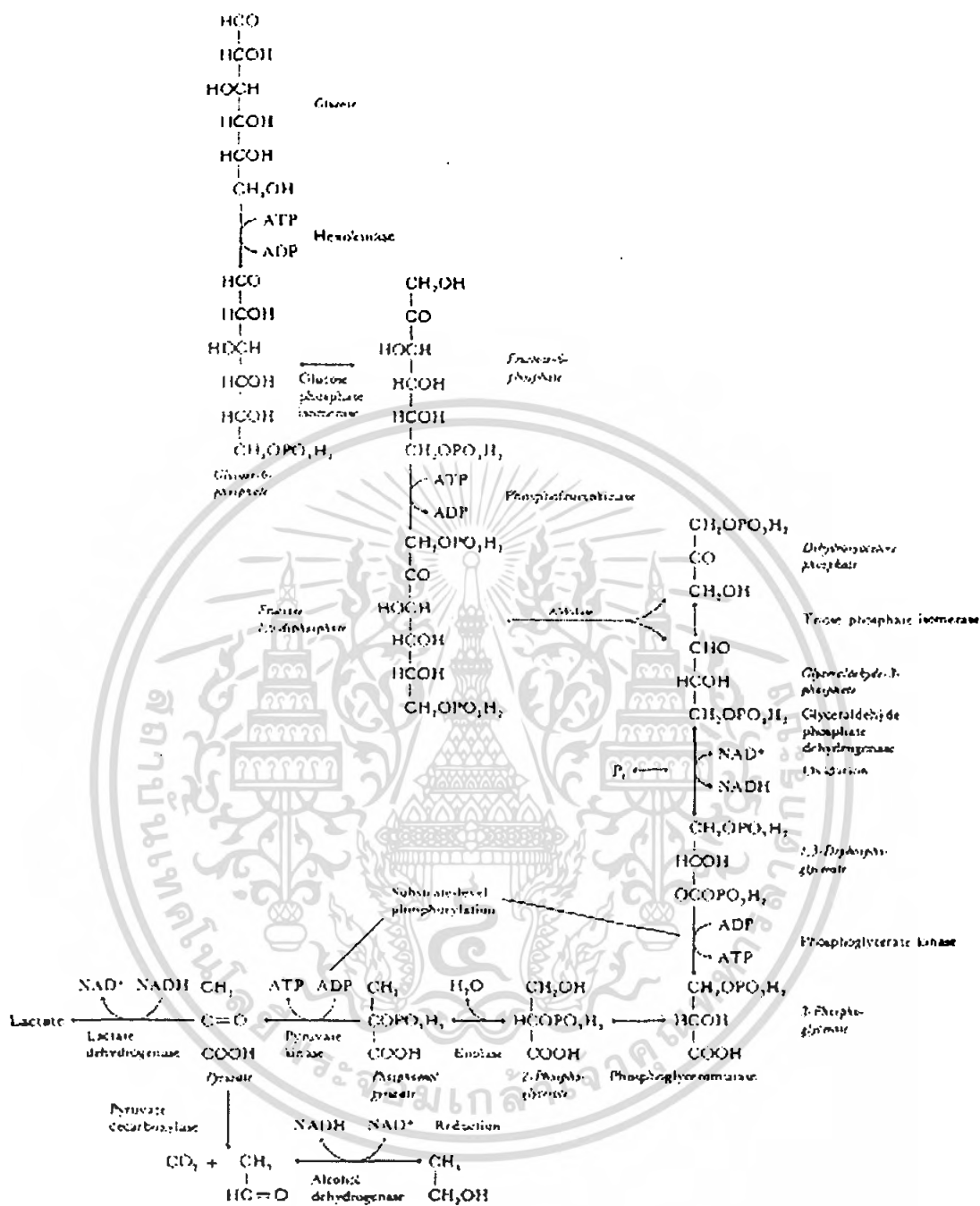
ลักษณะ	กลุ่ม I Obligately homofermentative	กลุ่ม II Facutative heterofermentative	กลุ่ม III Obligately heterofermentative
การหมักน้ำตาลเพนโทส	-	+	+
การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากกลูโคส	-	-	+
การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากกลูโคเนต	-	+	+
เอนไซม์ FDP aldolase	+	+	-
เอนไซม์ฟอสโฟทีโกลเตส	-	+	+
ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียแลคติก	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbruckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. Salivarius</i>	<i>L. casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. sakei</i>	<i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i>

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส (มากกว่าร้อยละ 85) เป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) จูลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ Fructose-1,6-biphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟทีโกลเตส ดังนั้นจึงไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนตได้ (Wood และ Holzapel, 1995) ดังรูปที่ 2.5

กลุ่ม Facultative heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) จูลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์อัลโดเลส และเอนไซม์ฟอสโฟทีโกลเตส ดังนั้นจึงหมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโทสได้ (Wood และ Holzapel, 1995) ดังรูปที่ 2.6

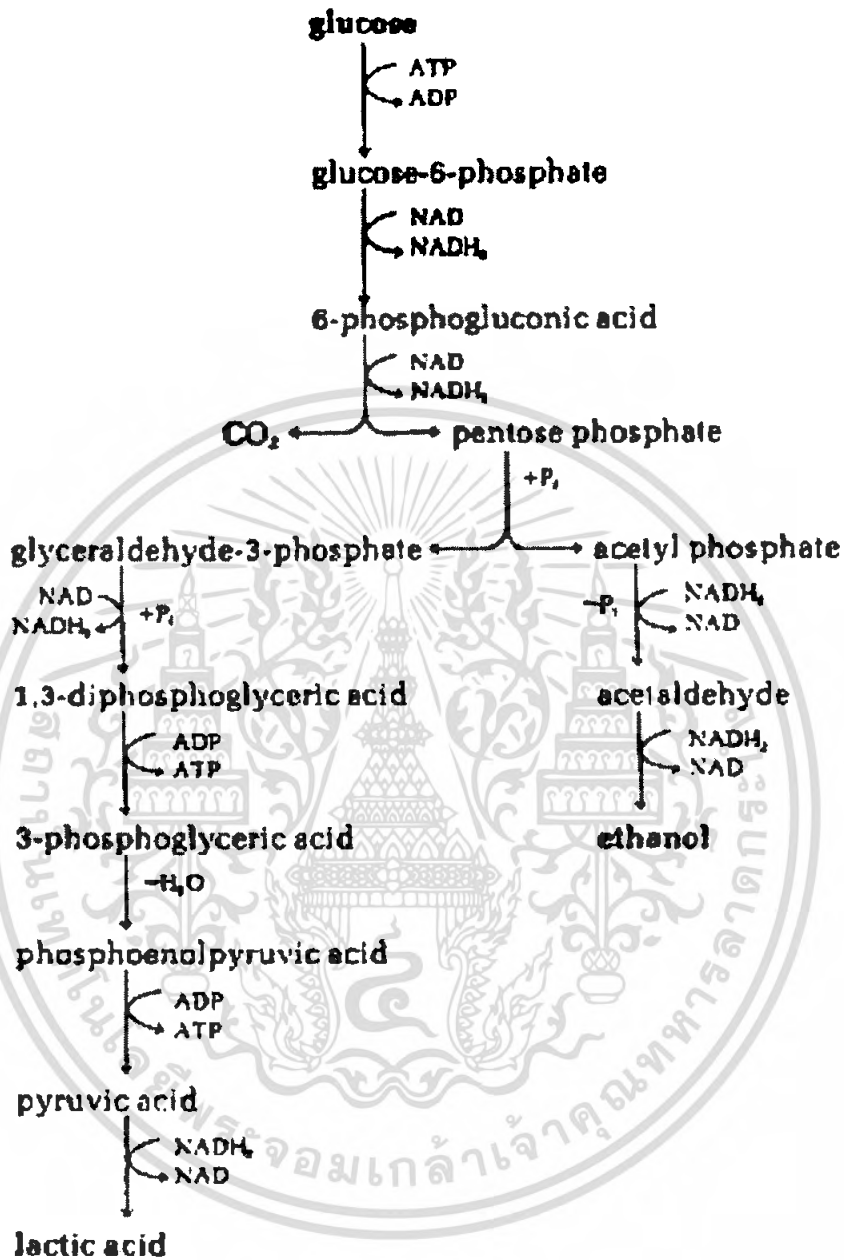
กลุ่ม Obligately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโทสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนต เป็นแลคเตทเอทานอล (กรดอะซิติก) และคาร์บอนไดออกไซด์ (Wood และ Holzapel, 1995) ดังรูปที่ 2.7



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

ที่มา : www.brighton73.freeseve.co.uk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

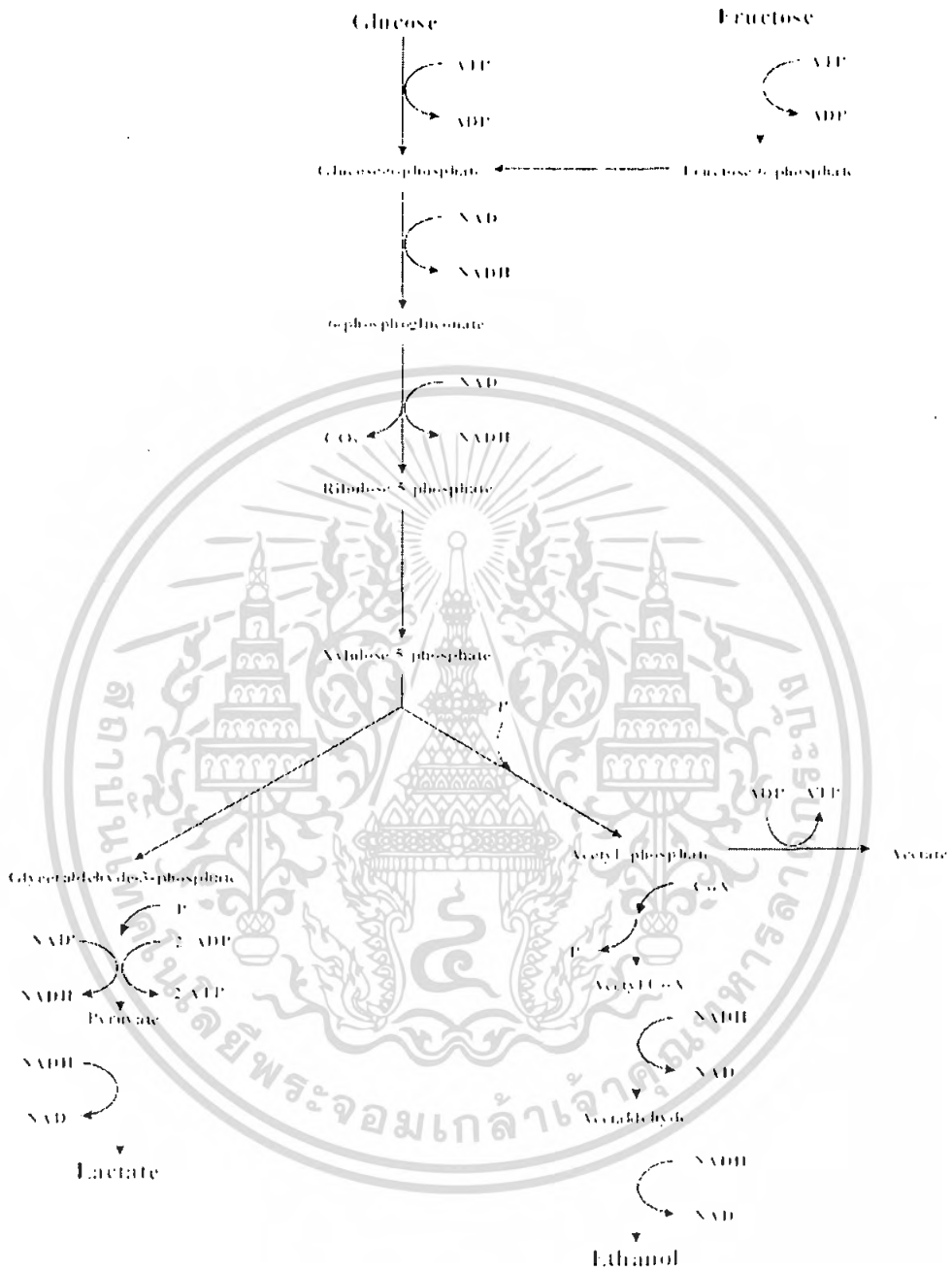


รูปที่ 2.6 วิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของกลุ่ม heterofermentative lactobacilli

ที่มา : www.brighton73.freeseve.co.uk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตำหนักยสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

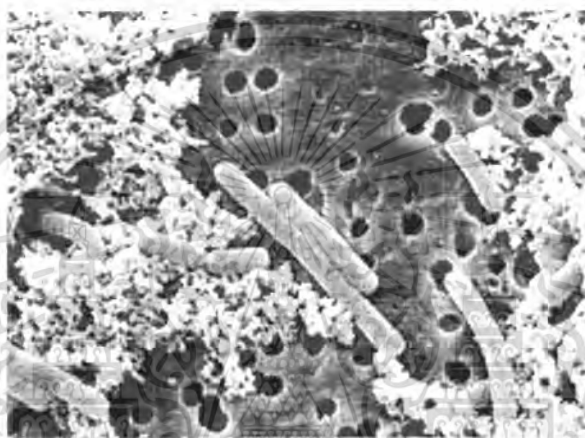


รูปที่ 2.7 วิธีฟอสโฟกลูโคเนต
ที่มา : www.brighton73.freeseve.co.uk

83760

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactobacillus sp. เป็น Facultative anaerobic จัดอยู่ในกลุ่ม Facultative heterofermentative lactobacilli แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างท่อน ขนาด $0.7-1.1 \times 2.0-4.0$ ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.8 แบคทีเรียแลคติกที่มีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรมพบในน้ำนม ผลิตภัณฑ์จากพืช สามารถพบได้ในบริเวณลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ด้วย ซึ่ง *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ซิโรต้า เป็นสายพันธุ์หลักในการผลิตนม นอกจากนี้ได้มีการนำ *Lactobacillus casei* ไปใช้ในงานวิจัย และอุตสาหกรรมต่างๆ



รูปที่ 2.8 ลักษณะของ *Lactobacillus casei*

ที่มา : <http://bioweb.usu.edu/cmlab/current%20news.html>

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก

2.3.1 แหล่งคาร์บอน

Yun และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลแลคโตส กลีเซอรอล ไชโลส เวย์ และแป้ง พบว่าใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลแลคโตส ทำให้สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงถึง 18.18, 17.95 และ 16.80 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนน้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลคโตส กลีเซอรอล ไชโลส เวย์ และแป้ง จะให้ปริมาณกรดแลคติก 2.7, 1.26, 2.24, 1.68, 1.83 และ 1.19 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งถือว่าปริมาณกรดต่ำ

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ โดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 ด้วยวิธีหมักแบบกะ พบว่าเมื่อเซลล์เจริญในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณการผลิตจะอยู่ระหว่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2-6.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กรดแลกติกที่ได้คิดเป็น 0.96 กรัมต่อแหล่งคาร์บอน การผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลมอลโตส โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง

Bulut และคณะ (2004) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส โมลาส ผักถั่ว และรำข้าวสาลี พบว่ากลูโคสให้กรดแลกติกในปริมาณสูง เช่นเดียวกับที่ใช้ น้ำตาลจากผักถั่ว ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 58 กรัมต่อลิตร

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากโมลาสในการผลิตกรดแลกติก โดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 ด้วยวิธีหมักแบบกะ พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 7.0 ได้ปริมาณกรดแลกติก 95.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94.9

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าความเข้มข้นของแป้งที่ 20 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดแลกติก 0.92-0.85 กรัมต่อสารตั้งต้น

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด โดยใช้เอนไซม์มาย่อยแล้วจึงนำไปผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าเมื่อใช้ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลีเป็นสารตั้งต้น จะให้ปริมาณกรดแลกติกมากกว่า 0.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่ออาหารประกอบด้วยแป้งสาลีที่ถูกลบด้วยเอนไซม์ 200 กรัมต่อลิตร แป้งข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตจะสูงถึง 5.36 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณเซลล์จะสูงถึง 14.08 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้แป้งสาลีเพียงอย่างเดียว

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส แลคโตส กาแลกโตส ไซโลส มอลโตส ที่สามารถให้ปริมาณกรดสูงที่สุด โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุด

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเศษอาหารเหลือทิ้งจากโรงอาหาร โดยเชื้อ *Lactobacillus manihotvorans* พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 19.5 กรัมต่อ 200 กรัมสารตั้งต้น

Tanaka และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกในรูปของ D-form จากรำข้าวซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้สูงถึง 9.2 กรัมต่อลิตร

Wee และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ปริมาณต่างๆ ได้แก่ 125, 100, 75, และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 125 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดแลกติกมากที่สุด

2.3.2 แหล่งไนโตรเจน

Fitzpatrick และ O'Keeffe (2001) ศึกษาอิทธิพลของการเติม whey protein hydrolysate (WPH) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนลงไป ใน whey permeate สำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus helveticus* พบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตสในเวย์ให้เป็นกรดแลกติกได้ในปริมาณสูง ภายในระยะเวลา 40-30 ชั่วโมง

Nancib และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เติมลงในน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดี คือ ยีสต์สกัด

Altaf และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วเบงกอล ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และเบเกอร์ยีสต์ ที่เติมลงไป ในแป้งซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV 6 พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้จะสูงถึงร้อยละ 92

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปติกชอย ยูเรีย เปปโตน และเคซีน ที่เติมลงในน้ำอินทผลัม พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตร

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพด ยูเรีย และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์ โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 พบว่าใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงถึง 89 กรัมต่อลิตร

2.3.3 แหล่งแร่ธาตุ

Fitzpatrick และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่มีการเติมแมงกานีสในรูปของแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) ร่วมกับยีสต์สกัดลงไป ในเวย์ พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดจะสั้นลง และเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตสได้ดี แต่เมื่อไม่มีการเติมแมงกานีส เวลาที่ใช้ในการผลิตกรดจะนานขึ้น และเชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลแลกโตสไปใช้ได้ดีเท่าที่ควร

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปติกชอย ยูเรีย เปปโตน และเคซีน ที่เติมลงในน้ำอินทผลัม พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงขึ้นเมื่อมีการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้ง และเศษอาหารเหลือทิ้งจากโรงอาหารโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus manihotvorans* LMG 18011 พบว่าเมื่อเติมแมงกานีสลงไป ปริมาณกรดแลกติกที่ได้จะสูงกว่าที่ไม่เติมแมงกานีส

3.3.4 อุณหภูมิ

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

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

3.3.5 พีเอช

Idris และ Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรด โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็ว และให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง

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

2.4 ความหมายของเซลล์ที่ถูกตรึง

การตรึงเอนไซม์มีการพัฒนาเพื่อวัตถุประสงค์ให้สามารถใช้เอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงขั้นตอนที่ยุ่งยากในการแยกสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์จุลินทรีย์หรือการใช้ระบบเอนไซม์รวม จึงได้มีการพัฒนาโดยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์และมีวิธีการคล้ายกับการตรึงเอนไซม์ โดยได้ให้คำนิยามในลักษณะเดียวกันกับการตรึงเอนไซม์ คือเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงจำกัดให้อยู่ต่อเนื่องในบริเวณใดบริเวณหนึ่ง และมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างต่อเนื่อง (Laskin, 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยทั่วไปทำได้โดย การทำให้เซลล์จุลินทรีย์จับกับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ หรือของแข็งในลักษณะของวิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ (Covalent bonding) วิธีห่อหุ้ม (Entrapment) วิธีดูดซับทางกายภาพ (Adsorption) หรือวิธีเชื่อมขวาง (Cross linking) การพัฒนาจุลินทรีย์ด้วยการตรึงเซลล์ไม่ให้เคลื่อนที่ก็เพื่อประโยชน์ คือ ให้มีชุดของเอนไซม์จากเซลล์พร้อมสำหรับการใช้ให้มีแหล่งของเซลล์จำนวนมาก เพื่อใช้ในงานที่ต้องการปริมาณเซลล์มาก และให้มีที่เก็บเซลล์ซึ่งไม่ต้องการให้เจริญต่อไปขณะอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ประโยชน์ต่างๆ เหล่านี้มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของจุลินทรีย์ได้ (วิเชียร, 2526)

2.5 วิธีการตรึงเซลล์

แบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ ดังนี้

2.5.1 การเชื่อมกับตัวพุง (Carrier binding)

หมายถึง การเชื่อมพันธะระหว่างเซลล์กับตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำ (Laskin, 1985) แบ่งออกได้เป็น 3 วิธี ดังนี้ (วิเชียร, 2526)

2.5.1.1 การดูดซับ (Adsorption)

หมายถึง การดูดซับเซลล์เอาไว้บนสารพุงของแข็ง (solid support) ด้วยแรงอื่นที่ไม่ใช่แรงยึดร่วม (covalent linkages) เช่น แรงยึดระหว่างไอออน (ionic bonding) แรงยึดระหว่างไฮโดรเจน (hydrogen bonding) หรือแรงยึดระหว่างระหว่างสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic bonding) แรงยึดที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์กับสารพุงจะอ่อนมาก ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น พิเอช ความแรงของไอออน และอุณหภูมิ การนำตัวพุงมาใช้ซ้ำทำได้ง่าย เหมาะกับตัวพุงราคาถูก วิธีนี้เหมาะกับเอนไซม์ที่ถูกกระทบได้ง่ายต่อวิธีการเชื่อมพันธะเคมี เช่น อินเวอร์เทส เนื่องจากกรรมวิธีไม่ซับซ้อน และไม่รุนแรง เป็นกรรมวิธีที่ใช้ได้กับเอนไซม์ทุกชนิด ตัวอย่างตัวพุง เช่น bentonite, calcium phosphate gel, activated carbon, porous glass, acid clay, kaolinite aluminar และพอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น แป้ง กลูเต็น คอลลาเจน

2.5.1.2 วิธีเชื่อมแบบพันธะไอออน (Ionic binding method)

หมายถึง การเชื่อมระหว่างโปรตีนของเซลล์กับตัวพุงที่ไม่ละลายในสารละลายปฏิกิริยา โดยใช้พันธะไอออน

ตัวอย่างตัวพุง ได้แก่ สารที่มีอนุพลแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange residue) ได้แก่ พอลิแซคคาไรด์ พอลิเมอร์สังเคราะห์ และอนุพลประจุในตัวพุง และเอนไซม์ต้องแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ที่มีอนุพลประจุบวก (anionic enzyme) เช่น กลูโคสไมเลส และตัวพุงที่มีประจุลบ (cationic residue) เช่น DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

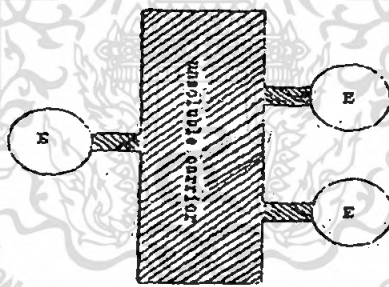
ลักษณะสำคัญของการเรียงรูปวิธีเชื่อมพันธะไอออน คือ

1. มีผลต่อกิจกรรมและ โครงรูปสามมิติของเอนไซม์น้อย ดังนั้น กิจกรรมของเอนไซม์อาจคงเดิม
2. แรงเกาะกันระหว่างเซลล์กับตัวพวงอ่อน อาจหลุดได้ง่ายที่ความเข้มข้นไอออนสูง (ionic strength) หรือแรงเกาะกันจะลดลงเมื่อเปลี่ยนพีเอช
3. กรรมวิธีไม่ซับซ้อน ใช้หลักการเชื่อมไอออนเหมือนการแลกเปลี่ยนไอออนของสารชีวภาพอื่นๆ ได้

2.5.1.3 วิธีเชื่อมแบบพันธะโคเวเลนต์ (Covalent binding method)

หมายถึง การเชื่อมพันธะระหว่างเซลล์กับตัวพวงด้วยพันธะโคเวเลนต์

พันธะโคเวเลนต์ เป็นพันธะที่เกิดจากอะตอมรวมกัน โดยการถ่ายเทอิเล็กตรอนอย่างสมบูรณ์ และอะตอมใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน เนื่องจาก พันธะโคเวเลนต์ต้องผ่านขั้นตอนของการสลายพันธะโคเวเลนต์เดิม ดังนั้น พลังงานการสลาย (dissociation energy) ยิ่งสูง โมเลกุลใหม่ที่ได้จะมีพันธะโคเวเลนต์ที่แข็งแรง และเสถียร รูปแสดงการเชื่อมเซลล์กับตัวพวง (carrier binding) แสดงในรูปที่ 2.9



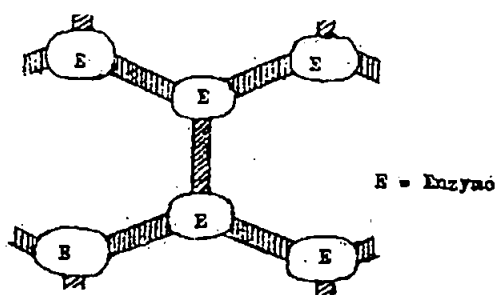
รูปที่ 2.9 แสดงการเชื่อมเซลล์กับตัวพวง (carrier binding)

ที่มา : วิเชียร (2526)

2.5.2 วิธีเชื่อมขวาง (Cross-linking method)

การทำให้เซลล์เรียงรูปโดยวิธีนี้อาศัยการสร้างพันธะเคมีเหมือนกับการสร้างพันธะโคเวเลนต์แต่ไม่ใช่ตัวพวง เซลล์จะถูกตรึงรูปอยู่ได้ด้วยการสร้างพันธะเชื่อมขวางระหว่างภายในโมเลกุลเซลล์ โดยอาศัยสารเชื่อมขวางซึ่งทำหน้าที่เชื่อมขวางระหว่างโมเลกุล 2 โมเลกุล หรือมากกว่า หรือเรียก cross-linkers ซึ่งมีผลให้เซลล์หลายโมเลกุลเกาะกลุ่มเป็น โมเลกุลใหญ่ ละลายน้ำได้น้อยลง รูปแสดงการตรึงเซลล์โดยการเชื่อมขวาง (Cross-linking method) แสดงในรูปที่ 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 แสดงการตรึงเซลล์โดยการเชื่อมขวาง (Cross-linking method)

ที่มา : วิเชียร (2526)

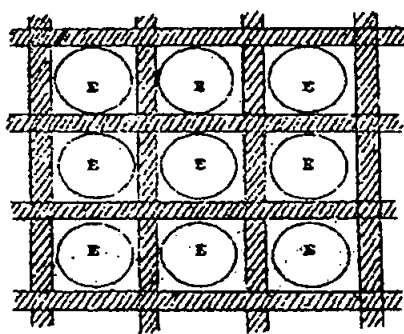
2.5.3 วิธีห่อหุ้ม (Entrapping method)

วิธีห่อหุ้มเป็นวิธีสร้างรูปแบบรวมเซลล์ไว้ในช่องว่างตาข่ายพอลิเมอร์ หรือห่อหุ้มเซลล์ไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้สารซึมผ่านได้บ้าง (semipermeable membrane) ดังนั้น จึงแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ห่อหุ้มเซลล์ในช่องตาข่าย (lattice type) และห่อหุ้มเซลล์ในแคปซูลเล็ก (microcapsule type) การตรึงรูปวิธีนี้แตกต่างจากวิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ และวิธีเชื่อมขวาง คือ เซลล์ไม่เชื่อมพันธะเคมีใดๆ กับสารห่อหุ้ม ด้วยเหตุนี้วิธีนี้จึงนิยมใช้อย่างแพร่หลาย

2.5.3.1 วิธีห่อหุ้มเซลล์ในช่องตาข่าย (Lattice type)

การห่อหุ้มเซลล์ในช่องตาข่ายของพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ทำได้ในลักษณะที่ผสมเซลล์เข้ากับสารห่อหุ้มในขณะที่กำลังจะเกิดพอลิเมอร์ โมเลกุลของเซลล์จะถูกห่อหุ้มด้วยช่องตาข่ายอย่างสม่ำเสมอทุกช่องอย่างซ้ำๆ ตัวอย่างพอลิเมอร์และ โมโนเมอร์และสารเชื่อมขวางที่ใช้ในการห่อหุ้ม คือ

พอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ แป้ง โคติน ไคโตซาน อัลจิเนต และคาราจีแนน เป็นต้น พอลิเมอร์สังเคราะห์ (สร้างจากสารโมโนเมอร์และโคเมอร์) ได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinylalcohol) พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) สารเชื่อมขวางระหว่างสายพอลิเมอร์ ได้แก่ กลูตาโรลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และสารอื่นๆ ตามความเหมาะสมของชนิดพอลิเมอร์สังเคราะห์ และพันธะเคมีที่เกี่ยวข้อง (ปราณี, 2535) รูปแสดงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มในช่องตาข่าย (lattice type) แสดงในรูปที่ 2.11

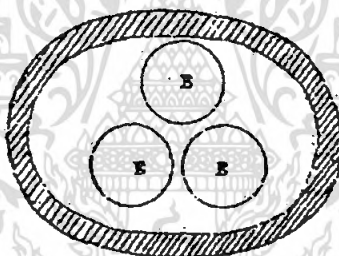


รูปที่ 2.11 แสดงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มในช่องตาข่าย (lattice type)

ที่มา : วิเชียร (2526)

2.5.3.2 วิธีห่อหุ้มเซลล์ในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type)

วิธีห่อหุ้มเซลล์ในแคปซูลเล็กทำได้โดยให้เซลล์ถูกห่อหุ้มไว้ใน semi-permeable membrane ดังแสดงในรูปที่ 2.12



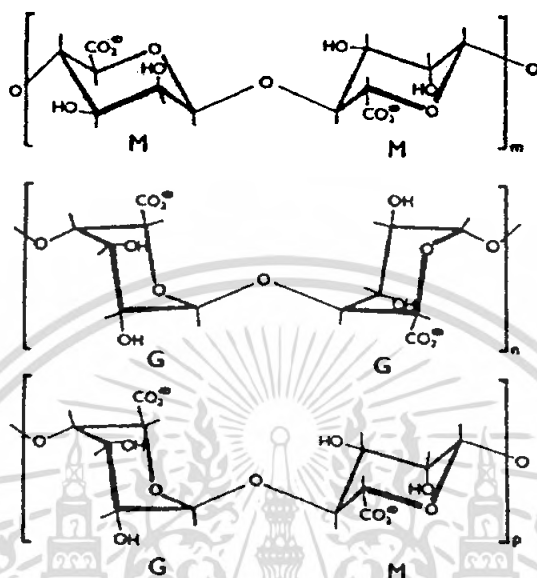
รูปที่ 2.12 แสดงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type)

ที่มา : วิเชียร (2526)

2.6 อัลจิเนต (Alginate)

อัลจิเนตเป็นที่รู้จักกันดีในการนำมาเป็นอาหารและใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากกว่า 60 ปี เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีในด้านความคงตัว หนา ทำให้เกิดเจลได้ สามารถทำให้เป็นแผ่นฟิล์ม ปลอดภัย และไม่เป็นพิษ อัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์ชนิดแรกที่ใช้ในการตรึงเซลล์ เนื่องจาก มีความปลอดภัย ราคาถูก ใช้ได้กับตัวเร่งทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด ในขณะที่เดียวกันพบว่ามีข้อเสีย คือ เม็ดเจลของแคลเซียมอัลจิเนตถูกทำลายได้ง่ายด้วยโพแทสเซียม ไอออน แมกนีเซียม ไอออน ฟอสเฟต ไอออน และในสารละลายที่มีความเข้มข้นมาก การตรึงเซลล์โดยใช้อัลจิเนตไม่สามารถใช้ได้ดีกับเอนไซม์ เนื่องจากเม็ดเจลมีขนาดรูใหญ่ เอนไซม์สามารถรั่วไหลออกไปจากโครงสร้าง เม็ดเจลได้ อัลจิเนตเป็นเกลือของกรดอัลจินิก ซึ่งกรดอัลจินิกประกอบด้วยพอลิเมอร์ของ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1,4-linked α -D-mannuronic acid (M) และ 1,4-linked β -L-guluronic acid (G) กรดอัลจินิกและอัลจินเนตเป็นพอลิเมอร์ร่วมกันระหว่าง MM GM และ GG ดังรูป 2.13



รูปที่ 2.13 แสดงโครงสร้างพอลิเมอร์ของอัลจินเนต

ที่มา : Gemeiner (1992)

คุณสมบัติของเจลที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของอัลจินเนตที่ใช้ อัลจินเนตที่มี G residues สูงจะทำให้เจลมีความแข็งแรงสูงด้วย นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิด ความเข้มข้นของไอออนโลหะ และปริมาณเซลล์ที่ใช้ด้วย การใช้สตรอนเซียมหรือแบเรียมแทนแคลเซียม จะช่วยให้เม็ดเจลมีความคงตัวมากขึ้น (Cheetham และคณะ, 1979)

2.7 ข้อดีและข้อเสียของการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง

ข้อดีของการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง

1. ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการเอนไซม์ตัวเดียว
2. ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการเอนไซม์หลายตัว แต่ไม่ต้องการตัวร่วมที่มีความเฉพาะเจาะจง

(specificity cofactor)

3. ใช้ในปฏิกิริยาเอนไซม์ตัวเดียวและหลายตัวที่ต้องการตัวร่วม

4. ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการให้ขบวนการเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในวิถีที่เผาผลาญอาหารในร่างกาย (metabolic pathway) ทั้งแบบสารปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ใช้กับเซลล์ของอวัยวะ (cell originals) เช่น คลอโรพลาสต์ (chloroplast) หรือเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเรียกว่าเซลล์ของอวัยวะที่ถูกตรึง (immobilized cell organelles)
6. ใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่องได้

ข้อเสียของการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง

1. เกิดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น
2. การส่งผ่านออกซิเจนในถังปฏิกริยา (reactor) ควบคุมลำบาก
3. เกิดปัญหาการส่งผ่านมวลจากภายนอกสู่ภายใน และขบวนการเคลื่อนที่ (process kinetic) (วิเชียร, 2526)

การเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมี เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับตัวเร่งทางเคมีคือ สามารถเร่งปฏิกริยาได้ภายใต้สภาวะปกติ และใช้พลังงานต่ำ ปฏิกริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง ปัญหาการเกิดมลภาวะมีน้อย แต่เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียบางประการคือ ต้องการสารประกอบเชิงซ้อน เช่น โคแฟกเตอร์ต่างๆ ในการเกิดปฏิกริยา และมีความคงทนน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี

การเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงได้เปรียบกว่าเซลล์อิสระคือ สามารถใช้เซลล์จำนวนมากๆ ศึกษาในถังปฏิกริยาขนาดเล็กได้ ในการผลิตควบคุมปฏิกริยาได้ง่าย สามารถแยกผลผลิตออกได้สะดวก ไม่มีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้มาก แต่การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ และอาจสูญเสียความสามารถระหว่างการตรึงได้ (Cheetham, 1980)

การเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึง การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่กระบวนการผลิตนั้นต้องใช้ระบบเอนไซม์หลายชนิด โคแฟกเตอร์ และสารพลังงานสูงอื่นๆ นอกจากนี้การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงไม่ต้องใช้ขบวนการสกัด และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เป็นผลให้ยังคงมีประสิทธิภาพสูง ทำให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น และเป็นการลดค่าใช้จ่ายด้วย แต่การใช้จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งสามารถผลิตสารที่ไม่ต้องการออกมาขยับยังผลผลิตได้ และเซลล์ที่ถูกตรึงยังถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของสารตั้งต้นและผลผลิตโดยสารที่ใช้ตรึงเซลล์ (Chibata และคณะ, 1997) นอกจากนี้อาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตจากตัวเซลล์ หรือสารที่ขับออกจากเซลล์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองเนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานาน หรือเซลล์ร่วงไหลเนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงมีการเจริญเพิ่มจำนวน (Cheetham และคณะ, 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีรายงานการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเซลล์ ดังนี้

Yoo และคณะ (1996) ได้ใช้อัลจิเนตเป็นวัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้มเชื้อ *Lactobacillus casei* ในการผลิตกรดแลกติก พบว่ามีข้อเสียคือ มีช่องว่างที่เชื้อสามารถเจริญได้น้อย และโครงสร้างของอัลจิเนตไม่เสถียร เนื่องจาก สูญเสียแคลเซียมในเม็ดเจลเนื่องจากกรดแลกติกในระหว่างการหมักแบบกะ

Kourkoutas และคณะ (2005) ศึกษาการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* บนชั้นแอปเปิ้ลและควินซ์ ในการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เวย์เป็นสารตั้งต้น พบว่า สามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการหมักแบบกะได้ทั้งหมด 15 รอบ และเมื่อใช้นมเป็นสารตั้งต้นในการผลิตนมเปรี้ยวพบว่าให้กลิ่นหอมของผลไม้ทั้งสอง และกลิ่นหอมนี้ยังคงอยู่แม้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 129 วัน

Bergmaier และคณะ (2003) เปรียบเทียบการใช้เซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M เพื่อผลิต exopolysaccharide พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ และสามารถผลิตได้ 1.7 กรัมต่อลิตร

Kushal และคณะ (2005) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โพรไบโอติก 2 ชนิด คือ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* ในหนูทดลอง โดยการตรึงเซลล์ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในการลด fecal coliforms

Johnes และคณะ (2005) ศึกษาการตรึงเซลล์ *Lactobacillus plantarum* 80 (pcBH1) เพื่อใช้ในการย่อยกรดของน้ำดี (bile acid) พบว่าการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงนี้สามารถลดปริมาณกรดของน้ำดีได้ โดยการย่อยกรดของน้ำดีเป็น glycodeoxycholic acid และ taurodeoxycholic acid โดยเอนไซม์ bile salt hydrolase

Adinarayana และคณะ (2005) ศึกษาชนิดของสารที่ใช้ในการตรึงเซลล์ ประกอบด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พอลิอะคริลาไมด์ เจลาติน วุ้น และ k-Carrageenan ในการผลิต alkaline protease โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* PE-11 พบว่าแคลเซียมอัลจิเนตมีประสิทธิภาพดีที่สุด

Dembezynski และ Jankowski (2002) ศึกษาการเจริญและการสร้างกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* โดยการตรึงเซลล์ในอัลจิเนต พบว่าจำนวนเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเจลมีปริมาณ 4.8×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าเซลล์อิสระที่มีปริมาณเซลล์เพียง 5.7×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เม็ดเจลยังคงเสถียร ไม่มีการรั่วไหล แม้ระยะเวลาการหมักจะผ่านไป 60 ชั่วโมง

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท SHIMADZU รุ่น

C-R7 Ae plus

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องอบลมร้อน ของบริษัท Binder

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX^R

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX^R

บีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX^R

หลอดทดสอบ (Test tube) ของบริษัท PYREX^R

ปิเปตต์ (Pipette)

ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)

ปั๊ม Peristaltic pump ของบริษัท Heidolph รุ่น PD 5201

สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 เซนติเมตร ของบริษัท Cole-Parmer

Instrument Company รุ่น Tygon tubing 2-stop

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป MRS

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)

เปปโตน (Peptone)

ยูเรีย (Urea)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

โซเดียมไนเตรด (NaNO_3)

กลูโคส (Glucose)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3)

น้ำกลั่น

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ไฮโดรคลอริก (HCl)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

ฟอสฟอริก (H_3PO_4)

ฟีนอล ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)

ซัลฟิวริก (H_2SO_4)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)

โซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ

ใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในโครงการพิเศษ

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้วลาก (Streak) ลงบนอาหารแข็ง (MRS agar) (ภาคผนวก ก) นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บ

หลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกใสในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (Subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เชื้อที่ใช้ในการศึกษา คือ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติก จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

ใช้เข็มเย็บเชื้อแล้วลาก (Streak) ลงบนอาหารแข็ง (MRS agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกใสในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ ทุกๆ 2 สัปดาห์

การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อจำนวน 2 หลบ ลงในอาหารเหลว (MRS broth) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) (ศิริประภา, 2550)

3.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหาร 7 สูตร ดังตารางที่ 3.1

3.4.2.1 สูตรอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) (Altaf, 2005)

* สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
* เปปโตน (Peptone)	10	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (Glucose)	40	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.1	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.03	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ร้อยละ 2.0 (จกมล, 2550)		

หมายเหตุ : สารสกัดยีสต์และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ

สูตรอาหาร	สูตร 1 (กรัมต่อ ลิตร)	สูตร 2 (กรัมต่อ ลิตร)	สูตร 3 (กรัมต่อ ลิตร)	สูตร 4 (กรัมต่อ ลิตร)	สูตร 5 (กรัมต่อ ลิตร)	สูตร 6 (กรัมต่อ ลิตร)	สูตร 7 (กรัมต่อ ลิตร)
Yeast extract	5	5	5	5	-	-	-
Peptone	10	-	-	-	10	10	10
Urea	-	10	-	-	5	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	10	-	-	5	-
NaNO ₃	-	-	-	10	-	-	5
Glucose	40	40	40	40	40	40	40
K ₂ HPO ₄	1	1	1	1	1	1	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่เติม

สูตรที่ 1 เป็นชุดควบคุม

แหล่งไนโตรเจนที่ศึกษาประกอบด้วย Yeast extract, Peptone, Urea, (NH₄)₂SO₄ และ NaNO₃ โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ดังตารางที่ 3.1

3.4.2.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแลกติก

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 7 สูตรอาหาร ดังตารางที่ 3.1 เตรียมโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

- ละลายน้ำตาลกลูโคสในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่น และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 (จกมล, 2550) และปรับพีเอชของอาหารสังเคราะห์ให้ได้ 6.5 (Idris และ Suzuna, 2006) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ผสมส่วนผสมทั้งสองโดยวิธีปลอดเชื้อ ในตู้ปลอดเชื้อ

2) ขั้นตอนการตรึงเซลล์ มีดังนี้ (ประยุกต์จาก สุรีย์ ทองวณิชนิม, 2543)

- นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 3.4.1 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (ร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ในการหมักกรดแลกติก) ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง

- นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันจนเกิดเป็นเซลล์แขวนลอย จากนั้นจึงเทลงในสารละลายโซเดียมอัลจินेट ผันแปรความเข้มข้นตามชุดการทดลอง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วคนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

- นำสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในตามชุดการทดลองที่จะศึกษาต่อเข้ากับเครื่อง Peristaltic pump แล้วให้สายข้างหนึ่งจุ่มลงในสารละลายโซเดียมอัลจินेटที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกับเซลล์แขวนลอยซึ่งวางอยู่บน magnetic stirrer ตลอดการตรึงเซลล์ (Mandel และคณะ, 2005) ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งจุ่มลงในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ (Mandel และคณะ, 2005) โดยมีระยะห่างระหว่างปลายสายยางกับผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 15 เซนติเมตร (ศิริประภา, 2550) จากนั้นเปิดเครื่อง Peristaltic pump ให้เครื่องทำงานที่อัตราการไหล 7 มิลลิลิตรต่อนาที

- หลังจากการดูดสารละลายโซเดียมอัลจินेटที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกับเซลล์แขวนลอยลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์หมด ให้เก็บเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3) นำเม็ดเจลที่ได้เติมลงในอาหารที่เตรียมไว้ทั้ง 7 สูตร โดยให้มีปริมาณอาหารร่วมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 70 ของปริมาณฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (175 มิลลิลิตร)

4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

5) เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุกๆ 12 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 120 เพื่อหาปริมาณกรดแลกติก ค่าพีเอช และน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป

3.4.3 การศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินेट

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ตามสูตรอาหารที่ได้จากข้อ 3.4.2 จำนวน 10 ฟลาสก์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยการตรึงเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3.4.2.2

2) นำเม็ดเจลที่ได้เติมลงในอาหารที่เตรียมไว้ทั้งหมด 11 ฟลาสก์ โดยให้มีปริมาณอาหารร่วมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 70 ของปริมาณฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4) นำพลาสติกตัวอย่างที่บ่มไว้แต่ละชั่วโมงมารองเม็ดยาลอกด้วยผ้าขาวบาง
- 5) นำเม็ดยาลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 130 มิลลิลิตร พีเอช 7.4
- 6) แช่เม็ดยาลงไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนเม็ดยาละลายหมด
- 7) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ครั้งละ 1 พลาสติก ทุกๆ 12 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 120 เพื่อหาปริมาณกรดแลกติก ค่าพีเอช น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป และจำนวนเซลล์

3.4.4 การศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในระดับพลาสติก 2 ลิตร กับถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.4.4.1 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารสังเคราะห์ระดับพลาสติก 2 ลิตร

- 1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ตามสูตรอาหารที่ได้จากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 1,400 มิลลิลิตร และเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยการตรึงเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3.4.2.2
- 2) นำเม็ดยาลที่ได้เติมลงในอาหารที่เตรียมไว้ (โดยให้มีปริมาณอาหารรวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 70 ของปริมาณพลาสติก) ปริมาตรอาหาร 1,330 ปริมาตรหัวเชื้อ 70 มิลลิลิตร
- 3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- 4) เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 72 เพื่อหาปริมาณกรดแลกติก ค่าพีเอช และน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป

3.4.4.2 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารสังเคราะห์ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

- 1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ตามสูตรอาหารที่ได้จากข้อ 3.4.2 โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้
 - ละลายน้ำตาลกลูโคสในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
 - ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่นตามสูตรอาหาร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 จากนั้นนำอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมเสร็จแล้วเทลงถังหมัก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- 2) นำน้ำตาลกลูโคสที่ฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในถังหมักโดยวิธีปลอดเชื้อ
- 3) เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยการตรึงเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3.4.2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) นำเม็ดเจลที่ได้เติมลงในถังหมักโดยวิธีปลอดเชื้อ (โดยให้มีปริมาณอาหารรวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 70 ของปริมาณพลาสติก) ปริมาณอาหาร 1,330 ปริมาตรหัวเชื้อ 70 มิลลิลิตร

5) มีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.0 โมลาร์ ความเร็วรอบของใบพัดควนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที (จกมล, 2550) ใช้เวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง

6) เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 72 เพื่อหาปริมาณกรดแลกติก ค่าพีเอช และน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป

3.4.5 การวิเคราะห์ผล

1) วัดปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ชนิด Inertsil C8-3 มีโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

2) วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก โดยวิธีของ Dobois (1956) (ภาคผนวก ข)

3) วัดปริมาณของเซลล์ทั้งหมดโดยวิธี Total plate count (A.O.A.C., 2000) (ภาคผนวก ข)

3.4.6 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ

แต่ละการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างอิสระโดยสมบูรณ์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าทางสถิติใช้ของ SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่างของแหล่งในโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก ด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test และศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในอาหารสังเคราะห์ระดับพลาสติก และถังหมักแบบใบพัดควนขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธี Independent Samples T-Test โดยทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในการพิจารณาถึงการมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

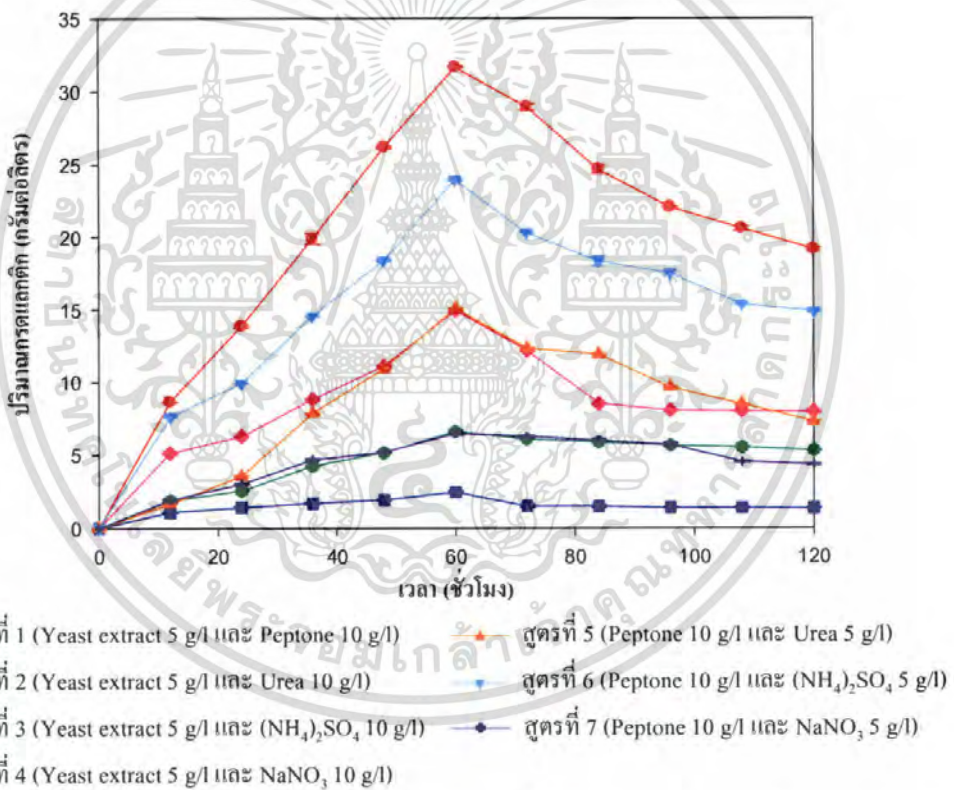
4.1.1 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารสังเคราะห์ โดยมีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกันทั้ง 7 สูตร มีสถานะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พี่เอชเริ่มต้น 6.5 ทำการหมักที่สถานะนิ่ง พบว่าเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารสังเคราะห์สูตรที่ 1 มียีสต์สกัดและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตกรดแลกติกสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 60 ซึ่งมีปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 31.67 กรัมต่อลิตร ผลผลิตกรดแลกติกคิดเป็น 0.81 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.53 กรัมต่อลิตรชั่วโมง รองลงมาคือ เชื้อที่เจริญในอาหารสังเคราะห์สูตรที่ 6, 5, 3, 4, 7 และ 2 ตามลำดับ โดยมีการผลิตกรดแลกติกสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 60 ทุกสูตร ซึ่งมีปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 23.92, 15.08, 14.94, 6.60, 6.47 และ 2.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลผลิตกรดแลกติกคิดเป็น 0.72, 0.49, 0.47, 0.22, 0.22 และ 0.10 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้นตามลำดับ อัตราการผลิตเท่ากับ 0.40, 0.25, 0.25, 0.11, 0.11 และ 0.04 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ดังแสดงในรูปที่ 4.1

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารสังเคราะห์สูตรที่ 1 และอาหารสังเคราะห์สูตรอื่นๆ ให้ผลผลิตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 เนื่องจากยีสต์สกัดและเปปโตนเป็นสารอินทรีย์ มีปริมาณธาตุอาหารต่างๆ สูง เหมาะแก่การนำไปใช้ในการเจริญ และผลิตกรดแลกติก ในขณะที่อาหารสังเคราะห์สูตรอื่นๆ มีแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของมีทนา และคณะ (2549) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงที่สุด และสอดคล้องกับการทดลองของ Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปติกชอย ยูเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปปโตเน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัม พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Kadam และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด น้ำข้าวโพด ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์ โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงถึง 89 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจากผลการทดลองจึงเลือกยีสต์สกัดและเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาศึกษาสภาพการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาस्कและถึงหมักขนาด 2 ลิตรต่อไป

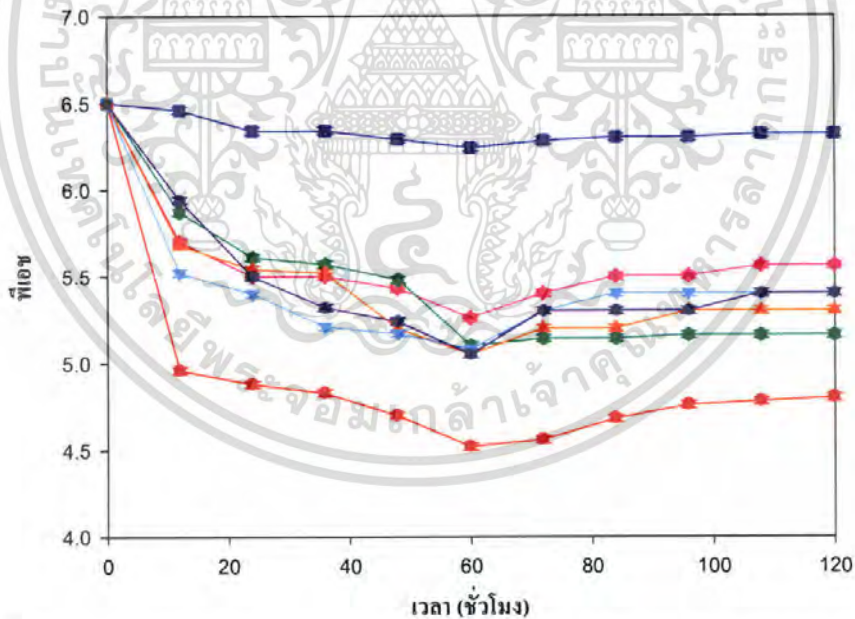


รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดแลกติกในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

4.1.2 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินต โดยมีสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนี้ พบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโต จะมีการผลิตกรดแลกติก ทำให้ค่าพีเอชของอาหารทุกสูตรลดลงเมื่อเทียบกับค่าพีเอชเริ่มต้น จากนั้นค่าพีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาที่ 12 (ยกเว้นสูตรที่ 2) เนื่องจากมีการเจริญเติบโตของเชื้ออย่างรวดเร็ว ส่งผลให้มีการผลิตกรดแลกติกมากขึ้น และหลังจากนั้นค่าพีเอชจะลดลงอย่างช้าๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการหมักในช่วงเวลาที่ 120 ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Idris และ Suzana (2006) ได้ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำตาลปีบโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วและให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติก



- สูตรที่ 1 (Yeast extract 5 g/l และ Peptone 10 g/l)
- สูตรที่ 2 (Yeast extract 5 g/l และ Urea 10 g/l)
- ◆ สูตรที่ 3 (Yeast extract 5 g/l และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/l)
- สูตรที่ 4 (Yeast extract 5 g/l และ NaNO_3 10 g/l)
- สูตรที่ 5 (Peptone 10 g/l และ Urea 5 g/l)
- สูตรที่ 6 (Peptone 10 g/l และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l)
- สูตรที่ 7 (Peptone 10 g/l และ NaNO_3 5 g/l)

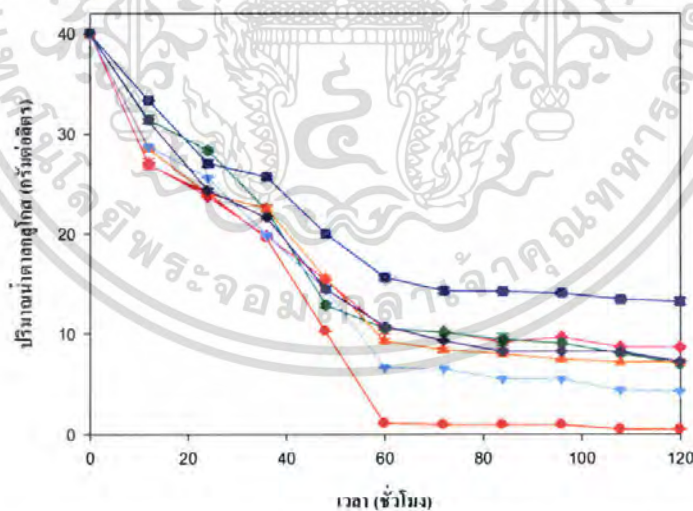
รูปที่ 4.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจน

แตกต่างกัน ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของสำนักงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

จากการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่นำไปใช้ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยมีสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ชั่วโมงที่ 60 การเจริญของเชื้อในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตรมีการใช้น้ำตาลกลูโคสได้มากที่สุด ซึ่งในอาหารสังเคราะห์สูตรที่ 1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างมีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปลดลงเหลือเท่ากับ 1.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 97.25 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 เหลือน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 98.70 ในขณะที่เชื้อที่เจริญในอาหารสังเคราะห์สูตรที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ในชั่วโมงที่ 120 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 13.24, 8.67, 7.02, 7.19, 4.28 และ 7.24 ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 66.90, 78.33, 82.45, 82.02, 89.30 และ 81.90 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3



- สูตรที่ 1 (Yeast extract 5 g/l และ Peptone 10 g/l)
- สูตรที่ 2 (Yeast extract 5 g/l และ Urea 10 g/l)
- ◆ สูตรที่ 3 (Yeast extract 5 g/l และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/l)
- สูตรที่ 4 (Yeast extract 5 g/l และ NaNO_3 10 g/l)
- ▲ สูตรที่ 5 (Peptone 10 g/l และ Urea 5 g/l)
- ▼ สูตรที่ 6 (Peptone 10 g/l และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l)
- สูตรที่ 7 (Peptone 10 g/l และ NaNO_3 5 g/l)

รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจน

แตกต่างกัน ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่เพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองสามารถสรุปผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่าเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มียีสต์สกัดและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตกรดแลคติกได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดสูงสุด ดังนั้นจึงทำการเลือกยีสต์สกัดและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตรต่อไป

ตารางที่ 4.1 สรุปผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ

Lactobacillus casei ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

สูตรอาหาร	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดแลคติก (กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (ร้อยละ)	ค่าพีเอช
สูตรที่ 1	60	31.67 ^a	0.81 ^a	0.53 ^a	97.25	4.5
สูตรที่ 2	60	2.43 ^c	0.10 ^c	0.04 ^c	60.88	6.2
สูตรที่ 3	60	14.94 ^c	0.47 ^c	0.25 ^c	78.80	5.3
สูตรที่ 4	60	6.60 ^d	0.22 ^d	0.11 ^d	73.60	5.3
สูตรที่ 5	60	1508. ^c	0.49 ^c	0.25 ^c	76.73	5.1
สูตรที่ 6	60	23.92 ^b	0.72 ^b	0.40 ^b	83.35	5.1
สูตรที่ 7	60	6.47 ^d	0.22 ^d	0.11 ^d	73.10	5.1

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

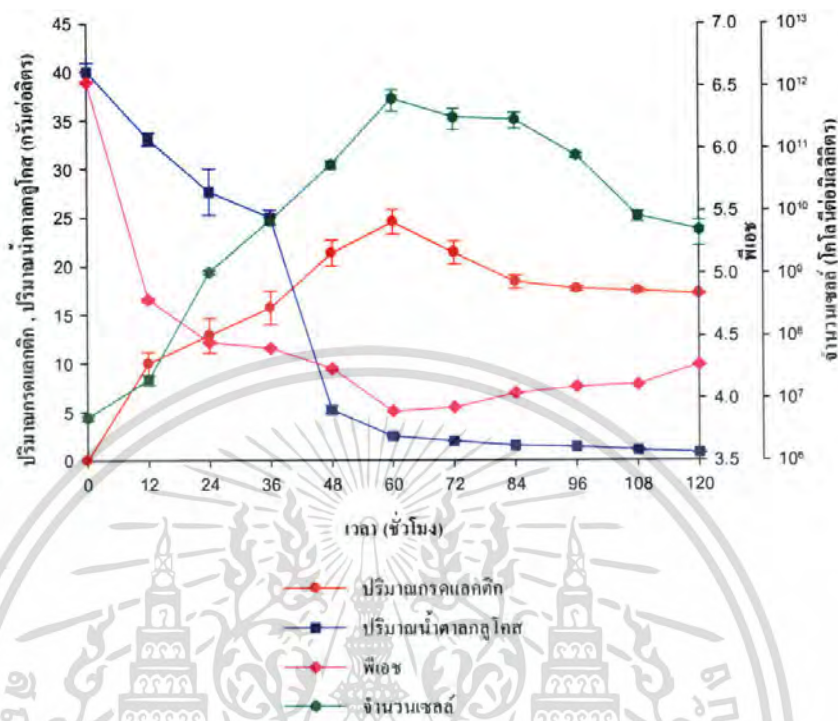
การศึกษากการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0 ในการตรึงเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการหมักเชื้อในอาหารหมักปริมาตร 175 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสถานะนิ่ง พร้อมทั้งมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2.0 เป็นสารปรับสภาพให้เป็นกลาง ช่วยควบคุมพีเอชให้เหมาะสมต่อการผลิต โดยเมื่อพีเอชลดลง คาร์บอเนตจะสลายตัวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชคงที่ประมาณ 7.0 (Ohkouchi, 2006) พบว่าผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 มีปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 24.54 กรัมต่อลิตร โดยมีการใช้น้ำตาลกลูโคส 37.51 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ 93.77 มีพีเอชต่ำสุด 3.9 และจากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ในการหมักกรดแลกติก พบว่าจำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 60 หลังจากนั้นจำนวนเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเพียงเล็กน้อย จนกระทั่งในชั่วโมงที่ 84 จำนวนเซลล์จึงเริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัดไปจนถึงชั่วโมงที่ 120 ดังแสดงในรูปที่ 4.4

จากรูปที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าการเจริญของเซลล์มีความสัมพันธ์กับการผลิตกรดแลกติก โดยมีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 4.8×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และเพิ่มจำนวนเป็น 6.2×10^{11} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 60 ซึ่งเมื่อเชื้อมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ปริมาณกรดแลกติกก็จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเชื้อ และสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงในช่วงที่เพิ่มจำนวนเซลล์ จนกระทั่งจำนวนเซลล์เริ่มคงที่ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสก็จะคงที่ตามไปด้วย ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอช พบว่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วจากพีเอชเริ่มต้นที่ 6.5 ลดลงเหลือ 3.9 ในชั่วโมงที่ 60 หลังจากนั้นพีเอชเริ่มสูงขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 120 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.3 เนื่องจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต มีการผลิตกรดแลกติกลดลง และมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง จนกระทั่งเหลือน้ำตาลกลูโคส 0.77 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 จึงอาจมีการดั่งกรดแลกติกไปใช้แทนน้ำตาลกลูโคส ทำให้พีเอชของอาหารเพิ่มขึ้น

จากการผลการทดลองจึงกล่าวได้ว่า การผลิตกรดแลกติกขึ้นอยู่กับ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือจำนวนเซลล์ การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์จะช่วยส่งเสริมการผลิตกรดแลกติก ซึ่งแสดงว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และปริมาณกรดแลกติก ดังนั้นในการผลิตกรดแลกติกทางกระบวนการชีวภาพจึงขึ้นอยู่กับ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

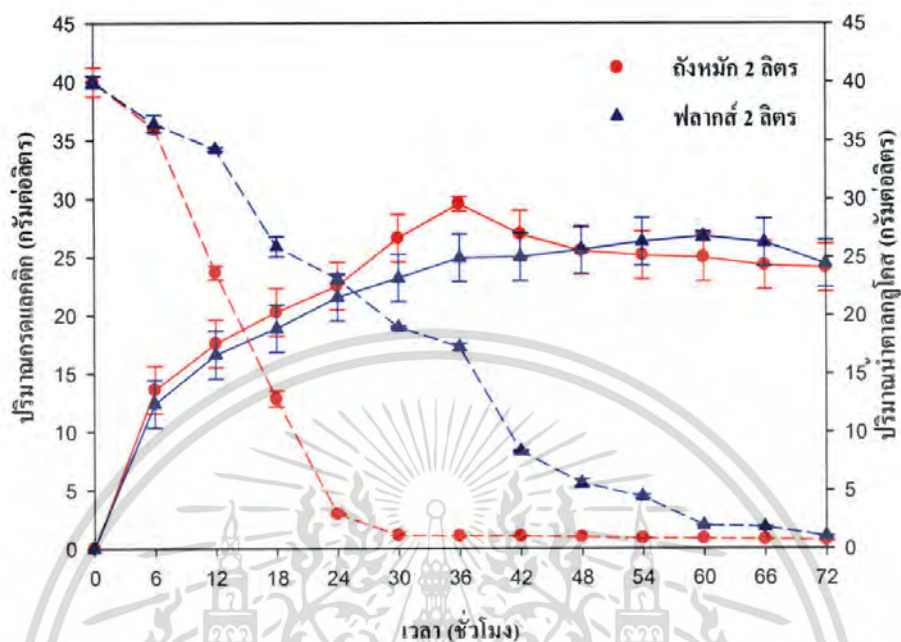


รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาล พีเอช และจำนวนเซลล์จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกโดย *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิเมตร

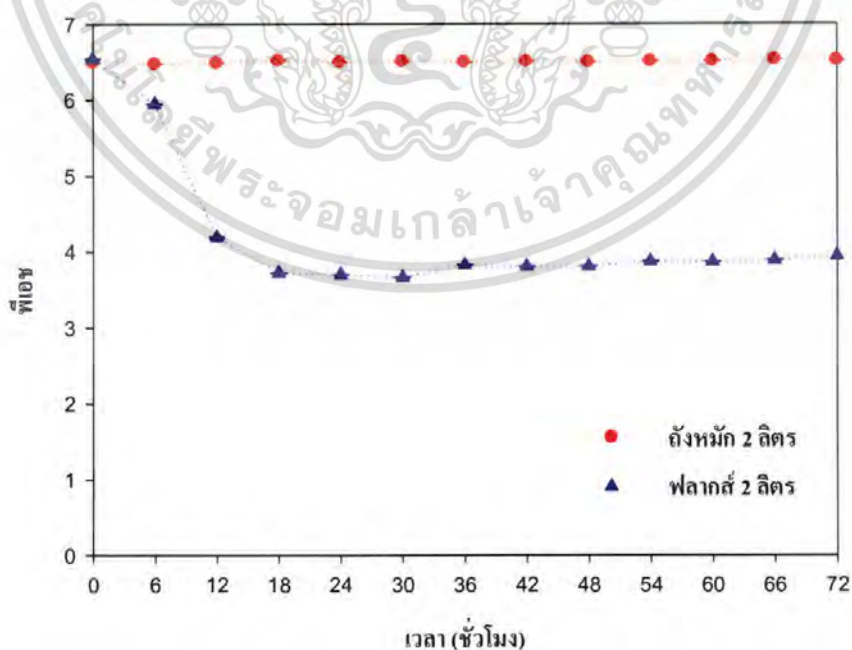
4.3 ผลการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติก ในอาหารสังเคราะห์ระดับพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร

การศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในอาหารสังเคราะห์ระดับพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0 ในการตรึงเซลล์ ทำการหมักเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารหมักปริมาตร 1,400 มิลลิเมตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสถานะนิ่ง พร้อมทั้งมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2.0 ซึ่งได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.5, 4.6 และตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดแลกติก และการใช้น้ำตาแลกติก ของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินต ในฟลาคส์และถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการหมักเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินต ในฟลาคส์และถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตให้ทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า P-value ของการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักและพลาสติกขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T-Test

	ระยะเวลา การหมักสูงสุด (ชั่วโมง)	ปริมาณ กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาล กลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต กรดแลกติก (ร้อยละ)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)
ถังหมัก	36	29.57 ^a	39.29 ^a	71.57 ^a	0.82 ^a
พลาสติก	60	26.80 ^b	38.93 ^a	66.99 ^b	0.45 ^b
ค่า P-value	-	0.02	0.798	0.02	0.001

หมายเหตุ : P-value < 0.01 = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

0.01 < P-value < 0.05 = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น
ร้อยละ 95

P-value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

^{a,b} ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากรูปที่ 4.5 เห็นได้ว่าการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที ในชั่วโมงที่ 36 มีการผลิตกรดแลกติกสูงสุด โดยผลิตกรดแลกติกได้ 29.57 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าร้อยละ 21.53 เมื่อเทียบกับการผลิตกรดแลกติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่ชั่วโมงเดียวกัน (ที่ชั่วโมง 36 ปริมาณกรดแลกติกในพลาสติกเท่ากับ 24.93 กรัมต่อลิตร) และมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ในอาหารสังเคราะห์ 1.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 97.33 หลังจากนั้นน้ำตาลกลูโคสมีการลดลงอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 0.71 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการผลิตกรดแลกติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะนิ่ง จะเห็นได้ว่าเป็นการผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 มีปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 26.80 กรัมต่อลิตร ซึ่งช้ากว่าการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที และมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 1.99 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 95.03 เมื่อสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 1.07 กรัมต่อลิตร

การเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติของการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสระหว่างการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

แต่ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดและผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดที่ได้จากการผลิตในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า P-value เท่ากับ 0.02 โดยการผลิตกรดแลกติกในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร มีผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดร้อยละ 66.99 และ 71.57 ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุด 0.82 และ 0.45 กรัมต่อลิตรชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 โดยมีค่า P-value เท่ากับ 0.001

จากรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของการผลิตกรดแลกติกในถังหมักและพลาสติกขนาด 2 ลิตร มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร สามารถควบคุมพีเอชให้คงที่เท่ากับ 6.5 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต แต่การผลิตกรดแลกติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะนี้ จะไม่สามารถควบคุมพีเอชได้ จึงทำให้พีเอชลดลง โดยมีพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 3.7 จากพีเอชเริ่มต้น 6.5 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต จึงทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกต่ำ ดังนั้นการผลิตกรดแลกติกในถังหมักสามารถควบคุมพีเอชให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ซึ่งทำให้การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่สูงกว่าในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Idris และ Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรด โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็ว และให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง และสอดคล้องกับการทดลองของ John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าที่พีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติก

นอกจากนี้การหมักในถังหมักมีการกวนด้วยใบพัด ซึ่งการกวนมีผลทำให้เกิดการผสมของอาหารสังเคราะห์กับเชื้อที่ใช้ในการหมัก เชื้อจึงสามารถใช้สารอาหารที่อยู่ในถังหมักได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้ได้ปริมาณกรดแลกติกมาก และใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยลง ดังนั้นการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที มีศักยภาพการผลิตกรดแลกติกดีกว่าในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะนี้ เนื่องจากการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร สามารถควบคุมพีเอช และมีการกวน จึงทำให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 อิสระ ที่ทำการทดลองในสภาวะเดียวกัน พบว่าเซลล์ตรึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 29.57 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งสูงกว่าเซลล์อิสระที่ผลิตกรดแลกติกได้ 15.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 (จิราภรณ์ และณัฐวาทิ, 2549 ; มัทนา และคณะ, 2549 ; เสกสรรค์ และอรรณพณ์, 2549)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกันทั้ง 7 สูตรอาหาร พบว่าในอาหารสังเคราะห์สูตรที่มียีสต์สกัดและเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนมีการผลิตกรดแลคติกสูงสุด โดยให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 สามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 31.67 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรดแลคติกเท่ากับ 0.81 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.53 กรัมต่อลิตรชั่วโมง รองลงมาคือ สูตรอาหารสังเคราะห์ที่มีเปปโตเนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 สามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 13.92 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรดแลคติกเท่ากับ 0.42 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ดังนั้นจึงทำการเลือกใช้ยีสต์สกัดและเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก การศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในระดับฟลาस्कขนาด 2 ลิตร และถังหมักแบบไบพดิกวนขนาด 2 ลิตร พบว่าอาหารสังเคราะห์ในระดับถังหมักแบบไบพดิกวนขนาด 2 ลิตร ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 29.57 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรดแลคติกเท่ากับ 0.81 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อในฟลาस्कขนาด 2 ลิตร กับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าเชื้อที่เจริญในถังหมักมีการสัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึง ส่งผลให้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต มีการผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้น

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าปริมาณของกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้ง 7 สูตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยการนำผลผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรม เช่น เวย์ กากน้ำตาล เป็นต้น พบว่าผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็งคือ เวย์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส น้ำ โปรตีน วิตามิน และแร่ต่างๆ (Roukas, 1997) เหมาะแก่การนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก ซึ่งถือเป็นการทดลองที่ค้อยอดจากการศึกษาเดิม และยังเป็นการนำผลผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์ด้วย

เอกสารอ้างอิง

- จิราภรณ์ ไพโรภักทรกุล และณัฐวูทธิ ให้อสุวรรณ. 2549. ผลของแร่ธาตุปริมาณน้อยต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จงกมล จริยกุล. 2550. การผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1314. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ปราณี อ่านเปรื่อง .2535 .เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มัทนา ทองเลิศ, ณัฐพิชา ศรีอ่อนนวล, และอัมทิภา เมืองวงษ์. 2549. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2526. การผลิตและการใช้ immobilized enzymes. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศิริประภา มั่นตรง. 2550. การเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ศิวพร ศิวเวชช. 2546. วัตถุประสงค์อาหาร เล่ม 1. นครปฐม : โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ.
- สุรีย์ ทองวณิชนิยม. 2543. การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลเพื่อวิตามิน บี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เสกสรรค์ มณีคำ และอรรถพนธ์ ชันชจิตร. 2549. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- Adinarayana, K., Jyothi, B., and Ellaiah, P. 2005. Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique. *AAPS PharmSciTech.* 6, 3 : 391-397.
- Altaf, M., Naveena, B. J. and Reddy, G. 2005. Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L (+) lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation. *Food Technology and Biotechnology.* 43, 3 : 235-239.
- A.O.A.C. 2000. Official Method of Analysis. 17th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Bergmaier, D., Champagne, C.P., and Lacroix, C. 2003. Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal of Applied Microbiology.* 95 : 1049–1057.
- Bulut, S., Elibol, M. Ozer and Dursum. 2004. Effect of different carbon sources on L(+) -lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal.* 21 : 33-37.
- Cheetham, P.S.J., Blunt, K.W. and Bucke, C. 1979. Physical studies in cell immobilization using calcium alginate gels. *Biotechnology and Bioengineering.* 21 : 2155-2168.
- Cheetham, P.S.J. 1980. Development in the immobilization of microbial cells and their application. *Enzyme and fermentation Biotechnology.* 4 : 189-242.
- Chibata, I. and Tosa, T. 1977. Transformation of organic compounds by immobilized microbial cells. *Advance Applied Microbiology.* 22 :1-25.
- Dailey, O.D., Dowd, M.K. and Mayorga, J.C. 2000. Influences of lactic acid on the solubilization of protein during steeping. *Journal Agriculture Food Chemistry.* 48 : 1352-1357.
- Dembczynski, R. and Jankowski. T. 2002. Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. *Enzyme and Microbial Technology.* 31 : 111-115.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28 : 350–356.
- Fitzpatrick, J.J., Ahrens, M. and Smith, S. 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 protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Process Biochemistry*. 37 : 183-186.
- Food and Drug Administration. 1998. Code of Federal Regulations. U.S. Government Printing Office, Washiton. D.C. Title 21.
- Gardner, W.H. 1972. Acidulants in food processing. *Hand book of food additive* 2nd ed. 1p : 225-270.
- Huang, L.P., Jin, B., Lant, P. and 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 *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*. 41 : 1117-1123.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2006. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*. 41 : 759-763.
- Jones, M.L., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T. and Prakash, S. Deconjugation of Bile Acids with Immobilized Genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1). *Applied Bionics and Biomechanics*. 2, 1 : 1-8.
- Kadam, S.R., Patil, S.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M. and Gokhale, D.V., 2006. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry*. 41 : 120-126.
- Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M. Bezirtzoglou, E. and Kanellaki, M. 2005. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit piece for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*. 40 : 411-416.
- Kushal, R., Anand, S.K., Chander, H. 2005. Development of a direct delivery system for a co-culture of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* based on micro-entrapment. *Milchwissenschaft*. 60, 2 : 130-134.
- Laskin, I.A. 1985. *Enzyme and Immobilized Cells in Biotechnology*. Canada : The Benjamin/Cummings Publishing Company. Inc.
- Muller, V. 2001. Bacterial fermentation. *Encyclopedia of life Science*. 1-7.

- Nancib, A., Nancib, N., Meziane Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M. and Boudrant, J. 2005. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology*. 96 : 63-67.
- Nancib, A., Nancib, N., Boubendir, A., Benslimane, C., Blanchard, F. and Boudrant, J. 2001. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology*. 78 : 149-153.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A. 2004. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7, 2 : 167-179.
- Oh, H., Wee, Y.J., Yun, J.S., Han, S.H., Jung, S. and Ryu, H.W. 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology*. 96 : 1554-4562.
- Ohkouchi, Y. and Inoue, Y. 2006. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorus* LMG18011. *Bioresource Technology*. 97 : 1554-1562.
- Orla-Jensen, S. 1919. *The Lactic Acid Bacteria*. Copenhagen : Fred Host and Son.
- Pauli, T. and Fitzpatrick, J.J. 2002. Malt combining nut as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic acid by fermentation with *Lactobacillus casei*. *Process Biochemistry*. 38 : 1-6.
- Priest, F.G. and Campbell, I. 1996. *Brewing Microbiology*. 2nd ed. New York : Chapman and Hall.
- Roukas, T. and Kotzekidou, P. 1998. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed culture of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* cell using fedbatch culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 22 : 199-204.
- Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A. 1998. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 2nd ed. New York : Marcel dekker.Inc.
- Stiles, M.E. and Holzappel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36 : 1-29.
- Tanaka, T., Hoshina, M., Tanabe, S., Sakai, K., Ohtsubo, S. and Taniguchi, M. 2006. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bioresource Technology. 97 : 211-217.
- Wee, Y.J., Kim, J.N., Yun, J.S. and Ryu, H.W. 2004. Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. Enzyme and Microbial Technology. 35 : 568-573.
- Wee, Y.J., Kim, J.N., Yun, J.S. and Ryu, H.W. 2006. Pilot-Scale Lactic Acid Production via Batch Culturing of *Lactobacillus* sp. RKY2 Using Corn Steep Liquor As a Nitrogen Source. Technol Biotechnol. 44, 2 : 293-298
- Wee, Y.J., Kim, J.N. and Ryu, H.W. 2006. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. Food Technol Biotechnol. 44, 2: 163-172.
- Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic and Professional.
- Yoo, I., Seong, G., Chang, H., and Park, J. 1996. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. Enzyme and Microbial Technology. 19 : 428-433.
- Yun, J.S., Wee, Y.J. and Ryu, H.W. 2003. Production of optically pure l(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. Enzyme and Microbial Technology. 33 : 416-423.
- Available : <http://bioweb.usu.edu/emlab/current%20news.html>
- Available : <http://www.brighton73.freeseve.co.uk/>
- Available : <http://www.chemheritage.org/EducationalServices/faces/poly/readings/green.htm>
- Available : <http://www.lactospore.com/back.htm>

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

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

วิธีการ

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

1.2 อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

Meat extract	10	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (Peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

วิธีการ

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

2. สารเคมี

สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 3.0

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

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

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

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส วิธีฟินอล-ซัลไฟวริก (Dubois, 1956)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. คิวเวตแก้ว
3. ปิเปต

สารเคมี

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

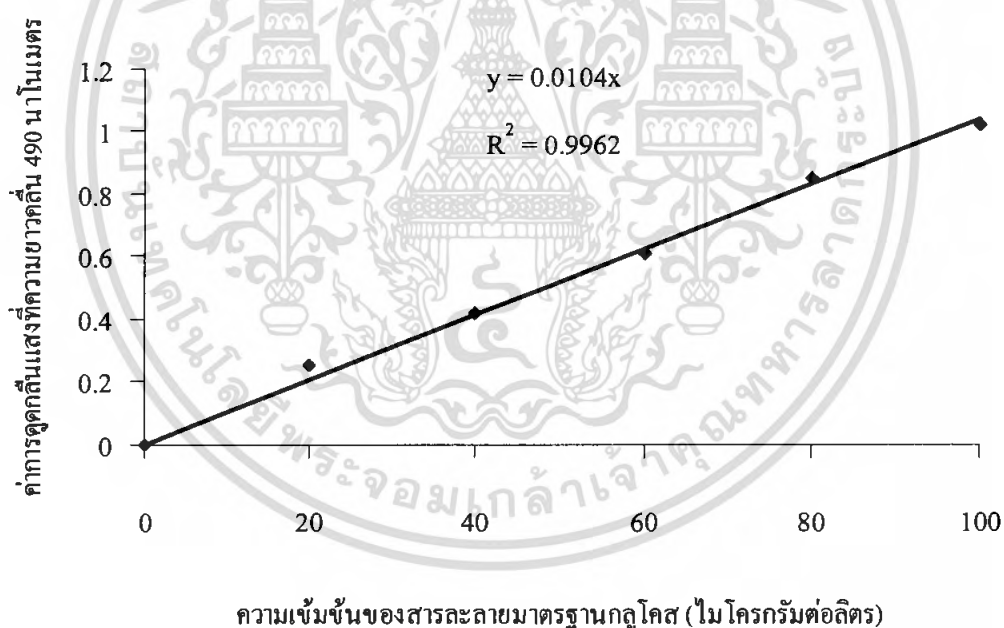
วิธีการ

1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 0.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยให้กรดลงที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าและนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้ำเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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



รูปที่ 1 กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

วิธีการเตรียมน้ำเกลือร้อยละ 0.85

1. ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม ละลายในน้ำ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

1. ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.7 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2. ปรับพีเอชเท่ากับ 7.4 ± 0.2 ด้วยไฮโดรคลอริกความเข้มข้นเข้มข้น 0.1 โมลาร์

วิธีการละลายเม็ดเจล

1. นำพลาสติกตัวอย่างที่บ่มไว้แต่ละชั่วโมงมากรองเม็ดเจลออกด้วยผ้าขาวบาง
2. นำเม็ดเจลลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาตร 220 มิลลิลิตร

3. แช่เม็ดเจลทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนเม็ดเจลละลายหมด

หมายเหตุ ทุกขั้นตอนทำเทคนิคปลอดเชื้อ

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจาง

2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างแต่ละความเจือจางที่เหมาะสมลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วงานละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้ 3 จานในแต่ละระดับความเจือจาง

3. นำอาหารแข็ง MRS ไปหลอมให้ละลายแล้วทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร

4. เขย่าจานโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ค้างทิ้งไว้จนอุ่นแข็ง

5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

6. นับจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกเฉพาะความเจือจางที่โคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตร โดยคูณค่าเฉลี่ยนั้นด้วยระดับความเจือจางที่ตรวจนับ

3. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วยเครื่อง HPLC (กัญชุนิกา และคณะ, 2548)

3.1 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

1. Power เครื่องทุกเครื่องของ HPLC
2. ยก Sinkers ใสในขวดของ Mobile phase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เปิด Drain ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ให้สังเกตว่าในสายของ Sinkers มีฟองอากาศอยู่รึเปล่า ถ้ายังมีอยู่ให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
5. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinkers ไม่มีแล้วให้รอกจน Pump หยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน
6. ปิด Drain valve ที่ Pump
7. ตั้ง Flow rate, P max และ P min ที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับ Pump P max (ดูจาก Pressure maximum ของ Column)
8. ตั้งอุณหภูมิที่ต้องการไว้ที่ CTO (ถ้ามี)
9. ตั้ง Parameter ให้กับ Detector
10. 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 Sinkers ออกจาก Mobile phase แล้วจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มี Mobile phase ใหม่อยู่
 5. รอกจน Pump ดูด Mobile phase ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20-30 มิลลิลิตร
 6. ยก Sinkers ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของ Sinkers ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาดแล้วนำ Sinkers จุ่มลงในขวดของ Mobile phase ใหม่
 7. ในระหว่างขั้นตอนที่ 6 ถ้า Pump หยุดทำงาน ให้กดปุ่ม Purge อีกครั้ง
 8. ให้สังเกตว่าสายของ Sinkers มีฟองอากาศอยู่รึเปล่า ถ้ายังมีให้กด Purge ให้ Pump ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
 9. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinkers ไม่มีแล้วให้รอกจน Pump หยุดทำงานเองหรือให้กด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน
 10. ปิด Drain valve ที่ Pump แล้วสั่งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์
- หมายเหตุ : การเปลี่ยน Mobile phase ต้องคำนึงถึงด้วยว่า Mobile phase เก่าและใหม่เข้ากันหรือเปล่า ถ้าไม่สามารถเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันได้ต้องใช้สารอื่นเป็นตัวเชื่อมกลาง โดย run mobile phase ตัวเชื่อมกลางอย่างน้อย 20 นาที

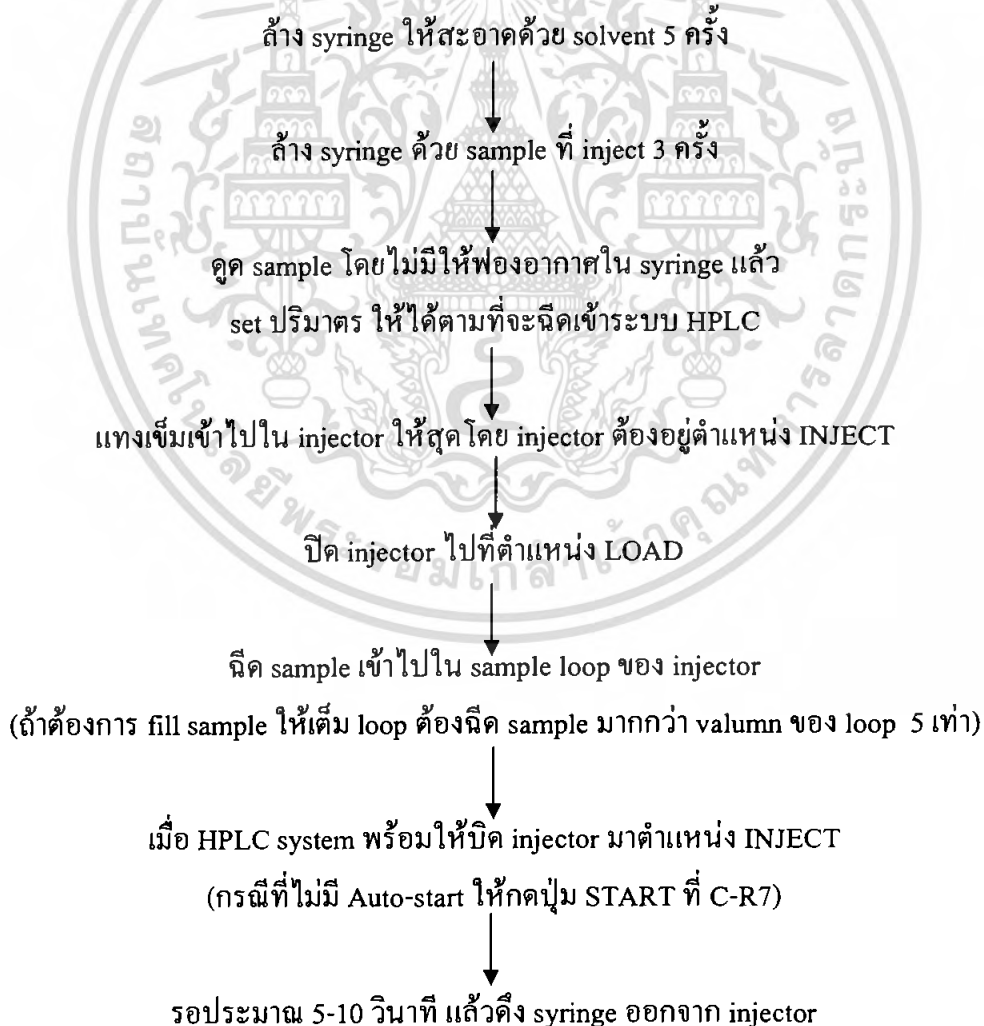
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตัวอย่าง 1) Buffer Solution → น้ำกลั่น HPLC → Polar Original Solvent
 2) Non Polar Solvent → Iso-propanol Polar → Original Solvent

3.3 ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง

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

6.1 Rheodyne Manual Injector



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

↓
ล้างด้วย syringe ที่ใช้ฉีด sample ด้วย solvent 20-30 ครั้ง

3.4 ขั้นตอนการปิดเครื่อง

1. หลังจาก inject sample สุกท้ายเสร็จแล้วให้ run mobile phase ต่ออีกประมาณ 30 นาที
2. ตั้ง Off pump
3. ปิด power ของ HPLC units แล้วยก Sinkers ให้พ้น Mobile phase

หมายเหตุ : กรณีที่จะหยุดใช้ เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

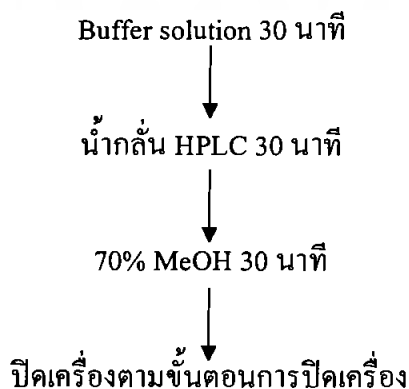
3.5 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

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 ทั้งสองว่าสามารถผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันได้ดีต้องมี mobile phase ชั้นกลางอย่างละ 30 นาที
2. การล้างใช้ flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที หรือน้อยกว่าขึ้นอยู่กับชนิดของ column

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



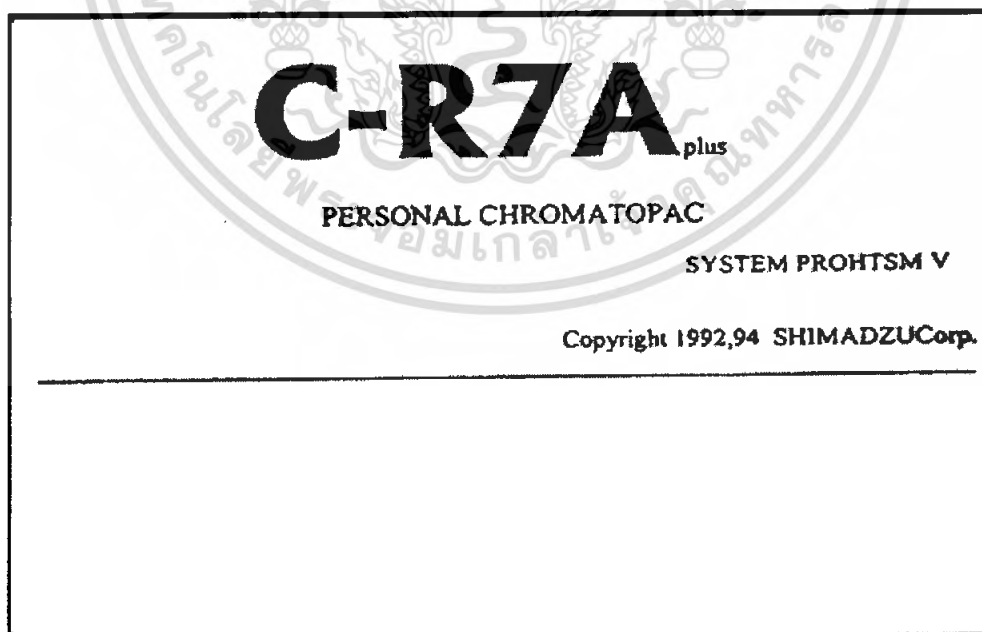
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)

1. Run Mobile Phase ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run Mobile Phase ที่ใช้เก็บ Column 1 ชั่วโมง
3. หยุด Pump แล้วถอด column ออกจากระบบแล้วต่อ pipe เปล่าแทนที่ และปิด column ด้วย plug ให้แน่น
4. เปลี่ยน mobile phase เป็น 70% 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 ในกรณีที่มิมี 2 Drive ให้ใส่แผ่น System disk ใน Drive 1 และแผ่นเก็บข้อมูลใน Drive 2 ในกรณีที่มิมี Board สำหรับเชื่อม HPLC กับ C-R7A ให้ทำการเชื่อมสัญญาณระหว่างเครื่องทั้งสองโดยพิมพ์ OPEN TRS 7 และ ENTER หลังจากปรากฏหน้าจอ ดังภาพ



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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

- ตั้งชื่อ File สำหรับ Save ข้อมูลของ Chromatogram เลือกข้อ 3 ตามด้วย ENTER จะ

ปรากฏ

Chromatogram Storage Mode	[S:set R:reset C:cancel 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 (สูงสุด99) และ ENTER เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา 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

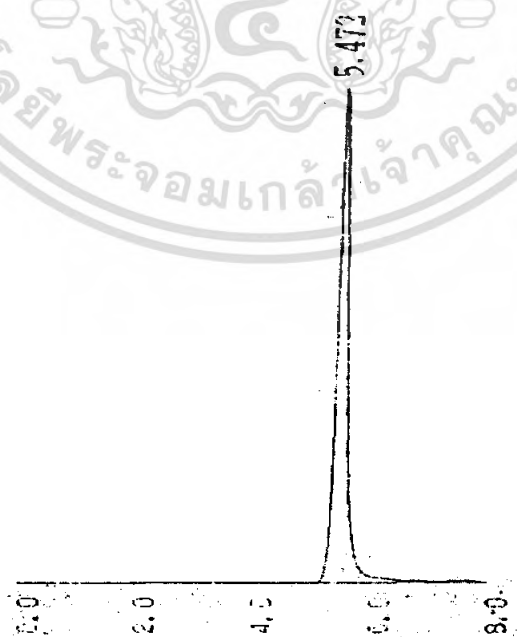
4. เลือกข้อ 1 จากหน้าจอ Menu ของ WIN1 จากนั้นรอสังเกตเห็นเส้น Baseline ค่อยข้างเรียบจากนั้นทำการ Zero สัญญาณจาก Detector โดยปรับปุ่ม Zero ที่ Detector จนกว่าจะสามารถ Set 0 ที่ Detector ได้

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

6. Menu ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis File

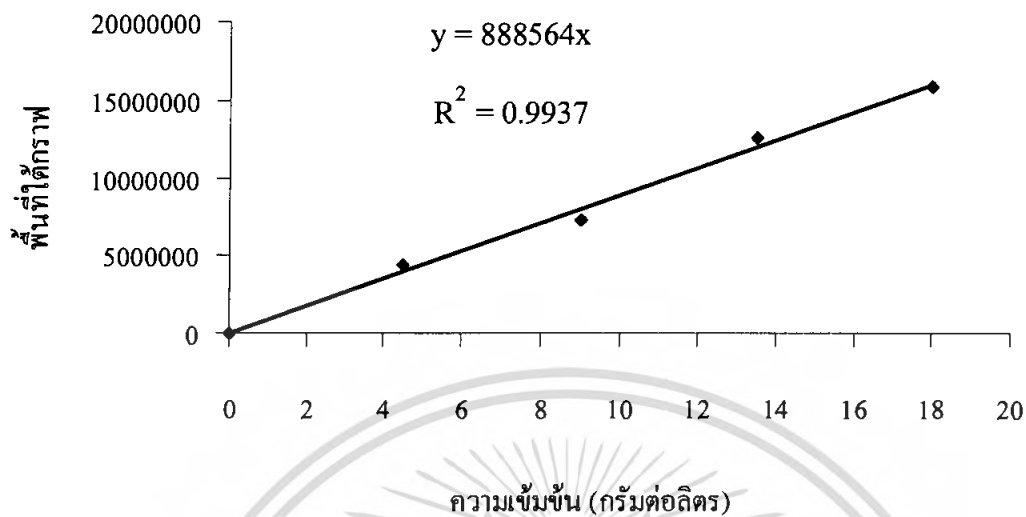
7. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณ และให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START

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



รูปที่ 2 แสดงค่า Retention time ของกรดแลกติกมีค่าเท่ากับ 5.472

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณกรดแลคติกในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)						
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	0	0	0	0	0	0	0
12	8.64	1.05	5.14	1.87	1.65	7.60	1.89
24	13.86	1.40	6.31	2.50	3.57	9.91	3.02
36	19.90	1.67	8.84	4.22	7.88	14.52	4.69
48	26.17	1.89	11.10	5.13	10.93	18.36	5.21
60	31.67	2.43	14.94	6.60	15.08	23.92	6.47
72	28.94	1.49	12.19	6.06	12.32	20.31	6.28
84	24.98	1.45	8.51	5.85	11.89	18.00	6.00
96	22.04	1.35	8.04	5.63	9.65	17.49	5.68
108	20.57	1.33	8.00	5.50	8.50	15.34	4.52
120	19.13	1.30	7.98	5.29	7.31	14.82	4.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช						
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
12	5.0	6.5	5.7	5.9	5.7	5.5	5.9
24	4.9	6.3	5.5	5.5	5.5	5.4	5.6
36	4.8	6.3	5.5	5.3	5.5	5.2	5.6
48	4.7	6.3	5.4	5.2	5.2	5.2	5.5
60	4.5	6.2	5.3	5.1	5.1	5.1	5.3
72	4.6	6.3	5.4	5.1	5.2	5.3	5.3
84	4.7	6.3	5.5	5.1	5.2	5.4	5.3
96	4.8	6.3	5.5	5.2	5.3	5.4	5.3
108	4.8	6.3	5.5	5.2	5.3	5.4	5.4
120	4.8	6.3	5.5	5.2	5.3	5.4	5.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกเลี้ยงด้วยแคลเซียมอะซิเนต

ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)						
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
12	26.96	33.31	27.35	31.45	28.52	28.72	31.29
24	24.13	27.07	23.79	28.39	24.07	25.64	24.39
36	19.61	25.72	19.81	22.39	22.56	19.90	21.64
48	15.24	20.00	15.45	10.56	15.60	14.40	14.49
60	1.10	15.65	8.48	13.00	9.31	6.66	10.76
72	0.98	14.64	10.24	10.14	8.44	6.52	9.30
84	0.97	14.24	9.17	9.42	8.01	5.50	8.26
96	0.97	14.07	9.37	9.06	7.48	5.47	8.26
108	0.54	13.44	8.71	8.05	7.22	4.38	8.25
120	0.52	13.24	8.67	7.02	7.19	4.28	7.24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลกลูโคส พีเอช และจำนวนเซลล์ จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

ชั่วโมงที่	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	จำนวนเซลล์
0	0.00	40.00	6.5	4.80×10^6
12	10.01	33.10	4.8	1.9×10^7
24	12.88	27.61	4.5	1.03×10^9
36	15.75	25.00	4.4	6.80×10^9
48	21.34	5.22	4.2	5.40×10^{10}
60	24.54	2.49	3.9	6.23×10^{11}
72	21.38	1.96	3.9	3.10×10^{11}
84	18.36	1.51	4.0	2.87×10^{11}
96	17.64	1.35	4.1	7.63×10^{10}
108	17.43	1.04	4.1	8.17×10^9
120	17.15	0.77	4.3	4.87×10^9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลกลูโคส และพีเอช จากการศึกษาสัณยภาพการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาस्क และถังหมักขนาด 2 ลิตร

ชั่วโมงที่	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)		น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)		พีเอช	
	ถังหมัก	ฟลาस्क	ถังหมัก	ฟลาस्क	ถังหมัก	ฟลาस्क
0	0.00	0.00	40.00	40.00	6.5	6.6
6	13.62	12.41	35.99	36.42	6.5	6.0
12	17.58	16.62	23.68	34.26	6.5	4.2
18	20.29	18.88	12.83	25.91	6.5	3.7
24	22.54	21.56	2.96	23.13	6.5	3.7
30	26.63	23.20	1.13	18.97	6.5	3.7
36	29.57	24.93	1.07	17.27	6.5	3.8
42	26.97	25.01	1.06	8.36	6.5	3.8
48	25.55	25.63	0.99	5.58	6.5	3.8
54	25.17	26.34	0.88	4.44	6.5	3.9
60	24.97	26.80	0.84	1.99	6.5	3.9
66	24.32	26.28	0.76	1.84	6.5	3.9
72	24.12	24.46	0.71	1.07	6.5	3.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณกรดแลกติกด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1969.888	6	328.315	48485.291	.000
Within Groups	.095	14	.007		
Total	1969.983	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan

data	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
2	3	2.4300				
7	3		6.4700			
4	3		6.6000			
3	3			14.9400		
5	3			15.0800		
6	3				23.9200	
1	3					31.6700
Sig.		1.000	.073	.056	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของผลผลิตกรดแลกติก ด้วยโปรแกรม SPSS 13.0

(Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมี

นัยสำคัญทางสถิติแบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น

ร้อยละ 95

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.315	6	.219	547.964	.000
Within Groups	.006	14	.000		
Total	1.321	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan

data	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
2	3	.1000				
4	3		.2200			
7	3		.2200			
3	3			.4700		
5	3			.4900		
6	3				.7200	
1	3					.8200
Sig.		1.000	1.000	.241	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของอัตราการผลิตกรดแลกติก ด้วยโปรแกรม SPSS 13.0

(Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมี

นัยสำคัญทางสถิติแบบ Duncan New multiple range test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น

ร้อยละ 95

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.460	6	.077	191.464	.000
Within Groups	.006	14	.000		
Total	.465	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan

data	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
2	3	.0400				
4	3		.1100			
7	3		.1100			
3	3			.1700		
5	3			.1700		
6	3				.2300	
1	3					.5300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณกรดแลกติกในระดับฟอสเฟต และตั้งหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตรด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติแบบ Paired Sample T-Test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

T-Test

Group Statistics

group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Lactic 1	3	29.5687	1.07890	.62290
Lactic 2	3	26.7967	.70631	.40779

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Lactic	Equal variances assumed	.727	.442	3.723	4	.020	2.77199	.74451	.70489	4.83909
	Equal variances not assumed			3.723	3.448	.027	2.77199	.74451	.56769	4.97630

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของผลผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาस्क และถังหมักแบบไบโพดกวนขนาด 2 ลิตรด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติแบบ Paired Sample T-Test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

T-Test

Group Statistics

group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Yeid 1	3	73.9226	2.69729	1.55728
2	3	66.9925	1.76579	1.01948

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Yeid	Equal variances assumed	.727	.442	3.723	4	.020	6.93007	1.86131	1.76225	12.09788
	Equal variances not assumed			3.723	3.448	.027	6.93007	1.86131	1.41924	12.44090

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของอัตราการผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก และถังหมักแบบไบโพดกวนขนาด 2 ลิตรด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติแบบ Paired Sample T-Test ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

T-Test

Group Statistics

group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
producactivity 1	3	2.0534	.07492	.04326
2	3	1.0388	.14715	.08496

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
producactivity	.681	.456	10.643	4	.000	1.01462	.09534	.74993	1.27932
Equal variances not assumed			10.643	2.972	.002	1.01462	.09534	.70958	1.31966