

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่มีต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ
Lactobacillus casei ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Effect of different carbon sources on lactic acid production by calcium
algenate immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 10863**

Mr. Jirawat Bunsong

Miss Wathiporn Saichanapun



A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for the

Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก
 โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วย
 แคลเซียมอัลจิเนต

นักศึกษา นายจิรวัดน์ บุญส่ง นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 47050877
 นางสาวฉนิภรณ์ สายชนะพันธ์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 47050895

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาคพิเศษ

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
 อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร.มารีสา จาคูพรพิพัฒน์	
กรรมการ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ รศ.สุขใจ ชูจันทร์	

(..... นวพล ธรรม.....)

รศ.ดร. นวพล ธรรม ธรรม

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วย แคลเซียมอัลจิเนต	
นักศึกษา	นายจิรวุฒน์ นางสาววณิชกรณ์	บุญส่ง สายชนะพันธ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม	
ปีการศึกษา	2550	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ	ชูจันทร์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร.มาริสา ผศ.อารี	จาดุพรพิพัฒน์ ฤทธิบุรณ์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ประกอบด้วย กลูโคส ซูโครส แลคโตส และน้ำตาลทราย และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ประกอบด้วย 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตรที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยมีสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง พีเอชเริ่มต้น 6.5 ระยะเวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า สามารถผลิตกรดแลคติกสูงสุด 28.65 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคส 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อศึกษาสัณยภาพในการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่า การผลิตในระดับฟลาสก์ 2 ลิตร สามารถผลิตกรดแลคติกสูงสุด 26.80 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 ผลได้ 0.67 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น และอัตราการผลิตกรดแลคติก 0.45 กรัมต่อลิตรชั่วโมง สำหรับการผลิตในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการควบคุมอัตราการกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที และพีเอช 6.5 สามารถผลิตกรดแลคติกสูงสุดได้ 29.57 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 36 ผลผลิตกรดแลคติก 0.74 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น และอัตราการผลิตกรดแลคติก 0.82 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Special Project Title	Effect of different carbon sources on lactic acid production by calcium alginate immobilize <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863	
Name	Mr. Jirawat	Bunsong
	Miss Wathiporn	Saichanapun
Department	Applied Biology	
Program	Microbiology	
Academic	2007	
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Sukjai	Choojan
Special Project Coadvisor	Asst. Prof. Dr. Marisa	Jatupornpipat
	Assoc. Arree	rittibul

Abstract

The effect of carbon sources (glucose, sucrose, lactose sugar) and concentration (20, 30, 40, 50 g/L) on lactic acid production by calcium alginate immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 10863 were studied. The condition of fermentation were temperature of 37 °C at static condition, initial pH was 6.5 for 120 h. It was found that maximum lactic production was 28.65 g/L when using glucose 40 g/L as carbon source. The efficiency of lactic acid production in 2 liters of flask and fermenter were performed. The result indicated that in 2 liters of flask, maximum lactic acid concentration was 26.80 g/L at 60 h., yield($Y_{p/s}$) was 0.67 and productivity was 0.45 g/L.h. Lactic acid production in 2 liters of fermenter which controlled agitation rate of 100 rpm and pH 6.5, 29.57 g/L of lactic acid was produced at 36 h, yield($Y_{p/s}$) was 0.74 and productivity was 0.82 g/L.h.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงการพิเศษ เรื่อง ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โครงการงานนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีได้หากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ทางผู้จัดทำขอขอบคุณ รศ.สุขใจ ชูจันทร์, ผศ.ดร.มารีสา จาตุพรพิพัฒน์ และผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ ที่เสียสละเวลาให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ และแก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในขณะที่ทำการทดลอง ตลอดจนกระทั่งโครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณพี่ ๆ ปริญญาโทและเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในเรื่องต่าง ๆ ทำให้การทำโครงการพิเศษเป็นไปได้อย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดาของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนกำลังทรัพย์ในการทำโครงการพิเศษครั้งนี้

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงการพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นายจิรวัดน์

บุญส่ง

นางสาววณิชกรณ

สายชนะพันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ขั้นตอนการทดลองและดำเนินงาน	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
2.1 ประวัติความเป็นมาและความสำคัญของกรดแลกติก	5
2.2 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดแลกติก	6
2.2.1 คุณสมบัติทางเคมีของกรดแลกติก	6
2.2.2 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก	7
2.3 กระบวนการผลิตกรดแลกติก	8
2.3.1 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการทางเคมี	8
2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการทางชีวภาพ	9
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	9
2.4.1 แหล่งคาร์บอน	9
2.4.2 แหล่งไนโตรเจน	11
2.4.3 แหล่งแร่ธาตุ	12
2.4.4 อุณหภูมิ	13

2.4.5	ค่าพีเอช	13
2.5	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก	13
2.5.1	แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก	14
2.5.2	แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	15
2.6	กระบวนการหมักกรดแลคติก	17
2.6.1	ไฮโมแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ	17
2.6.2	เฮเทอโรแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ	17
2.7	ความหมายของเอนไซม์และเซลล์ที่ถูกตรึง	17
2.8	วิธีการตรึงเซลล์	21
2.8.1	การเชื่อมกับตัวพุง	21
2.8.2	วิธีเชื่อมขวาง	22
2.8.3	วิธีห่อหุ้ม	23
2.9	ข้อดีและข้อเสียของการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง	24
2.9.1	ข้อดีของการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง	24
2.9.2	ข้อเสียของการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง	24
2.10	ข้อควรคำนึงเมื่อใช้เซลล์ที่ถูกตรึงกับอาหาร	25
2.11	อัลจินต	26
2.12	High Performance Liquid Chromatography(HPLC)	28
2.12.1	ทฤษฎีและความรู้ทั่วไป	28
2.12.2	ทฤษฎีการปฏิบัติ	29
2.12.3	การประยุกต์ใช้ HPLC	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย		33
3.1	อุปกรณ์	33
3.2	สารเคมี	34
3.3	เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย	34
3.3.1	การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย	34
3.3.2	การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น	34
3.4	ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย	35

3.4.1	ขั้นตอนการดริงเซลล์	35
3.4.2	การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกดริงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	35
3.4.3	ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก	37
3.4.4	ศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกดริงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในระดับฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร	37
3.5	การวิเคราะห์ผล	38
3.6	วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ	38
บทที่ 4	ผลการวิจัยและอภิปรายผล	40
4.1	ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกดริงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	40
4.1.1	ผลการศึกษาปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตในอาหารสังเคราะห์ที่มี แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน	40
4.1.2	ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงในอาหารสังเคราะห์ที่มี แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน	40
4.1.3	ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารสังเคราะห์ที่มี แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน	41
4.2	ผลการศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับการผลิต กรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกดริงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	44
4.2.1	ผลการศึกษาปริมาณกรดแลคติก ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นต่างๆกัน	44
4.2.2	ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น ต่างๆในการเลี้ยงเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกดริงด้วย แคลเซียมอัลจิเนต	44
4.2.3	ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารสังเคราะห์ ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน	45
4.3	ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร	49
4.4.1 ผลการศึกษาปริมาณกรดแลคติกที่มีการเปลี่ยนแปลง โดยการเลี้ยงเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินตในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร	49
4.4.2 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีการเปลี่ยนแปลง โดยการเลี้ยงเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินตในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร	50
4.4.3 ผลการศึกษาค่าพีเอชที่การเปลี่ยนแปลง โดยการเลี้ยงเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินตในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร	50
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	53
เอกสารอ้างอิง	54
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	59
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์	62
ภาคผนวก ค ข้อมูลทางสถิติ	72

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงโครงสร้างของกรดแลคติก	6
2.2 แสดงพอลิแลคติกแอซิด	6
2.3 แสดงไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลคติก	7
2.4 แสดงรูปร่างของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i>	15
2.5 แสดงกลไกการเกิดกรดแลคติกด้วยวิถีไกลโคไลซิสโดยแลคติกแอซิดกลุ่มโฮโมแลคติกเฟอร์เมนต์เตทีฟ	18
2.6 แสดงกลไกการเกิดกรดแลคติกโดยแลคติกแอซิดกลุ่มเฮเทอโรแลคติกเฟอร์เมนต์เตทีฟ	19
2.7 แสดงการเชื่อมเซลล์กับตัวพวยง	22
2.8 แสดงการตรึงเซลล์โดยการเชื่อมขวาง	22
2.9 แสดงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มในช่องตาข่าย	23
2.10 แสดงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มในแคปซูลเล็ก	24
2.11 แสดงโครงสร้างของอัลจินเตชนิดต่างๆ	27
2.12 แสดงกลไกการเกิดเจลของแคลเซียมอัลจินเต	27
2.13 แสดงเครื่อง HPLC รุ่น Shimadzu	29
4.1 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเตในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน	42
4.2 แสดงผลปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเตในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน	43
4.3 แสดงผลการการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเตในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน	43
4.4 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเตในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆกันเป็นแหล่งคาร์บอน	46
4.5 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเตในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน	46

สารบัญรูป

เรื่อง	หน้า
4.6 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆในการเลี้ยงเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	47
4.7 แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาล ฟิเอช และจำนวนเซลล์จากการศึกษา การเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร	48
4.8 แสดงปริมาณกรดแลคติกและการใช้น้ำตาลกลูโคสจากการหมักเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	49
4.9 แสดงการเปลี่ยนแปลงฟิเอชจากการหมักเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	52

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก	7
2.2 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกในสกุล <i>Lactobacillus</i>	16
2.3 แสดงลักษณะและความแตกต่างของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	20
3.1 แสดงชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง	36
4.1 แสดงผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	42
4.2 แสดงผลของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	45
4.3 แสดงค่า P-value ระหว่างการผลิตกรดแลคติกโดยใช้ ถังหมักและฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T-test	52

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดแลคติกหรือกรดนมเป็นกรดอินทรีย์ที่พบตามธรรมชาติในนมเปรี้ยว ผักดองชนิดต่างๆ และเนยแข็ง เป็นต้น กรดแลคติกและอนุพันธ์ของกรดแลคติก lacyllated mono – and diglycerides of fatty acids , glycerol lactostearate และ glyceryl lactopalmitate นิยมใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารที่มีความจำเป็นต่อวงการอุตสาหกรรมอาหารมากเพราะกรดแลคติกที่เติมลงไป ในอาหารนั้นจะเป็นตัวที่ช่วยเพิ่มกลิ่นและรสของอาหาร ช่วยควบคุมความเป็นกรดบ้าง ปัจจุบันกรดแลคติกและอนุพันธ์ของกรดแลคติกนั้นมีการใช้และได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในระดับอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร ด้านเภสัชกรรม อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมต่างๆ อีกมากมาย เนื่องจากกรดแลคติกประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลและไฮดรอกซิล ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงหมู่ทางเคมีได้หลากหลาย ได้สารเคมีชนิดใหม่ที่มีประโยชน์เช่น propylene oxide, propylene glycol, acrylic acid, 2,3-pentenedione และ lactate ester กรดแลคติกเป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ ทดแทนพลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม นอกจากนี้ กรดแลคติกยังใช้เป็นสารปรับความเป็นกรดบ้าง ใช้เป็นวัตถุดิบเสีย ในทางการแพทย์ใช้อนุพันธ์ของกรดแลคติกที่อยู่ในรูปของแคลเซียมแลคเตตเป็นส่วนผสมของยาลดกรดในกระเพาะอาหาร และช่วยรักษาการขาดแคลเซียมในร่างกาย ยืดอายุการเก็บของอาหาร ช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์และการงอกของสปอร์ ช่วยเสริมประสิทธิภาพของสารป้องกันการหืนและช่วยปรับปรุงลักษณะเนื้อของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เป็นต้น (ศิวาพร, 2546) กรดแลคติกยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องหนัง เวชภัณฑ์ โลชั่น อุตสาหกรรมการทำพลาสติกในรูปของพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable plastics)

การผลิตกรดแลคติกนั้น สามารถผลิตได้ทั้งจากกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพแต่ทว่าในการผลิตทั้งสองแบบนี้ก็มีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน โดยในกระบวนการผลิตทางเคมีนั้นมีข้อดีในด้านการผลิตได้มากและรวดเร็วแต่ก็มีข้อเสียคือเป็นวิธีที่ใช้ค่าใช้จ่ายสูงและมีความยุ่งยากในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากผลผลิตที่ได้จากกระบวนการทางเคมีจะเป็นกรดแลคติกผสม (DL-Lactic) รวมทั้งยังเกิดสารพิษในกระบวนการผลิต ส่วนการผลิตกรดแลคติกทางชีวภาพเป็นการนำจุลินทรีย์มาหมักกับสารตั้งต้นซึ่งผลผลิตที่ได้จะอยู่ในรูป D-Lactic ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ (Kadam และคณะ, 2006) และในกระบวนการผลิตไม่เกิดสารพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่มีข้อเสียคือ ผลิตได้ในปริมาณต่ำและใช้เวลานาน นอกจากนี้สารตั้งต้นที่จุลินทรีย์ใช้นั้นสามารถนำวัสดุเหลือทิ้งหรือผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล หางนมมาใช้แทนได้ จึงได้มีการศึกษาหาวิธีที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณมากและเสียค่าใช้จ่ายในการลงทุนที่ต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะและองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม (Senthuran และคณะ, 1999)

การนำผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมมาเพิ่มมูลค่าเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากการลดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมและลดต้นทุนการผลิตเพราะมีราคาต่ำหรือไม่มีมูลค่า เช่น หางนม กากน้ำตาล เป็นต้น ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาล ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก ซึ่งในการศึกษาถึงผลเสียของการผลิตกรดแลคติกโดยวิธีการทางชีวภาพนั้น คืออาจใช้เวลานานและให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นจึงได้มีการค้นคว้าเพื่อทำการพัฒนาเพื่อเพิ่มผลผลิตของกรดแลคติก โดยปรับปรุงวิธีการเพิ่มศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในกระบวนการทางชีวภาพ ได้แก่ สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตกรดแลคติกที่เหมาะสม วิธีการตรึงเซลล์เพื่อย่นเวลาการผลิตและการปรับปรุงเทคนิคการหมักโดยใช้วิธีการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) หรือใช้วิธีการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) โดยการหมักแบบกึ่งกะเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตกรดแลคติกในระดับอุตสาหกรรม พบว่าการหมักแบบกึ่งกะมีการใช้เซลล์อิสระถึงร้อยละ 50 แต่พบว่าผลผลิตที่ได้มีปริมาณน้อยเนื่องจากการหมักกรดแลคติกนั้นมักมีปัญหาในเรื่องของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการทางชีวภาพ ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยวิธีการตรึงเซลล์

การนำเทคนิคการตรึงเซลล์มาป้องกันไม่ให้เซลล์สัมผัสกับกรดแลคติกโดยตรง เพื่อให้สามารถทนต่อปริมาณกรดแลคติก ช่วยรักษาเซลล์ ลดการยับยั้งเนื่องจากซับสเตรตที่มีปริมาณมาก เพื่อให้เชื้อผลิตกรดแลคติกได้มาก สามารถแยกตัวเซลล์ออกจากอาหาร โดยไม่ต้องอาศัยการปั่นเหวี่ยง หรือการกรอง ซึ่งเป็นการลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ สามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ และคำนึงถึงแหล่งอาหารหลักที่เหมาะสมของกรดแลคติกโดยการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งทำการศึกษาจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อทำการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ

Lactobacillus casei ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

1.1) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ

Lactobacillus casei ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2) ศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

2) เพื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารสังเคราะห์ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยวิธี Total plate count

3) ศึกษาสัณฐานภาพในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในระดับพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยทำการวิจัยเพื่อหาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมหลังจากนั้นศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมัก 2 ลิตร และทำการวิเคราะห์ปริมาณของกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีฟินอลซัลฟิวริก (Dubosis, 1956) และทำการวัดค่าพีเอชตลอดการวิจัย

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน

1.4.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

1.4.1.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

1.4.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

1.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

1.4.2.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

1.4.2.2 ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

1.4.2.3 ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยวิธี Total plate count

1.4.2.4 ศึกษาสัณฐานภาพในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในระดับพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรและถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.4.3 การวิเคราะห์ผล

1.4.4 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถผลิตกรดแลคติกด้วยกระบวนการทางชีวภาพจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต
- 2) ทำให้ทราบถึงแหล่งคาร์บอนและปริมาณที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดแลคติก
- 3) เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในห้องปฏิบัติการ เพื่อประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ประวัติความเป็นมาและความสำคัญของกรดแลคติก

แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นที่รู้จักและนำมาใช้ประโยชน์เป็นเวลานานในการผลิตนมเปรี้ยว เนยแข็ง ผักและผลไม้หมักดอง และขนมปังจากโคเปรี้ยว กรดแลคติกได้ผลิตขึ้นเป็นการค้าแรกที่เมืองลิทเทิลตัน (Littleton) รัฐแมสซาชูเซตส์ (Massachusetts) ในปีค.ศ.1881 และในปีค.ศ.1980 สหรัฐอเมริกาและยุโรปผลิตกรดแลคติกในระดับอุตสาหกรรมมากถึง 40,000 ตัน โดยการหมักแบบกะและการสังเคราะห์ทางเคมี เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมอาหาร กรดแลคติกเป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพทดแทนพลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม(ศิวาพร, 2546)

กรดแลคติกมีคุณสมบัติความชื้นได้ง่ายอาจอยู่ในรูปเป็นผลึกหรือของเหลวข้น ไม่มีสี มีกลิ่นครีมนอ่อนๆ ละลายน้ำได้ดีให้รสเปรี้ยวปานกลาง ในอุตสาหกรรมอาหารได้มีการใช้กรดแลคติกเป็นสารปรับความเป็นกรดต่าง และเป็นตัวทำละลาย เช่น ใช้ผสมกับน้ำยาที่ใช้ช่วยเพิ่มความแข็งให้กับเซลโลเฟนเพื่อใช้ในการบรรจุอาหาร น้ำยาล้างฟิล์มถ่ายรูป การพิมพ์สิ่งทอ น้ำยาเคลือบโลหะและขี้ผึ้ง ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้กรดแลคติก ได้แก่ แยม เยลลี่ เซอร์เบต ผลิตภัณฑ์ขนมหวานแลเครื่องดื่มชนิดต่างๆ ซอส ผักดอง เป็นต้น โดยอาจจะใช้กรดแลคติกเพียงชนิดเดียวหรือรวมกับกรดชนิดอื่นๆ(ศิวาพร, 2546)

ในด้านเภสัชกรรมนิยมใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางครีม และเป็นส่วนผสมของครีมเพื่อป้องกันผิวหนัง พอลิเมอร์ของกรดแลคติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ได้นำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น ไหมเย็บแผล การทำศัลยกรรมกระดูก เป็นต้น

อนุพันธ์ของกรดแลคติกที่อยู่ในรูปของแคลเซียมแลคเตต มีการใช้ทำเป็นวัตถุทำให้คงรูป (firming agents) ใช้กับผลไม้ที่นำมาผลิตแยม เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพคติน ทำให้ผักและผลไม้มีความคงตัวมากขึ้น ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น รสของผักและผลไม้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป สำหรับในผลิตภัณฑ์ปลา เนื้อ สัตว์ปีก มีการใช้กรดแลคติกหรือเกลือแลคเตตเพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษา ในผลิตภัณฑ์ขนมอบช่วยทำให้เกิดเจลที่ดีขึ้น ช่วยปรับปรุงคุณภาพของนมผง นมข้น ในทางการแพทย์ใช้แคลเซียมแลคเตตเป็นส่วนผสมของยาลดกรดในกระเพาะ และช่วยรักษาการขาดแคลเซียมในร่างกาย ส่วนผู้ขาดธาตุเหล็ก สังกะสีและแมกนีเซียม ก็สามารถบริโภคอาหารที่มีการเสริมด้วยเฟอร์รัสแลคเตต(ferrous lactate) ซิงค์แลคเตต(zinc lactate) และแมกนีเซียมแลคเตต(magnesium lactate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุพันธ์ของกรดแลคติกชนิดอื่น เช่น แลคทีเลตเตตโมโนกลีเซอไรด์และแลคทีเลตเตตไดกลีเซอไรด์ของกรดไขมัน (lactylated mono-and diglycerides of fatty acids), กลีเซอรอลแลคโตเทียเรท (glyceryl lactostearate) และ กลีเซอรอลแลคโตปาลมิเตต (glyceryl lactopalmitate) นิยมใช้เป็นตัวกระทำอิมัลชันในผลิตภัณฑ์ขนมอบ โดยเฉพาะในแป้งเค้กสำเร็จรูปและเนยขาว เป็นต้น ส่วนแคลเซียมสเตียริล-2-แลคทีเลต (calcium stearyl-2-lactylate) นิยมใช้เป็นตัวกระทำอิมัลชันในผลิตภัณฑ์ขนมปัง (FDA, 1998)

2.2 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดแลคติก

2.2.1 คุณสมบัติทางเคมีของกรดแลคติก

กรดแลคติกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid สูตรโมเลกุล $C_3H_6O_3$ กรดแลคติกมี 2 ไอโซเมอร์ดังรูป 2.1

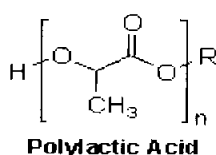


รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของกรดแลคติก

ที่มา: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY251/dlwrong.html>

การเปลี่ยนรูปของ L(+)-Lactic acid และ D(-)-Lactic acid เกิดจากการหมุนของเอทิลีนออกไซด์บริดจ์ (ethylene oxide bridge) ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่หนึ่งและอะตอมที่สองโดยเกิด tautomeric shift ของไฮดรอกซิลกรุป (hydroxyl group) บนคาร์บอนอะตอมที่สองไปเป็นคาร์บอนิลกรุป (carbonyl group) ของคาร์บอกซิล (carboxyl) กรดแลคติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสี กรดแลคติกสามารถละลายน้ำ เอทานอล อะซิโตน อีเทอร์ และไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์ และคาร์บอนซัลไฟด์

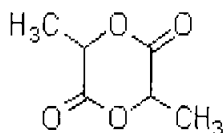
กรดแลคติกมารวมกันหลายๆ โมเลกุล ทำให้เกิดพอลิแลคติกแอซิดดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงพอลิแลคติกแอซิด

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

กรดแลคติกที่เกิดเป็นไซคลิกพอลิเมอร์(cyclic polymers) เช่น lactide (3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione) ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติก โครงสร้างไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลคติก ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลคติก

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

กรดแลคติกที่สิ่งมีชีวิตผลิตได้จะมีปริมาณความเข้มข้นต่ำ โดยกรดแลคติกความเข้มข้นสูงเป็นอันตรายต่อร่างกายทั้งภายนอกและภายใน เมื่อกรดสัมผัสกับผิวหนังจะเหมือนถูกไฟลวก เมื่อกรดถูกดวงตาสามารถทำให้ตาบอดได้ ในกรณีที่กรดถูกดวงตาหรือผิวหนังควรล้างออกด้วยน้ำสะอาดหลายๆครั้ง

2.2.2 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก

คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติกแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก

คุณสมบัติทางกายภาพ	กรดแลคติก
น้ำหนักโมเลกุล	90.08
จุดหลอมเหลว	16.8 °C
จุดเดือด	82 °C ที่ความดัน 0.5 mm.Hg หรือ 122 °C ที่ความดัน 14 mm.Hg
ค่าคงที่ของการแตกตัว (K_a ที่อุณหภูมิ 25 °C)	1.37×10^{-4}
ค่าความร้อนของการเผาไหม้ (ΔH_c)	1361 KJ/mole
ค่าความร้อนจำเพาะ (C_p ที่อุณหภูมิ 20 °C)	190 J/mole/°C

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 กระบวนการผลิตกรดแลคติก

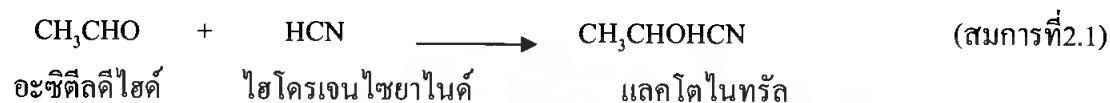
2.3.1 การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีการทางเคมี

การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางเคมีแบ่งได้ 3 ขั้นตอนดังนี้

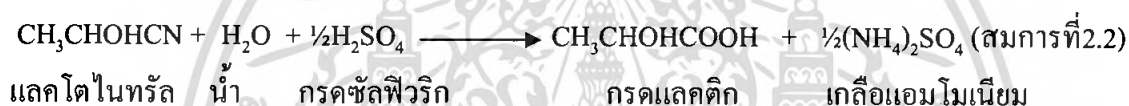
1. นำไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) ทำปฏิกิริยากับอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ได้แลคโตไนทริล (lactonitrile) ที่ความดันบรรยากาศ ดังสมการที่ 2.1

Liquid phase at high

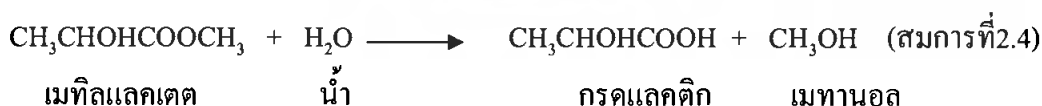
Atmospheric pressures



2. นำแลคโตไนทริลมาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟิวริกจะได้กรดแลคติก และเกลือแอมโมเนียม ดังสมการที่ 2.2



3. นำกรดแลคติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ คือเมทิลแลคเตต มากล้นและย่อยจะได้กรดแลคติก ส่วนเมทานอล ไฮโดรเจนไซยาไนด์และสารปนเปื้อนอื่นๆจะกำจัดออกโดยนำมาผ่านถ่านกัมมันต์และการแลกเปลี่ยนไอออนดังสมการที่ 2.3 และสมการที่ 2.4

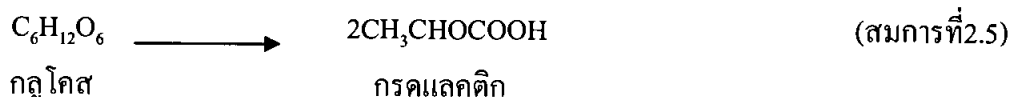


ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกมี 2 ชนิดคือ โฮโมแลกติกแบคทีเรียและเฮเทอโรแลกติกแบคทีเรีย ซึ่งขั้นตอนในการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงดังสมการที่ 2.5 และสมการที่ 2.6 (Muller, 2001)

โฮโมแลกติกแบคทีเรีย



เฮเทอโรแลกติกแบคทีเรีย



นอกจากนี้กรดแลกติกยังสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นและฟังไจ ซึ่งสามารถหมักได้แบบกะ กึ่งกะและแบบต่อเนื่อง ปัจจัยที่สำคัญในการผลิตคือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ ฟิเอซ อุณหภูมิ การให้อากาศ (Anders และ Mikael, 2002)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของ Lactic Acid Bacteria (LAB)

2.4.1 แหล่งคาร์บอน

ปนัดดา และคณะ (2545) ศึกษาการหมักกรดแลกติกด้วย *Pediococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. ในอาหารเอ็มอาร์เอส (MRS) น้ำสับปะรดและนมพว่องมันเนย พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติกในอาหารเอ็มอาร์เอส สูงกว่าการเจริญในอาหารน้ำสับปะรดและนมพว่องมันเนย โดยปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus* sp. ในอาหารเอ็มอาร์เอสมีปริมาณสูงสุด 9.2 กรัมต่อลิตร ในอาหารน้ำสับปะรดและในนมพว่องมันเนยมีปริมาณ 7.6 กรัมต่อลิตร และ 7.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับกรดแลกติกที่ผลิตได้จากเชื้อ *Pediococcus* sp. ในอาหารทั้ง 3 ชนิด พบว่าอาหารเอ็มอาร์เอส อาหารน้ำสับปะรด อาหารนมพว่องมันเนยมีปริมาณกรดแลกติก 11.8 กรัมต่อลิตร, 11.1 กรัมต่อลิตร และ 11.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Roukas และ Kotzckidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus lactis* พบว่าการหมักแบบกะโดยเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ *Lactobacillus casei* ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 30 กรัมต่อลิตร *Lactobacillus lactis* ให้ปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรด 25 กรัมต่อลิตรภายในเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงแบบเซลล์ผสมปริมาณกรดแลกติกจะสูงถึง 45 กรัมต่อลิตร

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส กาแลคโตส แลคโตส กลีเซอรอล โซโลส เวย์และแป้ง โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงเมื่อใช้กลูโคส ฟรุคโตสและมอลโตสเป็นสารตั้งต้น

Bulet และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ได้แก่ ชูโครส กลูโคส โมลาส ฟักถั่วและรำข้าวสาลี โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น

Wee และคณะ (2004) ได้นำโมลาสซึ่งมีน้ำตาลชูโครสเป็นองค์ประกอบมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 95.7 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 94.9

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

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

Xu และคณะ (2006) ศึกษาศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก soybean stalk hydrolysate โดยเชื้อ *Lactobacillus sake* และ *Lactobacillus casei* พบว่าการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus sake* สามารถผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 48 สำหรับ *Lactobacillus casei* สามารถผลิตกรดแลกติกได้ถึงร้อยละ 56

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

Yun และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* RYK 1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกาแลคโตส กลีเซอรอล โซโลส เวย์และแป้ง พบว่าในน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตสและน้ำตาลมอลโตส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 18.18, 17.95 และ 16.80 ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลคโตส กลีเซอรอล โซโลส เวย์และแป้งจะให้ปริมาณกรดแลกติก 2.7, 1.26, 2.24, 1.68, 1.83 และ 1.19 ตามลำดับซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำ

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ โดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* RYK 1 ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อเซลล์เจริญในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลมอลโตส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณการผลิตจะอยู่ระหว่าง 5.2-6.0 กรัมต่อลิตรชั่วโมง กรดแลคติกที่ได้คิดเป็น 0.96 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น การผลิตกรดแลคติกจากกลูโคส ฟรุคโตสและมอลโตส โดย *Enterococcus faecalis* RYK 1 สามารถให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูง

Bulet และคณะ (2004) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส โมลาส ผักถั่ว และรำข้าวสาลี พบว่าน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียวให้กรดแลคติกในปริมาณที่สูงเช่นเดียวกับที่ใช้ น้ำตาลจากผักถั่วให้ปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 58 กรัมต่อลิตร

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

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันฝรั่งโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่า ความเข้มข้นของแป้งที่ 20 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชที่ 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดแลคติก 0.85-0.92 กรัมต่อสารตั้งต้น

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

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเศษอาหารเหลือทิ้งจากโรงอาหารโดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivivans* พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 19.5 กรัมต่อสารตั้งต้น 200 กรัม

Tanaka และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกในรูปที่สิ่งมีชีวิตไม่สามารถนำมาใช้ได้ (D-form) จากรำข้าวซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้สูงถึง 9.2 กิโลกรัมต่อลิตร

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

2.4.2 แหล่งไนโตรเจน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kolozik และคณะ (1997) พบว่าเมื่อเติมยีสต์สกัดลงไปในเวย์จะทำให้ชีวมวลและปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นแต่เมื่อไม่เติมยีสต์สกัดการเจริญของเซลล์และปริมาณกรดจะน้อย

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

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

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

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปทิชอย ยูเรีย เปปโติน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัม พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะสูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

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

2.4.3 แหล่งแร่ธาตุ

Fitzpatrick และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่มีการเติมแมงกานีสในรูป $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ร่วมกับยีสต์สกัดลงไปในเวย์ พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดจะสั้นลงและเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสได้ดี แต่เมื่อไม่มีการเติมแมงกานีสเวลาที่ใช้ในการผลิตจะนานขึ้น และเชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ได้เท่าที่ควร

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปทิชอย ยูเรีย เปปโติน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัม พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะสูงเมื่อมีการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งและเศษอาหารที่เหลือทิ้งจากโรงงานอาหารโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* 18011 พบว่าเมื่อเติมเมฆกานีสลงไป ปริมาณกรดแลคติกจะได้อีกสูงกว่าเมื่อไม่เติมเมฆกานีส

2.4.4 อุณหภูมิ

Idris และ Suzuna (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสัปรดโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ซึ่งในการวิจัยได้ศึกษาอุณหภูมิที่ระดับ 27, 30, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด

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

2.4.5 ค่าพีเอช

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

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

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

2.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria ; LAB) จัดอยู่ในแฟมิลีแลคโตบาซิลลาเซีย (Lactobacillaceae) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีเอนไซม์อะคะเตเลส ไม่มีไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนกรด มีทั้งลักษณะรูปร่างกลมและรูปร่างท่อน (Salminen, 1998) ในการเจริญได้ทั้งพลังงานจากกระบวนการหมัก (fermentation) น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส มีความต้องการอาหารเชิงซ้อน (complex medium) ลักษณะที่สำคัญของแลคติกแอซิดแบคทีเรียคือความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ซึ่งทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผักดอง เนยแข็ง แลคติกแอซิดแบคทีเรียมีบทบาทในการหมักอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิดด้วยกัน เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผักและผลไม้ดอง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไส้กรอก เบียร์ ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังต้องการวิตามินและเกลือแร่อีกหลายชนิดในการเจริญ ซึ่งความต้องการสารอาหารต่างๆเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์

Salminen และคณะ (2004) ได้อธิบายถึงแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกว่าเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างแท่ง (rod) หรือกลม (cocci) สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมัก การจัดสกุลต่างๆเข้าสู่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกพิจารณาจากรูปร่างพื้นฐาน การหมักน้ำตาลกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ลักษณะกรดแลคติกที่สร้างความสามารถในการเจริญในบริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง การทนต่อความเป็นกรดและด่าง ประกอบด้วยสกุลที่มีความสำคัญทางด้านเทคโนโลยีด้านอาหาร เช่น *Aerococcus* , *Carnobacterium* , *Enterococcus* , *Lactobacillus* , *Lactococcus* , *Leuconostoc* , *Oenococcus* , *Pediococcus* , *Streptococcus* , *Tetragenococcus* , *Vagococcus* และ *Weissella*

แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นคำที่ใช้เรียกมานานตั้งแต่ก่อน ค.ศ. 2000 หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่ทำให้นมเปรี้ยว (milk-souring organisms) แบคทีเรียชนิดแรกที่แยกได้บริสุทธิ์ คือ *Bacterium lactis* โดยเจ ลิสเตอร์ (J. Lister) ในปีค.ศ.1873 มีการพัฒนาวิธีการจัดจำแนกเกิดขึ้นเมื่อพบความเหมือนระหว่างแบคทีเรียที่ทำให้นมเปรี้ยวและแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกจากแหล่งต่างๆ ต่อมา โอลาร์และเจนสัน (Orla –Jensen ได้เสนอโมโนกราฟ (monograph) แสดงการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางรูปร่างพื้นฐาน การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆและการใช้น้ำตาล สามารถจัดจำแนกได้ 6 สกุลคือ *Lactobacillus* , *Leuconostoc* , *Pediococcus* , *Streptococcus* , *Lactococcus* , และ *Enterococcus*

2.5.1 แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกได้แก่

Lactobacillus

Lactobacillus แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามตารางที่ 2.2

Pediococcus

แบคทีเรียในสกุลนี้จะอยู่กันเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายสั้นๆ ทนต่อความเป็นกรดสูง และมีการหมักน้ำตาลแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ ให้กรดประมาณร้อยละ 0.5-0.9 ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักผลิตภัณฑ์จากพืชต่างๆ เช่น กะหล่ำปลีดอง แดงกวาดอง และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก และเบคอน

Streptococcus

แบคทีเรียในสกุลนี้ส่วนมากก่อให้เกิดโรค อย่างไรก็ตาม *Streptococcus thermophilus* มีความสำคัญในด้านการผลิตโยเกิร์ต เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนยแข็ง

Lactococcus

แบคทีเรียในสกุลนี้มีรูปร่างทรงกลม มีการหมักน้ำตาลแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ มีความสำคัญในการผลิตโยเกิร์ตและเนยแข็ง แหล่งที่พบแบคทีเรียสกุลนี้ได้แก่ นมสด ถั่วและฮอพ

Enterococcus

แบคทีเรียในสกุลนี้ส่วนมากพบในลำไส้ใหญ่ หากพบเชื้อนี้จะบ่งบอกสุขลักษณะที่ไม่สะอาด (Bamforth, 2005)

Leuconostoc

แบคทีเรียในสกุลนี้มีรูปร่างทรงกลม อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสกุลนี้เป็นสาเหตุทำให้เนยแข็งและน้ำเชื่อมเสื่อม ทำให้มีปัญหาในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลซูโครสจากน้ำอ้อย แต่มีประโยชน์ในการทำแยมหมักขนมปัง

2.5.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา คือ *Lactobacillus casei* เป็นแบคทีเรียทนกรด รูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เซลล์มีขนาด 0.7-1.1 x 2.0-4.0 ไมโครเมตร มีกระบวนการหมักแบบเฮเทโรเฟอร์เมนเตทีฟ (heterofermentative) ได้ผลิตแก๊ซหลักคือกรดแลคติก สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นมดิบ นมหมัก ผักผล ไม้หมัก ถ้าใส่ของมนุษย์และสัตว์ ในอุตสาหกรรมมีการผลิตเพื่อเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกและเชื้อตั้งต้นในอุตสาหกรรมนมหมัก เป็นต้น (Salminen และคณะ, 2004) รูปร่างของเชื้อ *Lactobacillus casei* แสดงใน รูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงรูปร่างของเชื้อ *Lactobacillus casei*

ที่มา : <http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกในสกุล *Lactobacillus*

ลักษณะ	Obligately	Facultatively	Obligately
	homofermentative	heterofermentative	heterofermentative
การหมักน้ำตาลเพนโตส	-	+	+
การสร้างก๊าซ CO ₂ จาก กลูโคส	-	-	+
การสร้างก๊าซ CO ₂ จาก กลูโคเนส	-	+	+
เอนไซม์ FDP-aldolase	+	+	-
เอนไซม์ Phosphoketolase	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbruckii</i>	<i>Lb. curvatas</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. reutri</i>

ที่มา : Salminen และคณะ (2004)

ตัวอย่างแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกแสดงในตารางที่ 2.3

นอกจากแบคทีเรียยังมีเชื้อราและยีสต์ที่สามารถสร้างกรดแลคติก ได้แก่ *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus awmori* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น (Salminen และคณะ, 2004)

ในปีค.ศ. 1919 โอลาร์และเจนสัน (Orla-Jensen) เป็นผู้เริ่มจัดอนุกรมวิธานแลคติกแอซิดแบคทีเรียอย่างเป็นระบบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสแบ่งได้ 2 ชนิด ดังนี้

- 1) โฮโมแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ (homolactic fermentative)
- 2) เฮเทอโรแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ (heterolactic fermentative)

2.6 กระบวนการหมักกรดแลคติก

2.6.1 โฮโมแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ (Homolactic fermentative)

เป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (Homofermentative) โดยกลไกการเกิดกรดแลคติกคือการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูวิกแอซิด (pyruvic acid) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ด้วยวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) แล้วเปลี่ยนไพรูวิกแอซิดเป็นแลคติกแอซิด ดังรูปที่ 2.5

2.6.2 เฮเทอโรแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ (Heterolactic fermentative)

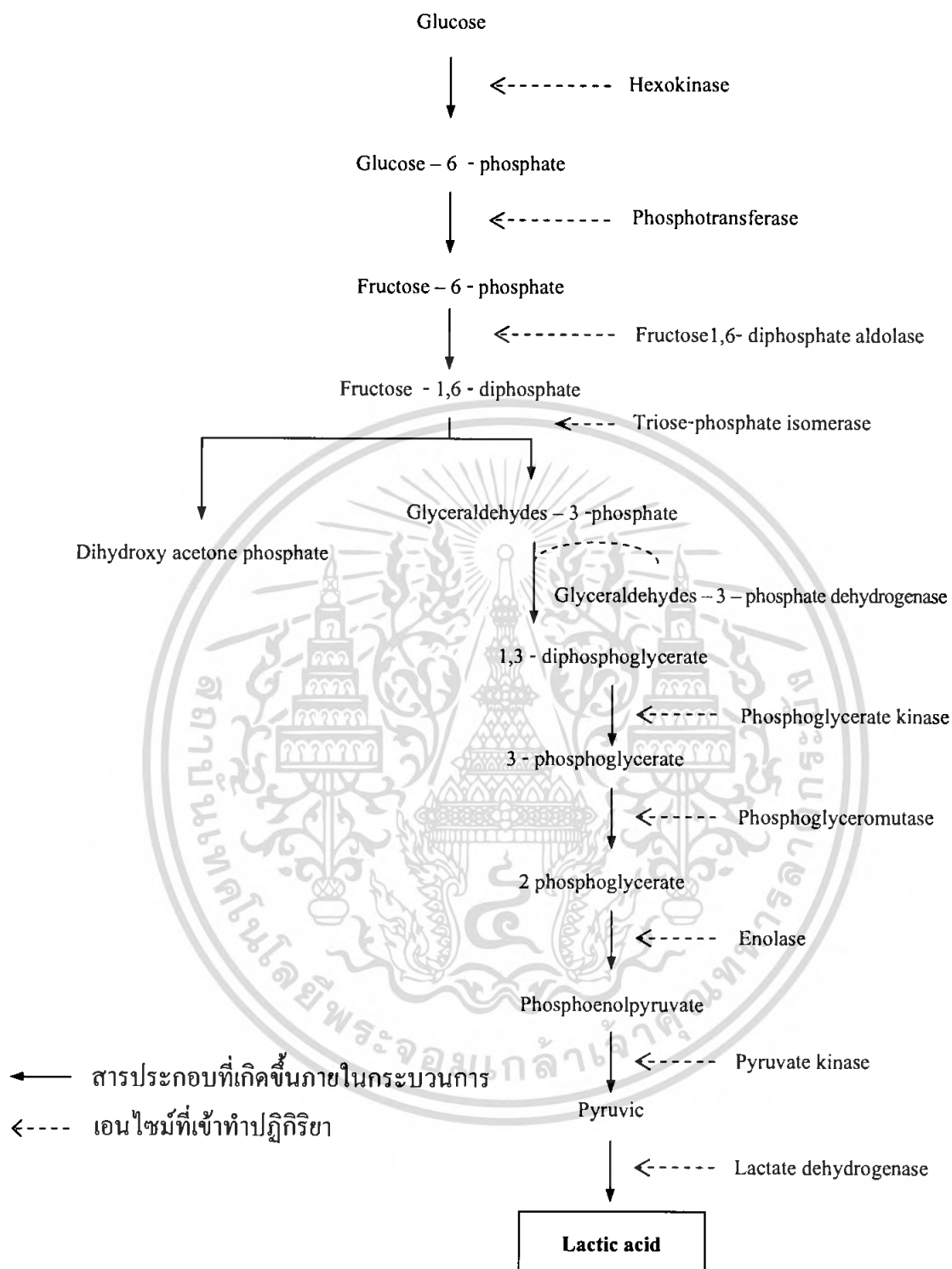
เป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลคติก เอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือกรดอะซีติก กลไกการเกิดกรดแลคติกดังรูปที่ 2.6

ปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรียออกเป็น 12 สกุล (Salminen, 1998) ได้แก่ *Streptococcus* , *Enterococcus* , *Lactococcus*, *Vagococcus* , *Aerococcus* , *Pediococcus* , *Tetragenococcus* , *Leuconostoc* , *Oenococcus* , *Weissella* , *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* ลักษณะและความแตกต่างของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ดังตารางที่ 2.3

2.7 ความหมายของเอนไซม์และเซลล์ที่ถูกตรึง

การตรึงเอนไซม์เดิมที่มีการพัฒนาเพื่อวัตถุประสงค์ให้มาสารละลายเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงขั้นตอนที่ยุ่งยากในการแยกสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์จุลินทรีย์หรือการใช้ระบบเอนไซม์รวม จึงได้มีการพัฒนาโดยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์และมีวิธีคล้ายกับการตรึงเอนไซม์ โดยได้ให้คำนิยามในลักษณะเดียวกับการตรึงเอนไซม์คือจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงจำกัดให้อยู่ต่อเนื่องในบริเวณใดบริเวณหนึ่งและมีคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างต่อเนื่อง (Laskin, 1985)

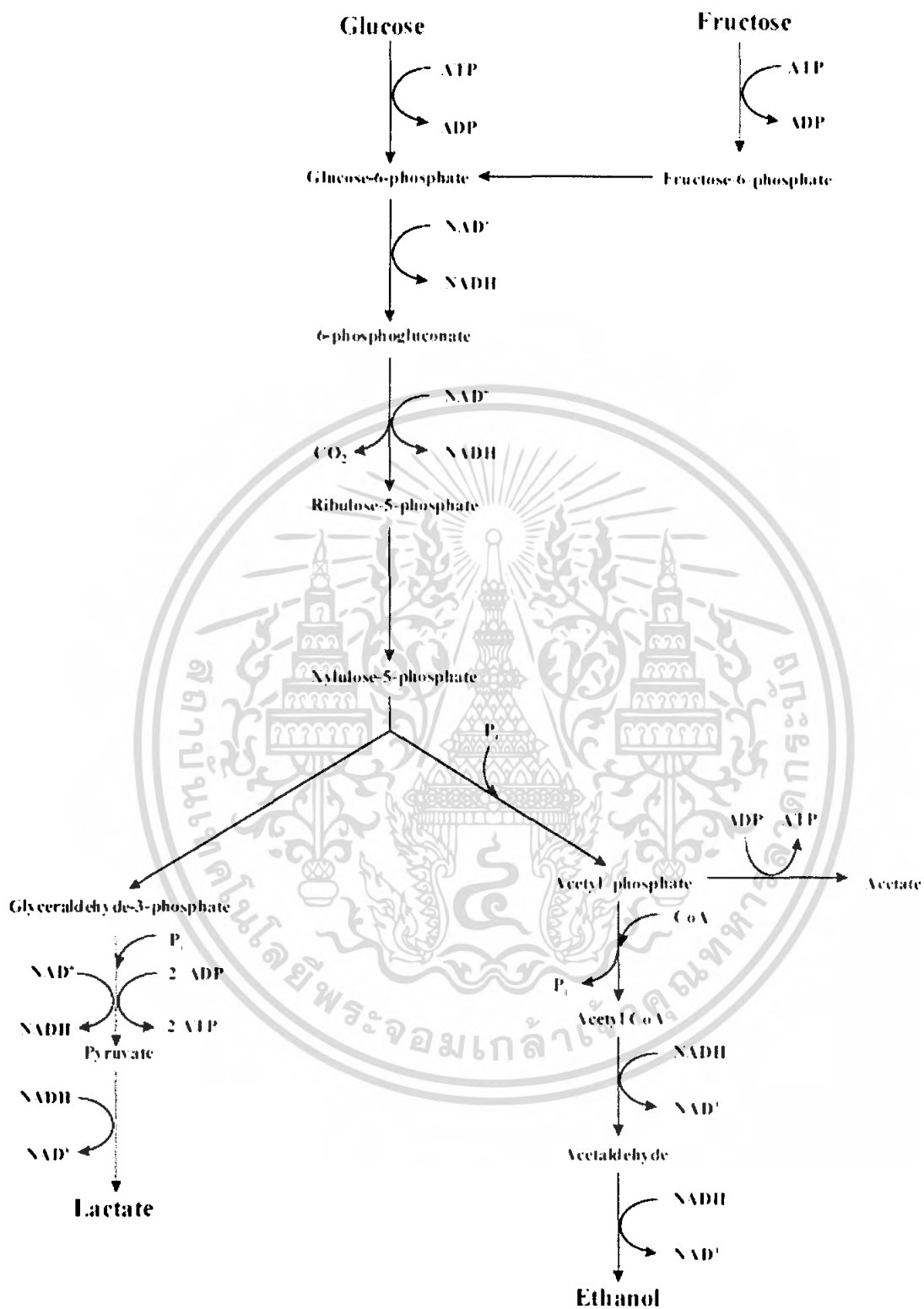
การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยทั่วไปทำได้โดยการทำให้เซลล์จุลินทรีย์จับกับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆหรือของแข็งในลักษณะของ วิธีเชื่อมพันธะโควาเลนต์ (Covalent bonding) วิธีห่อหุ้ม (Entrapment) วิธีดูดซับทางกายภาพ (Adsorption) หรือวิธีเชื่อมขวาง (Cross linking) การพัฒนาจุลินทรีย์โดยวิธีการตรึงเซลล์ไม่ให้เคลื่อนที่ก็เพื่อประโยชน์คือ ให้มีชุดของเอนไซม์จากเซลล์พร้อมสำหรับการใช้ ให้มีแหล่งของเซลล์จำนวนมากเพื่อใช้ในงานที่ต้องการปริมาณเซลล์มาก และให้มีที่เก็บเซลล์ซึ่งไม่ต้องการให้เจริญต่อไปขณะอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ประโยชน์ต่างๆเหล่านี้มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของจุลินทรีย์ได้ (วิเชียร สิวาวัชรมาศ, 2526)



รูปที่ 2.5 แสดงกลไกการเกิดกรดแลคติกด้วยวิถีไกลโคไลซิส โดยแลคติกแอซิดกลุ่มโฮโมแลคติกเฟอร์เมนต์เตทีฟ

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 แสดงกลไกการเกิดกรดแลคติกโดยแลคติกแอซิดกลุ่มเฮเทอโรแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ

ที่มา : <http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียแลคติก

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 ร้อยละ 6.5	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±
6. เจริญที่ความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 18	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
7. เจริญที่พีเอช 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
8. เจริญที่พีเอช 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
9. ชนิดของกรดแลคติก	L	D,L,DL	L	L	L	D	D,DL	L	L	D,DL

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

2.8 วิธีการตรึงเซลล์

แบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ ดังนี้

2.8.1 การเชื่อมกับตัวพุง (carrier binding)

หมายถึงการเชื่อมพันธะ ระหว่างเซลล์กับตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำ (Laskin, 1985) แบ่งออกได้เป็น 3 วิธีดังนี้ (วิเชียร สีลาวัชรมาศ, 2526)

2.8.1.1 การดูดซับ (Adsorption)

หมายถึง การดูดซับเซลล์เอาไว้บนสารพุงของแข็ง (solid support) ด้วยแรงอื่นที่ไม่ใช่แรงยึดร่วม (covalent linkages) เช่นแรงยึดระหว่างไอออน (ionic bonding) แรงยึดระหว่างไฮโดรเจน (hydrogen bonding) หรือแรงยึดระหว่างสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic bonding) แรงยึดที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์กับสารพุงจะอ่อนมาก ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น พีเอช ความแรงของไอออนและอุณหภูมิ การนำตัวพุงมาใช้ซ้ำทำได้ง่าย เหมาะกับตัวพุงราคาแพง ตัวอย่างตัวพุงเช่นเบนโทไนท์ (bentonite), เจลแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate gel), คาร์บอนแอกทีเวท (activated carbon), พอร์สกลาส (porous glass), แอซิดเคล (acid clay), กัวลิไนท์อะลูมินา (kaolinite aluminar) และโพลิเมอร์ธรรมชาติเช่น แป้ง กุ้งเต็น คอลลาเจน

2.8.1.2 วิธีเชื่อมแบบพันธะไอออน (Ionic binding method)

หมายถึง การเชื่อมระหว่างโปรตีนของเซลล์กับตัวพุงที่ไม่ละลายในสารละลาย ปฏิบัติโดยใช้พันธะไอออน

ตัวอย่างตัวพุง ได้แก่ สารที่มีอนุมูลแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange residue) ได้แก่ พอลิแซกคาไรด์ พอลิเมอร์สังเคราะห์ และอนุมูลประจุในตัวพุง เอนไซม์ต้องแตกต่างกันเช่น เอนไซม์ที่มีอนุมูลประจุบวก (anionic enzyme) เช่น กลูโคอะไมเลส และตัวพุงที่มีประจุลบ (cationic residue) เช่น DEAE-Sephadex

ลักษณะสำคัญของการตรึงรูปวิธีเชื่อมพันธะไอออนคือ

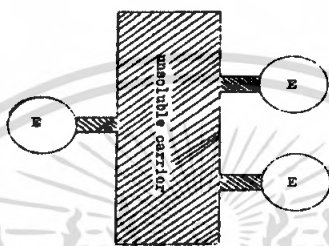
1. มีผลต่อกิจกรรมและ โครงรูปสามมิติของเอนไซม์น้อย ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ อาจคงเดิม

2. แรงเกาะกันระหว่างเซลล์กับตัวพุงอ่อน อาจหลุดง่ายที่ความเข้มข้นไอออนสูง (ionic strength) หรือแรงเกาะกันจะลดลงเมื่อเปลี่ยนพีเอช

3. กรรมวิธีไม่ซับซ้อน ใช้หลักการเชื่อมไอออนเหมือนการแลกเปลี่ยนไอออนของสาร แลกเปลี่ยนชีวภาพอื่นๆ ได้

2.8.1.3 วิธีเชื่อมพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding method)

หมายถึงการเชื่อมพันธะระหว่างเซลล์กับตัวพุงด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งพันธะโควาเลนต์เป็นพันธะที่เกิดจากอะตอมรวมกันโดยการถ่ายเทอิเล็กตรอนอย่างสมบูรณ์ และอะตอมใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน เนื่องจากพันธะวาเลนต์ต้องผ่านขั้นตอนของการสลายพันธะโควาเลนต์เดิม ดังนั้นพลังงานการสลาย (dissociation energy) ยิ่งสูง โมเลกุลใหม่ที่ได้จะมีพันธะโควาเลนต์ที่แข็งแรงและเสถียร รูปแสดงการเชื่อมเซลล์กับตัวพุง (carrier binding) แสดงในรูปที่ 2.7

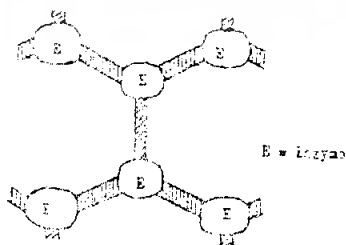


รูปที่ 2.7 แสดงการเชื่อมเซลล์กับตัวพุง (carrier binding)

ที่มา : วิเชียร ทีลาวัชรมาศ (2526)

2.8.2 วิธีเชื่อมขวาง (Cross-linking method)

การทำเซลล์ตรึงรูปด้วยวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะเคมีเหมือนกับการสร้างพันธะโควาเลนต์แต่ไม่ใช่ตัวพุง เซลล์จะถูกตรึงรูปอยู่ได้ด้วยการสร้างพันธะเชื่อมขวางระหว่างภายในโมเลกุลของเซลล์โดยอาศัยสารเชื่อมขวางซึ่งทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง 2 โมเลกุล หรือมากกว่า เรียกว่าครอสลิงเกอร์ (cross-linker) ซึ่งมีผลทำให้เซลล์หลายโมเลกุลเกาะกลุ่มเป็น โมเลกุลใหญ่ ละลายน้ำได้น้อยลง รูปแสดงการตรึงเซลล์โดยการเชื่อมขวาง แสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 แสดงการตรึงเซลล์โดยการเชื่อมขวาง (Cross-linking method)

ที่มา : วิเชียร ทีลาวัชรมาศ (2526)

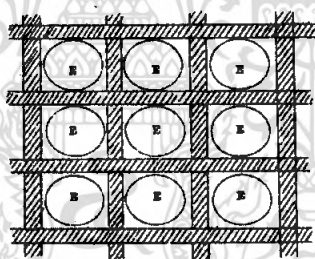
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3 วิธีห่อหุ้ม (Entrapping method)

วิธีห่อหุ้มเป็นวิธีที่รูปร่างแบบรวมเซลล์ไว้ในช่องว่างตาข่ายพอลิเมอร์หรือห่อหุ้มเซลล์ไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้มีสารซึมผ่านได้ (semipermeable membrane) ดังนั้นจึงแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ ห่อหุ้มเซลล์ในช่องตาข่าย (lattice type) และห่อหุ้มเซลล์ในแคปซูลเล็ก (microcapsule type) การตรึงรูปวิธีนี้แตกต่างจากวิธีเชื่อมพันธะโควาเลนต์และวิธีเชื่อมขวาง คือ เซลล์จะไม่เชื่อมพันธะเคมีใดๆกับสารห่อหุ้ม ด้วยเหตุนี้วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย

2.8.3.1 วิธีห่อหุ้มเซลล์ในช่องตาข่าย (Lattice type)

การห่อหุ้มเซลล์ในช่องตาข่ายของพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ทำได้ในลักษณะที่ผสมเซลล์เข้ากับสารห่อหุ้มในขณะที่กำลังจะเกิดพอลิเมอร์ โมเลกุลของเซลล์จะถูกห่อหุ้มด้วยช่องตาข่ายอย่างสม่ำเสมอทุกช่องอย่างซ้ำๆ ตัวอย่างพอลิเมอร์และโมโนเมอร์และสารเชื่อมขวางที่ใช้ในการห่อหุ้มคือ พอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ แป้ง ไคติน ไคโตซาน อัลจิเนต และคาราจีแนน เป็นต้น พอลิเมอร์สังเคราะห์ (สร้างจากสารโมโนเมอร์และไดเมอร์) ได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinylalcohol) สารเชื่อมขวางระหว่างสายพอลิเมอร์ ได้แก่ กลูตาโรลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และสารอื่นๆตามความเหมาะสมของชนิดพอลิเมอร์สังเคราะห์ และพันธะเคมีที่เกี่ยวข้อง รูปแสดงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มในช่องตาข่าย (Lattice type) แสดงในรูปที่ 2.9

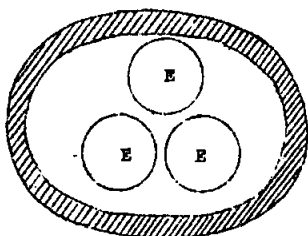


รูปที่ 2.9 แสดงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มในช่องตาข่าย (Lattice type)

ที่มา : วิเชียร ลีลาวัชรมาส (2526)

2.8.3.2 วิธีห่อหุ้มเซลล์ในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type)

วิธีห่อหุ้มเซลล์ในแคปซูลเล็กทำได้โดยให้เซลล์ถูกห่อหุ้มไว้ในเซมิเพอร์เมเบิลเมมเบรน (semi-permeable membrane) ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type)

ที่มา : วิเชียร ติลาวัชรมาส (2526)

2.9 ข้อดีและข้อเสียของการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง

2.9.1 ข้อดีของการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง

1. ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการเอนไซม์ตัวเดียว
2. ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการเอนไซม์หลายตัว แต่ไม่ต้องการตัวร่วมที่มีความเฉพาะเจาะจง (specificity cofactor)
3. ใช้ในปฏิกิริยาเอนไซม์ตัวเดียวและหลายตัวที่ต้องการตัวร่วม
4. ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการให้กระบวนการเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในวิถีที่เผาผลาญอาหารในร่างกาย (metabolic pathway) ทั้งแบบสารปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ
5. ใช้กับเซลล์ของอวัยวะ (cell originals) เช่นคลอโรพลาสต์ (chloroplast) หรือเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเรียกว่าเซลล์ของอวัยวะที่ถูกตรึง (immobilized cell organelles)
6. ใช้ซ้ำและใช้ต่อเนื่องได้

2.9.2 ข้อเสียของการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง

1. เกิดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น
 2. การส่งผ่านออกซิเจนในถังปฏิกิริยา (reactor) ควบคุมลำบาก
 3. เกิดปัญหาการส่งผ่านมวลจากภายนอกสู่ภายในและขบวนการเคลื่อนที่
- การเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมี เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับตัวเร่งทางเคมีคือ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะปกติ และใช้พลังงานต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง ปัญหาการเกิดมลภาวะมีน้อย แต่เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียบางประการคือ ต้องการสารประกอบเชิงซ้อน เช่น โคแฟกเตอร์ต่างๆในการเกิดปฏิกิริยา และมีความคงทนน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี

การเปรียบเทียบกับเซลล์หรือเอนไซม์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงได้เปรียบกว่าเซลล์อิสระคือสามารถใช้เซลล์จำนวนมากๆ ศึกษาในถังปฏิกิริยาขนาดเล็กได้ ในการผลิตควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ สามารถแยกผลผลิตออกได้สะดวก ไม่มีปัญหาปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้มาก แต่การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ และอาจสูญเสียความสามารถระหว่างการตรึงได้

การเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึง การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่กระบวนการผลิตนั้นต้องใช้ระบบเอนไซม์หลายชนิด โคแฟกเตอร์ และสารพลังงานสูงอื่นๆ นอกจากนี้การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงไม่ต้องใช้กระบวนการสกัดและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เป็นผลให้เอนไซม์ยังคงมีประสิทธิภาพสูง ทำให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น และเป็นการลดค่าใช้จ่ายด้วย แต่การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งสามารถผลิตสารที่ไม่ต้องการออกมาบ้างยังผลผลิตได้ และเซลล์ที่ถูกตรึงยังถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของซับสเตรตและผลผลิต โดยสารที่ใช้ตรึงเซลล์ นอกจากนี้อาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตจากตัวเซลล์ หรือสารที่ถูกขับออกจากเซลล์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองเนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานานหรือเซลล์รั่วไหลเนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงมีการเจริญเพิ่มจำนวน

2.10 ข้อควรคำนึงเมื่อใช้เซลล์ที่ถูกตรึงกับอาหาร

2.10.1 ด้านเศรษฐกิจ

ในการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงต้นทุนส่วนใหญ่อยู่กับการตรึงและการทำให้บริสุทธิ์ แต่เทคนิคในการตรึงก็สามารถลดขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ได้ เช่น การใช้โครมาโตกราฟีแบบชอบพอ (affinity chromatography) เป็นต้น การตรึงเซลล์สำคัญอยู่ที่การเลือกใช้วัสดุคิบั ความคงตัวและความสามารถของเอนไซม์ที่ถูกตรึง ตลอดจนขณะการใช้เซลล์ติดต่อกันนั้นสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลผลิตมากน้อยเพียงใด

2.10.2 ความเหมาะสมของวัตถุดิบที่ตรึง

ส่วนประกอบของเซลล์ที่ถูกตรึงทุกชนิดต้องปลอดภัย และไม่ปนเปื้อนต่ออาหาร

2.10.3 ความสามารถในการเป็นตัวเร่ง

เอนไซม์หรือเซลล์ที่ผ่านการตรึงแล้วความสามารถจะลดลง ขึ้นอยู่กับเทคนิคการตรึง คุณสมบัติของสารที่ใช้เนื่องจากอาหารมีความแตกต่างทั้งส่วนประกอบและคุณลักษณะ ดังนั้นจึงไม่สามารถหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดมาใช้ในการตรึงเอนไซม์และเซลล์แต่ละชนิดได้

2.10.4 ความคงตัว

โดยทั่วไปความคงตัวของเซลล์ที่ถูกตรึงจะเพิ่มขึ้นจากเดิม และอายุการเก็บรักษาตามปกติจะนานกว่าเอนไซม์ที่ละลายน้ำ

2.10.5 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

เมื่อใช้เซลล์ที่ถูกตรึงกับอาหารติดต่อกันเป็นเวลานาน จะเกิดการเจริญของจุลินทรีย์

เนื่องจากซับสเตรตเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์ จะเจริญได้ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2526)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 อัลจิเนต (Alginate)

อัลจิเนตหรืออัลจินเป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Phaeophyceae) ในการผลิตอัลจิเนตเป็นอุตสาหกรรมสาหร่ายทะเลที่ใช้ ได้แก่แมคโครซิสทิส (Macrocystis pyrifera) มีอัลจินประมาณร้อยละ 14-19 , ลามินาเรีย คลัสโทนี (Laminaria cloustoni) และลามินาเรีย ดิจิตาตา (Laminaria digitata) มีอัลจินประมาณร้อยละ 15-40 ปริมาณที่พบจะขึ้นกับชนิดของสาหร่ายฤดูกาล และแหล่งที่สาหร่ายเจริญเติบโต สาหร่ายเหล่านี้พบได้ทั่วไปในโลก ประเทศที่ผลิตอัลจิเนตมาก คือ อเมริกา อังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน นอร์เวย์ แคนาดา และญี่ปุ่น

อัลจิเนตเป็น unbranched binary copolymer ของ 1,4-b-D-manuronic acid (M) และ L-guluronic acid (G) ในโมเลกุลประกอบด้วยโฮโมโพลิเมอร์รีเจียนส์ (homopolymeric regions) ของจี (G) และเอ็ม (M) ที่เรียกว่าจีบล็อก (G- blocks) และเอ็มบล็อก (M- blocks) ตามลำดับและยังมีบางส่วนของโมเลกุลเป็นเอ็มจีบล็อก (MG-blocks) สัดส่วนของโคโพลิเมอร์และโครงสร้างเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดสมบัติของอัลจิเนต เช่น ถ้าโพลิเมอร์มีจี (G) ในปริมาณที่สูงจะมี สมบัติเป็นเจลที่แข็งที่ความเข้มข้นของโลหะประจุบวกเฉพาะ (polyvalent metal cation) แต่ถ้าโพลิเมอร์มีเอ็ม (M) มีปริมาณสูงจะมีแนวโน้มที่จะเกิดเจลที่อ่อนนุ่ม และมีสภาวะในการเกิดเจล ที่กว้างกว่า อัลจิเนตที่ผลิตจำหน่ายเป็นการค้ามีหลายอนุพันธ์จึงมีสมบัติการละลายในน้ำที่แตกต่างกัน เช่น อนุพันธ์ ของเกลือแคลเซียม (Ca^{2+}), โพแทสเซียม (K^+), โซเดียม (Na^+), แอมโมเนียม (NH_4^+) และยังผลิตในรูปของโพรพริลีนไกลคอลอัลจิเนต (propylene glycol alginate) ซึ่งได้จากปฏิกิริยาของ กรดอัลจินิคกับโพรพริลีนออกไซด์ ภายใต้ความดัน อนุพันธ์เหล่านี้จะละลายได้ทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น ความหนืดของสารละลายอัลจิเนตที่ได้ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ความเข้มข้น น้ำหนักโมเลกุล และการมีโลหะประจุบวก

อัลจิเนตไม่ทุกชนิดมีคุณสมบัติเป็นเจลและจะเกิดเจลได้เมื่อทำปฏิกิริยากับเกลือแคลเซียม (Ca^{2+}) โครงสร้างของเจลมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ (egg box) โดยมีเกลือแคลเซียม (Ca^{2+}) เกาะอยู่กับสายโพลิเมอร์ คุณสมบัติที่ดีของอัลจิเนตคือ ทำให้เกิดเจลที่กลับเป็นสภาพเดิมไม่ได้ (Irreversible gel) ในน้ำเย็นเมื่อมีเกลือแคลเซียม (Ca^{2+}) รวมอยู่ด้วย ซึ่งคุณสมบัติในการเกิดเจลที่อุณหภูมิตำ่นี้ทำให้อัลจิเนต แตกต่างจากไฮโดรคอลลอยด์ที่ได้จากสาหร่ายสีแดง

อัลจิเนตถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดตั้งแต่ปี ค.ศ. 1920 โดยเติมในอาหารกระป๋อง บางชนิด ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด สารเพิ่มความคงตัว ทำให้มีล้นชั้นคงตัว สารทำให้เกิดเจล และสาร ชะงักการเกิดซินเนอริซิส (syneresis) ตัวอย่างเช่น

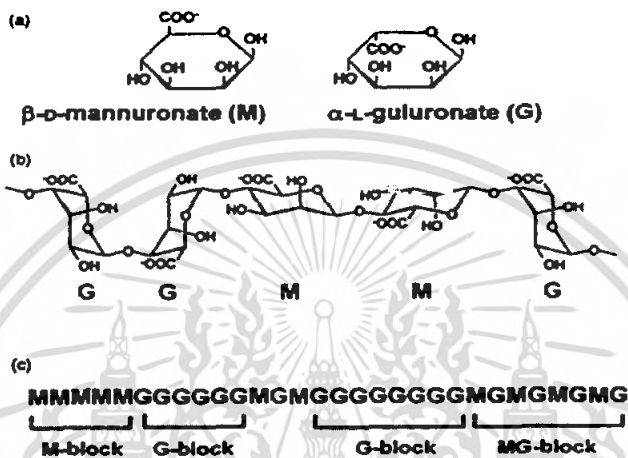
โพรพริลีนไกลคอลอัลจิเนต ใช้ในน้ำสลัดและเบียร์ เพราะมีความสามารถละลายได้สูงที่พีเอชต่ำ

โซเดียมอัลจิเนตใช้เป็นส่วนผสมในไส้พายมะนาวที่แช่เย็นเพื่อให้เกิดความคงตัวระหว่างการแช่แข็งและการละลาย (freeze-thaw)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

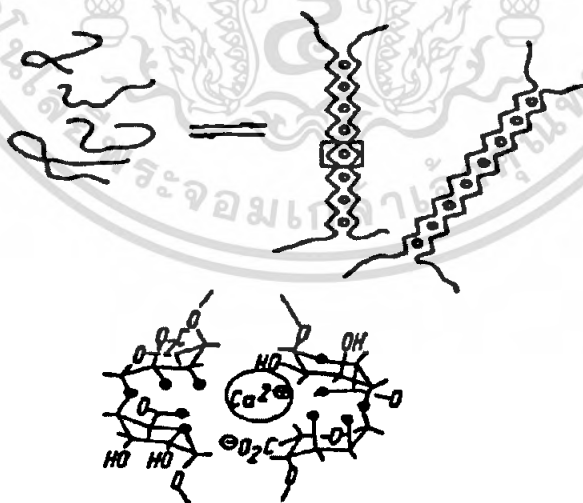
ใช้เคลือบผิวชิ้นเนื้อปลา ก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเผาผลาญระหว่างการแช่แข็ง (freeze burn) กับชิ้นเนื้อปลา

ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวให้กับไอศกรีม, ของหวานแช่เยือกแข็ง (frozen dessert), เซอร์เบต (sherbet), กระบวนการผลิตชีส และใช้เป็นเจลอัลจินเนตในการคืนสภาพโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ (alginate gel restructured products) เช่น อันเนียนริง (onion rings) และผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูปจากเนื้อปลา (shrimp-like fish products)



รูปที่ 2.11 แสดงโครงสร้างของอัลจินเนตชนิดต่างๆ

ที่มา : <http://www.Isbu.ac.uk/water/hylg.html>



รูปที่ 2.12 แสดงกลไกการเกิดเจลของแคลเซียมอัลจินเนต (Egg-box model)

ที่มา : <http://www.Isbu.ac.uk/water/hylg.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)

2.12.1 ทฤษฎีและความรู้ทั่วไป

เทคนิควิธีโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่นิยมกันอย่างมาก เพราะง่ายต่อการใช้งานและมีประสิทธิภาพสูง อีกทั้งไม่มีข้อจำกัดใดๆ ในเรื่องของการระเหยหรือความเสถียรของสารประกอบตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

ก่อนทศวรรษ 1970 วิธีการ Chromatographic method ได้นำมาใช้ในการทำงานของนักวิทยาศาสตร์น้อยมาก ต่อมาในช่วงทศวรรษ 1970 กระบวนการการแยกสารเคมีมีวิธีการต่างๆ มากมาย เช่น open-column chromatography , paper chromatography และ thin-layer chromatography แต่วิธีการเหล่านี้ก็ยังไม่เพียงพอต่อการหาปริมาณและการแยกสารประกอบที่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันได้ ในช่วงทศวรรษ 1970 นี้ วิธีการ Pressure liquid chromatography ได้นำมาใช้เพื่อลดช่วงเวลาการไหลผ่าน ดังนั้นการลดเวลาในการทำสารประกอบให้บริสุทธิ์ ถูกแยกโดย Column chromatography แต่อัตราการไหลไม่คงที่ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบกันว่า หากอัตราการไหลหรือความดันคงที่จะทำให้การแยกสารประกอบได้ผลที่ดีขึ้นหรือไม่ High pressure liquid chromatography ถูกพัฒนาขึ้นมาในกลางทศวรรษที่ 1970 และถูกพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็วพร้อม ๆ กันกับการพัฒนาอุปกรณ์ที่นำมาใช้ทำเป็น Column และมีการเชื่อมต่อกับตัวตรวจวัด (detector) ในปลายทศวรรษที่ 1970 วิธีการใหม่ๆ เช่น Reverse phase liquid chromatography มีความสามารถที่จะทำการแยกสารประกอบที่มีความคล้ายคลึงมากๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในช่วงทศวรรษที่ 1980 เทคนิควิธีโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง ได้นำมาใช้โดยทั่วไปเพื่อการแยกสารประกอบเคมี ซึ่งวิธีการนี้ทำให้การแยก การจำแนก การทำให้บริสุทธิ์ และการหาปริมาณของสารประกอบได้ดีกว่าวิธีอื่นที่กล่าวมา มีระบบคอมพิวเตอร์และระบบกลไกอัตโนมัติทำให้เพิ่มความสะดวกต่อการใช้เทคนิควิธีโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวความดันสูงมากขึ้น ชนิดของ Column ก็ดีกว่า Column ที่ได้ผลผลิตขึ้นได้แก่ Micro-Column, Affinity Column

ทศวรรษที่ผ่านมา มีการดำเนินงานด้านการพัฒนา Micro-Column และ Column ชนิดพิเศษอื่นๆ กันอย่างกว้างขวาง โดยทั่วไปแล้ว HPLC column สามารถวัดความยาวได้เป็นหลักร้อยละในหน่วยมิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร Micro-Column หรือ Capillary Column โดยทั่วไป มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 3 -200 ไมโครเมตร (1/1000 มิลลิเมตร) ส่วน Fast HPLC จะใช้ Column ที่สั้นกว่าซึ่งมีความยาวของ Column ประมาณ 30 มิลลิเมตร และภายใน Column จะบรรจุด้วยเศษชิ้นส่วน (particles) ที่เล็กกว่า

ในปัจจุบันนี้มีชนิดของ Column ให้เลือกมากมาย เพื่อความเหมาะสมในการแยกสารประกอบเคมีและตัวตรวจวัดมีหลายชนิดเช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่าเทคนิควิธีโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวความดันสูงเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยในการตัดสินใจในงานวิจัยทางด้าน Biotechnological, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biomedical และ Biochemical ทางด้าน Pharmaceutical industry มีการใช้ประมาณร้อยละ 50 ของผู้ใช้ HPLC ทั้งหมด แต่ปัจจุบันนี้ HPLC ได้ถูกนำมาใช้ทางด้านพลังงาน เครื่องสำอางและความงาม อาหารและอุตสาหกรรมสิ่งแวดล้อมอีกด้วย



รูปที่ 2.13 แสดงเครื่อง HPLC รุ่น Shimadzu
ที่มา : www.rdi.ku.ac.th/cl/images/instru/HPLC_Afla.jpg

2.12.2 ทฤษฎีการปฏิบัติ

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

2) Mobile phase ใน HPLC หมายถึง ตัวทำละลายที่จะใช้กับ column หรือ stationary phase อย่างต่อเนื่อง mobile phase เปรียบเสมือนตัวพาสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสารละลายตัวอย่างถูกฉีดเข้าไปยัง mobile phase ผ่านไปยัง injector port สารละลายตัวอย่างจะไหลผ่าน column ไปพร้อม ๆ กันกับ mobile phase องค์ประกอบของสารละลายที่แพร่ผ่านไปจะทำปฏิกิริยากันแบบ non-covalent กับ column ปฏิกิริยาทางเคมีของ mobile phase บวกตัวอย่าง กับ column เป็นการควบคุมการแพร่และการแยกตัวขององค์ประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างที่มีปฏิกิริยาที่รุนแรงกับ mobile phase มากกว่า stationary phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกจาก column เร็วกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และมี retention time สั้นกว่า แต่ถ้าตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงกับ stationary phase มากกว่า mobile phase จะทำให้ตัวอย่างหลุดออกจาก column ได้ช้ากว่า และมี retention time นานกว่า mobile phase สามารถเปลี่ยนได้เพื่อควบคุมการเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่าง และ stationary phase ซึ่ง mobile phase มีหลายชนิดได้แก่ isocratic, gradient และ polytypic

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

4) HPLC pumps มีหลายชนิดสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC เช่น reciprocating piston pumps ประกอบด้วยมอเตอร์เล็กๆสำหรับดันลูกสูบให้เคลื่อนที่ไปหน้า-หลังอย่างรวดเร็ว มีห้อง hydraulic ปริมาตร 35-400 ไมโครลิตร จังหวะที่ลูกสูบถูกดึงมาด้านหลัง the separate column vale จะถูกปิด แล้วลูกสูบจะดูดตัวทำละลายจากที่เก็บ mobile phase ในจังหวะที่ลูกสูบดันไปข้างหน้า pump จะดันสารตัวทำละลายออกสู่ column จากที่เก็บ ช่วงของอัตราการไหลสามารถเปลี่ยนได้โดยการเปลี่ยนจังหวะปริมาตรของลูกสูบแต่ละรอบ หรือเปลี่ยนจังหวะความถี่ pump ชนิดที่มีสองหรือสามหัวประกอบด้วยห้องสูบเหมือนกัน ซึ่งทำให้มีมุมต่างกัน 180 หรือ 120 องศา ระบบ pump นี้มีการปั๊มได้อย่างสม่ำเสมอ เพราะว่าเมื่อปั๊มรอบหนึ่งเต็มปั๊มรอบต่อไปจะส่งรอบต่อ

5) ตัวตรวจวัด(detector) สำหรับ HPLC คือ องค์ประกอบหนึ่งที่ตอบสนองต่อสารประกอบตัวอย่างที่หลุดออกมาและให้จุดสูงสุดของกราฟ(peak)ปรากฏบน chromatograph ในภายหลังตัวตรวจวัด จะอยู่ตรงตำแหน่งที่ถัดจาก stationary phase เพื่อคอยตรวจสอบสารประกอบที่หลุดออกมาจากcolumn ความกว้างและความสูงของจุดสูงสุดของกราฟ(peak)โดยทั่วไปสามารถปรับให้มีความหยาบและความละเอียดได้ และพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบก็สามารถควบคุมได้

6) Degaser เป็นอุปกรณ์ที่สำคัญสำหรับทำลายแก๊สที่เกิดขึ้นใน mobile phase เพราะแก๊สที่เกิดขึ้นมีผลต่อการ detect และทำให้ column เสียหาย

2.12.3 การประยุกต์ใช้ HPLC

1) Preparative HPLC หมายถึงการใช้ HPLC ในการทำสารประกอบให้บริสุทธิ์ แยกเป็นสารเดี่ยว ๆ ที่สำคัญคือระดับความบริสุทธิ์ของสารละลาย ซึ่งเป็นจำนวนของสารประกอบที่ถูกผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้นต่อหน่วยเวลา สิ่งที่จะได้จากการวิเคราะห์ HPLC คือ ข้อมูลเกี่ยวกับ สารประกอบตัวอย่าง ซึ่งข้อมูลเหล่านั้นได้แก่ชนิดปริมาณและการแยกออกจากกันของสารประกอบ

2) Chemical Separations ในการแยกสารเคมีสามารถใช้ HPLC ทำได้โดยอาศัยประโยชน์จากคุณสมบัติของสารประกอบที่มีอัตราการแพร่ภายใน Column และ mobile phase ที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถแยกสารประกอบเคมีหลายๆชนิดออกจากกันได้และในการใช้ HPLC ในการแยกสารประกอบเคมีนี้สิ่งที่เป็นตัวควบคุมหรือมีอิทธิพลต่อการแยกของสารเคมีคือการเลือกใช้ stationary phase และ mobile phase

3) Purification หมายถึง ขบวนการแยกหรือขบวนการสกัดสารประกอบเคมีที่เราต้องการออกจากสารประกอบอื่นหรือสิ่งเจือปนต่าง ๆ สารประกอบแต่ละตัวจะมีลักษณะของ peak ภายใต้งี๋นไขของ chromatographic ที่จะสามารถรับรู้ได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับว่าสารประกอบที่จะทำการแยกคืออะไร และสัมพันธ์กับสารตัวอย่างอย่างไร chromatographer อาจต้องเลือกเงี๋นไข เลือกคุณสมบัติของ mobile phase ติดตามกระบวนการแยก ตลอดจนกระทั่งสารประกอบที่ต้องการมีการรวมกันและหลุดออกจาก stationary phase การแพร่ของสารประกอบและสารปนเปื้อนอื่น ๆ จะแพร่ผ่าน column แตกต่างกันไปที่จะได้สารประกอบที่ต้องการมีความบริสุทธิ์ได้

4) Identification การจำแนกชนิดของสารประกอบโดยใช้ HPLC นั้น เป็นขั้นตอนหนึ่งของการตรวจสอบด้วย HPLC ในการจำแนกสารประกอบใด ๆ ก็ตาม สิ่งที่เราควรเลือกเป็นอันดับแรกคือ detector เมื่อเลือกมาแล้วมาติดตั้งไว้ในตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะทำการตรวจสอบ พารามิเตอร์ของขบวนการตรวจสอบนี้ จะให้จุดสูงสุดของกราฟ (peak) ของสารประกอบตัวอย่างอย่างชัดเจน ซึ่งสังเกตได้จากจุดสูงสุดของกราฟ (peak) ที่ปรากฏบน chromatograph การจำแนกจุดสูงสุดของกราฟ (peak) แต่ละกราฟจะใช้ retention time และใช้จุดสูงสุดของกราฟ (peak) ที่แยกออกจากจุดสูงสุดของกราฟ (peak) ที่ไม่ต้องการ ซึ่งขบวนการตรวจสอบจะแสดงออกมา การเปลี่ยนแปลง retention time ของสารประกอบ พารามิเตอร์หลายๆตัวสามารถตรวจจับได้ การจำแนกชนิดของสารประกอบโดยใช้ HPLC กระทำได้โดยการค้นคว้าจากหนังสือ, วารสารและการลองผิดลองถูก ตัวอย่างของสารประกอบที่เราทราบแล้วว่าเป็นอะไรจะเป็นประโยชน์ต่อการจำแนกชนิดของสารประกอบที่เรายังไม่ทราบได้ การจำแนกชนิดของสารประกอบเพื่อยืนยันความถูกต้องนั้นควรใช้วิธีการตรวจสอบตั้งแต่ 2 วิธีขึ้นไปประกอบกัน

5) Quantification การหาปริมาณของสารประกอบโดยใช้ HPLC เป็นกระบวนการเปรียบเทียบสารประกอบที่ไม่ทราบความเข้มข้นกับสารละลายที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน มีวิธีทำคือ ฉีดชุดของสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนเข้าไปใน HPLC เพื่อทำการตรวจสอบ chromatograph จะแสดงจุดสูงสุดของกราฟ (peak) ของชุดของข้อมูลที่สำคัญกับความเข้มข้นของสารละลายที่ฉีดเข้าไปใช้สูตรการหาพื้นที่รูปสามเหลี่ยม คำนวณหาพื้นที่ใต้จุดสูงสุดของกราฟ (peak) แต่ละ กราฟนำข้อมูลมาทำเป็น calibration curve โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสามารถใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทำได้ เช่น โปรแกรม Excel หรือ Cricket graph จากโปรแกรมสร้างกราฟจะได้กราฟเส้นตรง พร้อมสมการเส้นตรง $y = mx + b$ เรียกว่าสมการ calibration curve สมการเส้นตรงนี้สามารถนำมาใช้ในการหาตัวอย่างที่นักวิทยาศาสตร์ฉีดตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้นเข้าไปใน HPLC ให้เป็น แกน X แล้วจุดสูงสุดของกราฟ(peak) ที่ปรากฏบน chromatograph ให้เป็นแกน Y ค่า Y นี้ได้มาจากสมการเส้นตรง calibration ดังนั้นจึงสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างได้โดยการแก้สมการหาค่า X



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท PYEX^R

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYEX^R

คีมวัดแก้ว

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (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 Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Hirayama รุ่น LIBROR EB – 40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A200 S

เครื่องวัดพีเอช ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องเขย่าของ บริษัท Gallenkamp

เครื่องอบร้อนของ บริษัท Binder

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

บีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท PYEX^R

ปิเปต (pipette)

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

ปั๊ม Peristaltic pump ของบริษัท Heidolph รุ่น PD 5201

สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 cm. ของบริษัท Cole – Parmer

Instrument company รุ่น Tygon tubing 2-stop

หลอดทดสอบ (Test tube) ของบริษัท PYEX^R

3.2 สารเคมี

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
 แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)
 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)
 ไฮโดรคลอริก (HCL)
 โซเดียมอัลจิเนต
 ยีสต์สกัด (yeast extract)
 เปปโตน (peptone)
 กลูโคส (D-glucose)
 แลคโตส (D-lactose)
 ซูโครส (sucrose)
 น้ำตาลทราย
 น้ำกลั่น

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแล้วลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอ็มอาร์เอส (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันเพื่อปิดปากหลอดทดลองให้แน่น และเก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติก แล้วจึงเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อจำนวน 2 หลบ ลงในอาหารเหลว (MRS broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620

นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Senthuran และคณะ, 1999)

3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.4.1 ขั้นตอนการตรึงเซลล์

ขั้นตอนการตรึงเซลล์ มีดังนี้ (ประยุกต์จาก สุรีย์ ทองวณิชนิม, 2543)

3.4.1.1 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 3.3.2 ปริมาตร 8.75 มิลลิลิตร (ร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ในการหมักกรดแลคติก) ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง

3.4.1.2 นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันจนเกิดเป็นเซลล์แขวนลอย จากนั้นจึงเทลงในสารละลายโซเดียมอัลจินेट ผันแปรความเข้มข้นตามชุดการวิจัย ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วที่ทำกรฆ่าเชื้อแล้วคนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.4.1.3 นำสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในตามชุดการวิจัยที่จะศึกษาต่อเข้ากับเครื่อง Peristaltic pump แล้วให้สายข้างหนึ่งจุ่มลงในสารละลายโซเดียมอัลจินेटที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกับเซลล์แขวนลอยซึ่งวางอยู่บน stirrer ตลอดการตรึงเซลล์ (Mandel และคณะ, 2005) ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งจุ่มลงในพลาสติกขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ (Mandel และคณะ, 2005) โดยมีระยะห่างระหว่างปลายสายยางกับผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 15 เซนติเมตร (ศิริประภา, 2550) จากนั้นเปิดเครื่อง Peristaltic pump ให้เครื่องทำงานที่อัตราการไหล 7 มิลลิลิตรต่อนาที

3.4.1.4 หลังจากดูดสารละลายโซเดียมอัลจินेटที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกับเซลล์แขวนลอยลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์หมด ให้เก็บเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการวิจัยต่อไป

หมายเหตุ : ทุกขั้นตอนของการตรึงเซลล์ ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

3.4.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินेट

3.4.2.1 สูตรอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) (Altaf, 2005) ประกอบด้วย

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตเน (Peptone)	10	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

หมายเหตุ : กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน

เตรียมอาหารสังเคราะห์ตามตารางที่ 3.1 เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ

สูตรอาหาร	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4
สารเคมี	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)
Yeast extract	5	5	5	5
Peptone	10	10	10	10
Glucose	40	-	-	-
Lactose	-	40	-	-
Sucrose	-	-	40	-
น้ำตาลทราย	-	-	-	40
K_2HPO_4	1	1	1	1
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.003	0.003	0.003	0.003
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	0.1	0.1	0.1

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่เติม

: สูตรที่ 1 เป็นชุดควบคุม

: แหล่งคาร์บอนที่ศึกษาประกอบด้วย กลูโคส แลคโตส ซูโครส และน้ำตาลทราย โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ดังตารางที่ 3.1

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

- ละลายน้ำตาลกลูโคส แลคโตส ซูโครสและน้ำตาลทรายในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่น และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2.0 (จกมด, 2550) ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 (Idris และ Suzuna, 2006) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ผสมส่วนผสมทั้งสองโดยวิธีปลอดเชื้อ ในตู้ปลอดเชื้อและทำการครึ่งเซลล์ตามข้อ 3.4.1

นำเมล็ดเจดที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและเติมลงในอาหารที่เตรียมไว้ทั้ง 5 สูตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่งเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุก 12 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 120 เพื่อหาปริมาณกรดแลคติกโดยเครื่อง HPLC (กรัมต่อลิตร) ค่าพีเอช และวัดปริมาณน้ำตาลโดยวิธีวิเคราะห์ของ Dubolis (ภาคผนวก ข)

3.4.3 ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

เลือกแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุดจากข้อ 3.4.2 โดยผันแปรความเข้มข้น ดังนี้

สูตรที่ 1 : ใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 2 : ใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 : ใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 : ใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

นำเซลล์ที่ถูกครึ่งด้วยแคลเซียมอัลจินเตตามวิธีการในข้อ 3.4.1 ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์แต่ละสูตรปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง (จกมล, 2550) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุก 12 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 120 เพื่อหาปริมาณกรดแลคติกโดยเครื่อง HPLC (กรัมต่อลิตร) ค่าพีเอช และวัดปริมาณน้ำตาลโดยวิธีวิเคราะห์ของ Dubolis (ภาคผนวก ข)

3.4.4 ศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกครึ่งด้วยแคลเซียมอัลจินเต ในระดับพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร

เลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกที่ดีที่สุดจากข้อ 3.4.3 และสถานะที่เหมาะสมต่างๆที่ได้จากการวิจัยร่วมกันอีก 3 กลุ่ม

นำมาทำการหมักเพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับพลาสติกขนาด 2 ลิตรและในถังหมักขนาด 2 ลิตร และศึกษาผลผลิตกรดแลคติกที่ได้ และในขณะเดียวกัน มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ในปริมาณร้อยละ 2.0 (Ohkouchi, 2006) โดยทำการเตรียมอาหารสังเคราะห์ที่จะใช้เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในถังหมักและในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ซึ่งแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ละลายน้ำตาลกลูโคสในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่นตามสูตรอาหาร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 จากนั้นนำอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมเสร็จแล้วเทลงในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตรและถึงหมัก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 35 นาที

เทน้ำตาลกลูโคสที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในถึงหมักโดยวิธีปลอดเชื้อ และเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ของปริมาณอาหารในถึงหมักและทำการตรึงเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3.5 นำเม็ดเจลที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและเติมลงในถึงหมักด้วยวิธีปลอดเชื้อ โดยให้มีปริมาณอาหารรวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 70 ของปริมาณถึงหมัก และควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.5 (Idris และ Suzuna, 2006) ความเร็วรอบของไบพัตควนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที(จกมล, 2550) ใช้เวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง

เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุก 12 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 120 เพื่อหาปริมาณกรดแลคติก และวัดปริมาณน้ำตาลโดยวิธีวิเคราะห์ของ Dubolis (ภาคผนวก ข) (กรัมต่อลิตร) ปริมาณผลผลิตกรดแลคติก(กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น) และอัตราการผลิตต่อชั่วโมง (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง) และศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ถูกตรึงโดยวิธี Total plate count (ภาคผนวก ข) และการหมักกรดแลคติกในระดับพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

3.5 การวิเคราะห์ผล

- 1) วัดพีเอชทันทีที่เก็บตัวอย่างในแต่ละชั่วโมง โดยเครื่องวัดพีเอช
- 2) วัดปริมาณกรดแลคติกด้วยเครื่อง 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
- 3) วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริกโดยวิธีของ Dubois (ภาคผนวก ข)
- 4) วัดการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ถูกตรึงโดยวิธี Total plate count (ภาคผนวก ข)

3.6 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลในหัวข้อ 3.4.2 และ 3.4.3 วางแผนการวิจัยแบบ CRD (Completely Randomized Design) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 14.0 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range test ทำการวิจัย 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ผลในหัวข้อ 3.4.4 วางแผนการวิจัยแบบ Independent Samples Test เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ โดยทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในการพิจารณาถึงการมีนัยสำคัญทางสถิติว่ามีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

4.1.1 ผลการศึกษาปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

การศึกษาปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 4 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทราย พบว่าน้ำตาลกลูโคสสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด คือ 22.25 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 รองลงมาน้ำตาลแลคโตสผลิตกรดแลคติกได้ 18.68 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 ในขณะที่น้ำตาลทรายผลิตกรดแลคติกได้ 16.02 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 84 น้ำตาลซูโครสผลิตกรดแลคติกได้ 9.99 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 ตามลำดับ เมื่อนำผลการวิจัยมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าทั้งน้ำตาลกลูโคส แลคโตส ซูโครส และน้ำตาลทรายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 ซึ่งการใช้น้ำตาลกลูโคสจะให้ค่าปริมาณกรดสูงสุด ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับการวิจัยของเสกสรรค์ และ อรรถพันธ์ (2549) ซึ่งศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 พบว่าการผลิตกรดแลคติกมีปริมาณสูงเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น

นอกจากนี้ ยังสอดคล้องกับการวิจัยของ Kadam และคณะ (2005) ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrukii* NCIM 2365 ประกอบด้วย กลูโคส ฟรุคโตส แลคโตส และ กาแลคโตส พบว่า กลูโคสสามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ฟรุคโตส กาแลคโตส และ แลคโตส ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำน้ำตาลกลูโคสมาทำการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกต่อไป

4.1.2 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

จากการศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันทั้ง 4 สูตร โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบต่างกัน 4 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทราย โดยในแต่ละสูตรจะมีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ 40 กรัมต่อลิตร และในระหว่างกระบวนการหมัก เชื้อจะใช้น้ำตาลในกระบวนการเจริญเติบโตและการสร้างกรดแลคติก ซึ่งเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้ความเข้มข้นหรือปริมาณน้ำตาลลดลง และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 120 พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดเปลี่ยนแปลงไปดังนี้ น้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 0.36 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 99.09 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ณ ชั่วโมงที่ 60 น้ำตาลแลคโตสลดลงเหลือ 0.85 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 97.90 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ณ ชั่วโมงที่ 96 น้ำตาลซูโครสลดลงเหลือ 1.18 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 97.05 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ณ ชั่วโมงที่ 60 น้ำตาลทรายลดลงเหลือ 0.68 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 98.30 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ณ ชั่วโมงที่ 84 ดังแสดงในรูปที่ 4.2

จะเห็นได้ว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกในปริมาณมากที่สุด สังเกตจากน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปมีปริมาณเหลือต่ำที่สุดเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครส แลคโตสและน้ำตาลทราย ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของเสกสรรค์และอรุณพันธ์ (2549) ซึ่งการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 พบว่ากลูโคสมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือต่ำสุดในการผลิตกรดแลคติก เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลชนิดอื่นเป็นสารตั้งต้น

4.1.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

จากการการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินต ที่มีสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ทำการหมักที่สภาวะนิ่ง (จกมล, 2550) พบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตจะมีการผลิตกรดแลคติก ทำให้ค่าพีเอชของอาหารทุกสูตรลดลงเมื่อเทียบกับค่าพีเอชเริ่มต้น

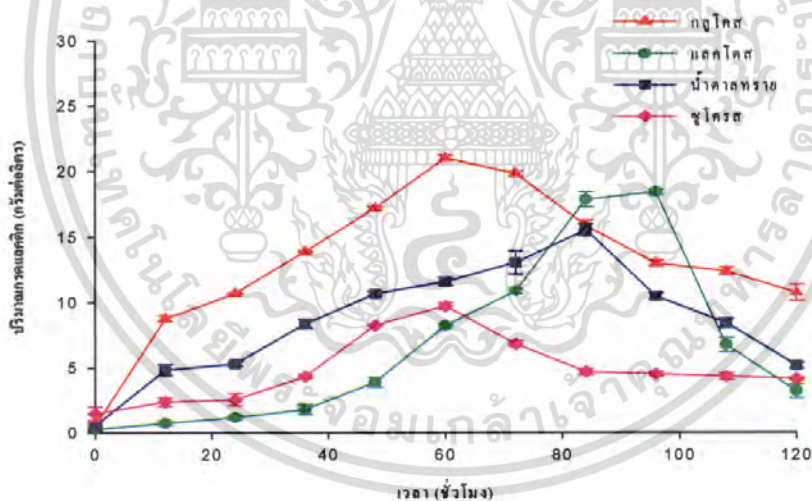
โดยจากผลการวิจัยพบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นในกระบวนการหมักเท่ากับ 6.5 โดยที่ค่าพีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 60 ส่งผลให้มีการผลิตกรดแลคติกมากขึ้น หลังจากนั้นค่าพีเอชจะลดลงอย่างช้าๆ จนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาในการหมัก ชั่วโมงที่ 120 ซึ่งค่าพีเอชต่ำสุดของอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของFu และ Mathew (1999) ศึกษาอิทธิพลของพีเอช สารตั้งต้นและปริมาณออกซิเจนในการผลิตกรดแลคติก จากน้ำตาลแลคโตส โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมของเชื้อในการผลิตกรดแลคติกอยู่ในช่วง 5-6 และการเลี้ยงแบบไม่มีออกซิเจน (anaerobic) จะให้ผลผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่าการเลี้ยงแบบมีออกซิเจน(aerobic) 2.3 เท่า

นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Idris และ Suzana (2006) ได้ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสัปปะรด โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วและให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการวิจัยของ John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอชที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* จากมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติก

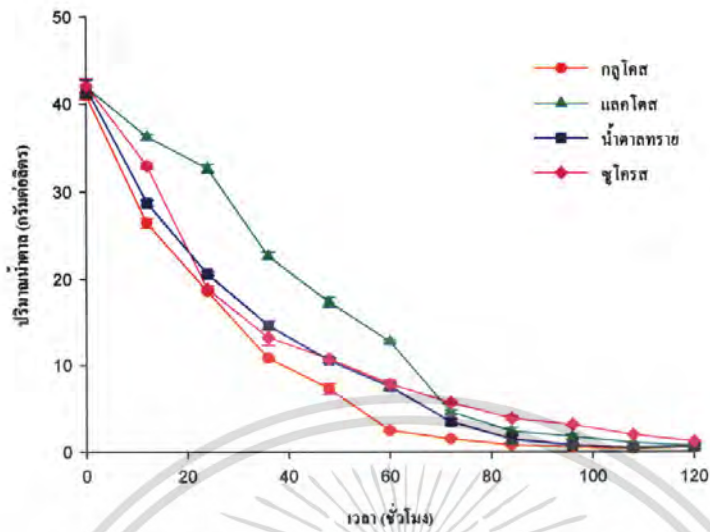
ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินต

แหล่งคาร์บอน	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	พีเอช	ปริมาณกรด (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลที่ใช้ไป (ร้อยละ)
น้ำตาลกลูโคส	60	3.8	22.25 ^a	0.36	99.09
น้ำตาลแลคโตส	96	4.1	18.68 ^b	0.85	97.90
น้ำตาลซูโครส	60	4.8	9.99 ^d	1.18	97.05
น้ำตาลทราย	84	4.3	16.02 ^c	0.68	98.30

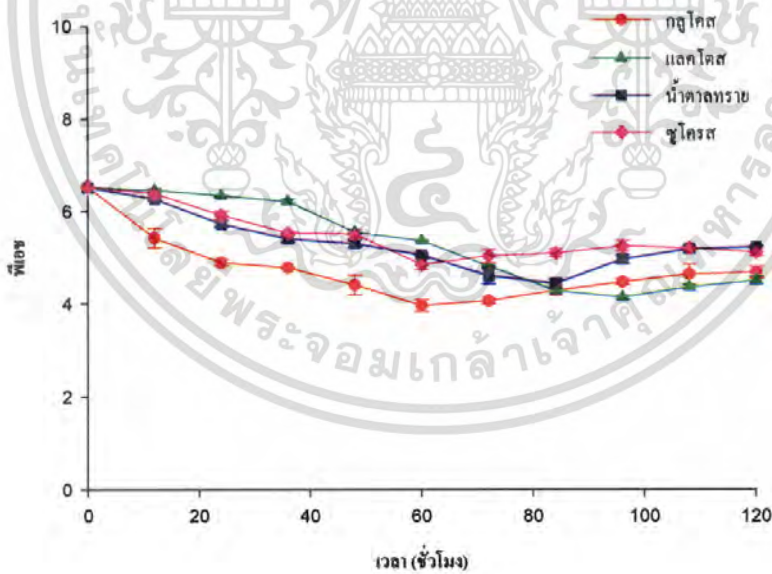


รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินตในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินตในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน



รูปที่ 4.3 แสดงผลการการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินตในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

4.2.1 ผลการศึกษาปริมาณกรดแลกติก ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆกัน

การศึกษาปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าที่น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้ 19.24 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้ 20.89 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้ 28.65 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้ 25.02 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.4 และเมื่อนำผลการวิจัยมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับทุกระดับความเข้มข้น (ภาคผนวก ก) ซึ่งเห็นได้ว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุด เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตกรดแลกติก และที่ระดับความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณความเข้มข้นที่ผลิตกรดแลกติกได้รองลงมา เนื่องจากปริมาณน้ำตาลที่มากเกินไป ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (substrate inhibition) จึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก (Karin และคณะ, 1999) ส่วนน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20 และ 30 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณความเข้มข้นที่ผลิตกรดแลกติกได้น้อย เนื่องจากปริมาณน้ำตาลมีน้อยเกินไป จึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ohkouchi และ Inoue (2006) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยใช้เศษอาหารสดเป็นสารตั้งต้นร่วมกับน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และผลที่ออกมาคือช่วงความเข้มข้นกลูโคสที่ 40-50 กรัมต่อลิตร จะเป็นช่วงที่ผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด

4.2.2 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

จากการวิจัยโดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในระหว่างกระบวนการหมัก เชื้อจะใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตและการสร้างกรดแลกติก ทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักพบว่า

น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรมีปริมาณน้ำตาลที่ลดลงเหลือ 0.25 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 98.75 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 0.65 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 97.83 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 0.36 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 99.10 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป และที่ระดับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 1.36 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 97.28 ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งจะเห็นได้ว่าน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เชื่อมีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตและผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตกรดแลคติกโดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นอื่นเป็นสารตั้งต้น ซึ่งนี้สอดคล้องกับการวิจัยของเสกสรรค์ และ อรรถพันธ์ (2549) ซึ่งการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 พบว่ากลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือต่ำสุดในการผลิตกรดแลคติกและผลิตกรดแลคติกได้มากที่สุด

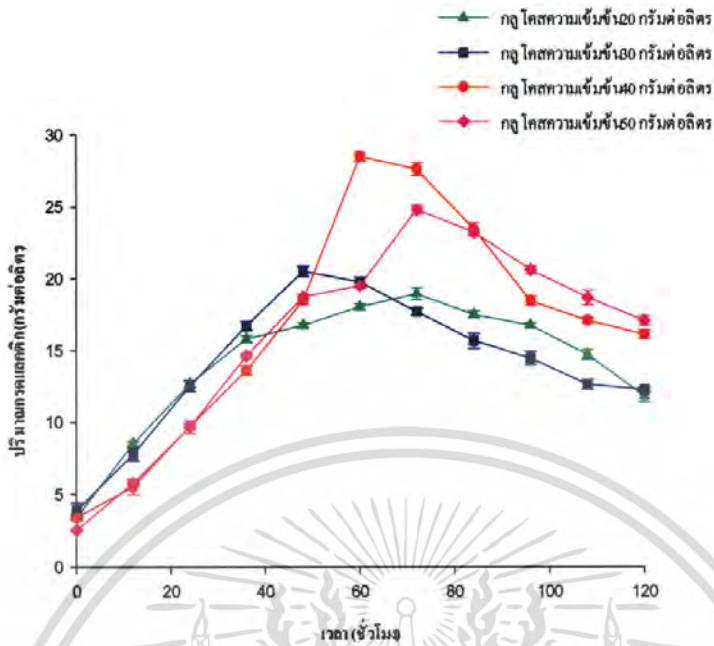
4.2.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการวิจัยพบว่า การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 4 สูตรมีแนวโน้มใกล้เคียงกันคือ ในช่วงเวลาที่ 0 (เริ่มต้นกระบวนการหมัก) ค่าพีเอชของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร คือ 6.5 และค่าพีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งถึงช่วงเวลาที่ 60 และหลังจากนั้นค่าพีเอช จะมีการเปลี่ยนแปลงไปอีกเพียงเล็กน้อย โดยมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงพีเอชระหว่าง 3.8 ถึง 4.8 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชที่ต่ำสุดนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากการที่เชื้อผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณที่สูงที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติก

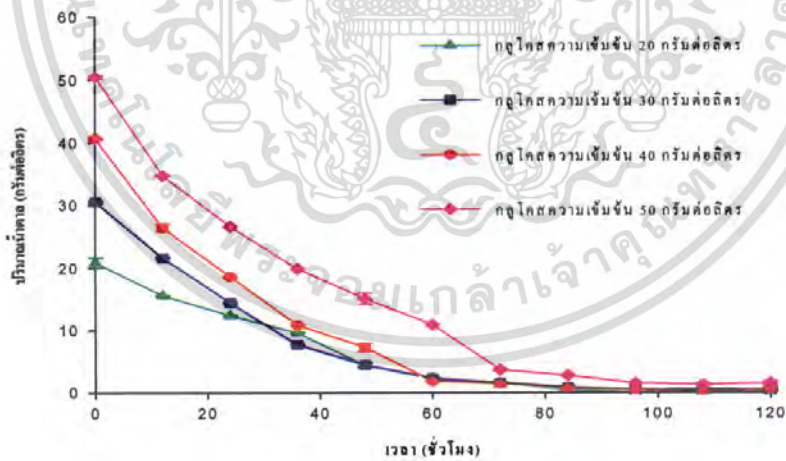
ตารางที่ 4.2 แสดงน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกเลี้ยงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

ความเข้มข้น น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ระยะ การหมัก (ชั่วโมง)	พีเอช	ปริมาณกรด (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (ร้อยละ)
20	72	4.8	19.24 ^d	0.25	98.75
30	48	4.7	20.89 ^c	0.65	97.83
40	60	3.8	28.65 ^a	0.36	99.10
50	72	3.9	25.02 ^b	1.36	97.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่หรือใช้ประโยชน์ทางอื่น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

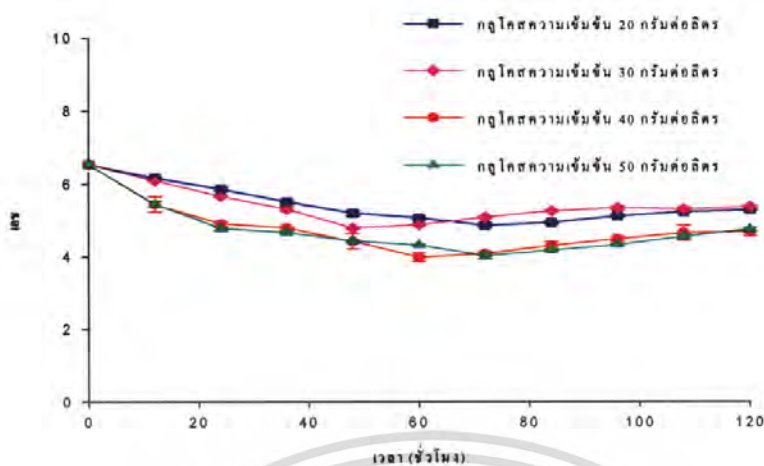


รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.5 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

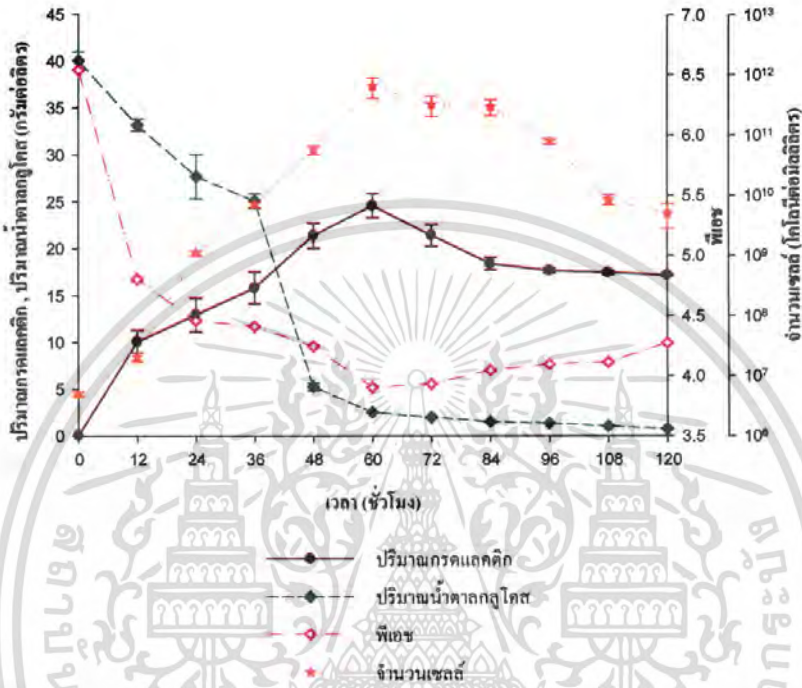


รูปที่ 4.6 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

4.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0 ในการตรึงเซลล์ ทำการหมักเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงในอาหารสังเคราะห์ปริมาตร 175 มิลลิลิตร โดยมีน้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตรผสมกับเปปโตน 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน (Altaf, 2005) พร้อมทั้งมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2.0 เป็นสารควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง (จกมล, 2550) พบว่าได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด 24.54 กรัมต่อลิตร โดยมีการใช้น้ำตาลกลูโคส 39.23 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ 98.08 จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร มีพีเอชต่ำสุด 3.8 ณ ชั่วโมงที่ 60 หลังจากนั้นค่าพีเอชจะลดลงอย่างช้าๆ จนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการหมักในชั่วโมงที่ 120 และการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2.0 ในกระบวนการหมัก จะช่วยควบคุมค่าพีเอชให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ (จกมล, 2550) และจากการศึกษาการเจริญของเชื้อ โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ

5.0 ของปริมาณอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการหมักกรดแลคติก พบว่าจำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 60 หลังจากนั้นจำนวนเซลล์จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย จนกระทั่งในชั่วโมงที่ 84 และจำนวนเซลล์จะเริ่มลดลงไปจนถึงชั่วโมงที่ 120 เนื่องจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสใกล้หมด ทำให้การเจริญของเชื้อและการผลิตกรดแลคติกลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาล พีเอช และจำนวนเซลล์จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดย *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

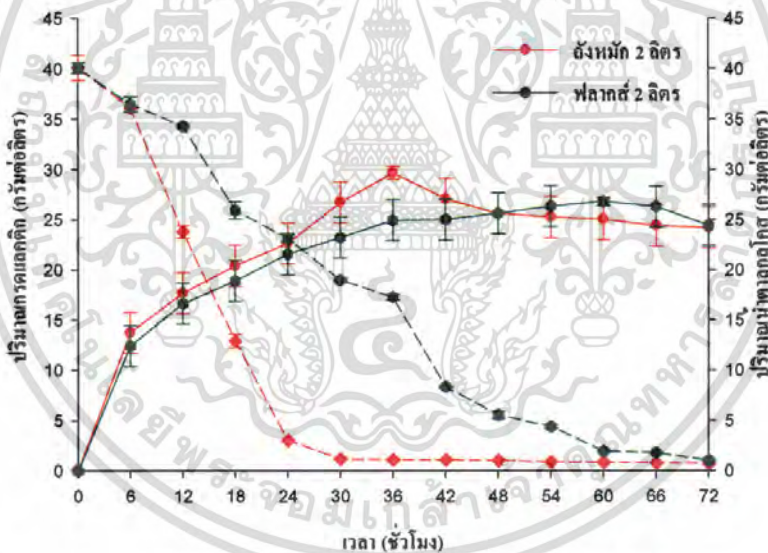
จากรูปที่ 4.7 จะเห็นได้ว่าการเจริญของเชื้อมีความสัมพันธ์กับการผลิตกรดแลคติก โดยมีเซลล์เริ่มต้นจำนวน 4.8×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และเพิ่มจำนวนเป็น 6.2×10^{11} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 60 เมื่อเชื้อมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ปริมาณกรดแลคติกก็จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงในช่วงที่เชื้อเพิ่มจำนวนเซลล์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า เชื้อจะมีการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโต

จากการผลการวิจัยจึงกล่าวได้ว่า การผลิตกรดแลคติกขึ้นอยู่กับ การเจริญเติบโตของเชื้อหรือจำนวนเซลล์ และการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์จะช่วยส่งเสริมการผลิตกรดแลคติก ซึ่งแสดงว่าระหว่างปริมาณกรดแลคติกและเซลล์มีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นในการผลิตกรดแลคติกทางกระบวนการชีวภาพจึงขึ้นอยู่กับ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

4.4 ผลการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร

4.4.1 ผลการศึกษาปริมาณกรดแลคติกที่มีการเปลี่ยนแปลง โดยการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร

จากการศึกษาศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตรและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2.0 ในการตรึงเซลล์ทำการหมักเชื้อในอาหารสังเคราะห์ปริมาตร 1,400 มิลลิลิตร ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตรผสมกับเปปโตน 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน(Altaf, 2005) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้น 6.5 พร้อมทั้งมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2.0 เป็นสารควบคุมค่าพีเอช ทำการหมักในสภาวะนิ่ง (จกมล, 2550) ส่วนในถังหมักมีการกวนด้วยอัตราเร็วของใบพัด 100 รอบต่อนาที(ศิริประภา, 2550) และควบคุมค่าพีเอชให้คงที่ที่ 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดแลคติก และการใช้น้ำตาลกลูโคส จากการหมักเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.8 พบว่าในถังหมักมีการผลิตกรดแลคติกได้ 29.57 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 36 และเมื่อนำมาคำนวณผลผลิตกรดแลคติกและอัตราการผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 0.74 กรัมต่อกรัม สารตั้งต้น และ 0.82 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ

การผลิตกรดแลคติกในพลาสติกสามารถผลิตได้ 26.80 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 และเมื่อนำมาคำนวณผลผลิตกรดแลคติกและอัตราการผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 0.67 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น และ 0.45 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าในถังหมักสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งสูงกว่าร้อยละ 21.53 เมื่อเทียบกับการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่ชั่วโมงเดียวกัน (ที่ชั่วโมง 36 ปริมาณกรดแลคติกในพลาสติกเท่ากับ 24.93 กรัมต่อลิตร) และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จะเห็นได้ว่าปริมาณกรดแลคติกที่สามารถผลิตได้สูงสุดและผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดที่ได้จากการผลิตใน พลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.02 โดยการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ในสภาวะนิ่ง และถังหมักขนาด 2 ลิตร จะได้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุด 66.99 และร้อยละ 71.57 ตามลำดับ ซึ่งผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดใน พลาสติกขนาด 2 ลิตร จะต่ำกว่าการผลิตในถังหมักร้อยละ 4.56 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

4.4.2 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีการเปลี่ยนแปลง โดยการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินตในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร

จากการศึกษาสภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที จะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสอย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะมีน้ำตาลกลูโคสเฉลี่ยเหลืออยู่ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการหมัก 2.96 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 36 จะมีน้ำตาลกลูโคสเฉลี่ยเหลืออยู่ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการหมัก 1.07 กรัมต่อลิตร และจะเหลือน้ำตาลกลูโคส 0.99 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นก็จะมีการลดลงของน้ำตาลกลูโคสอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 72 จะเหลือน้ำตาลกลูโคสโดยเฉลี่ย 0.71 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสทั้งหมด 39.29 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 98.22 และเมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

4.4.3 ผลการศึกษาค่าพีเอชที่การเปลี่ยนแปลง โดยการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินตในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร

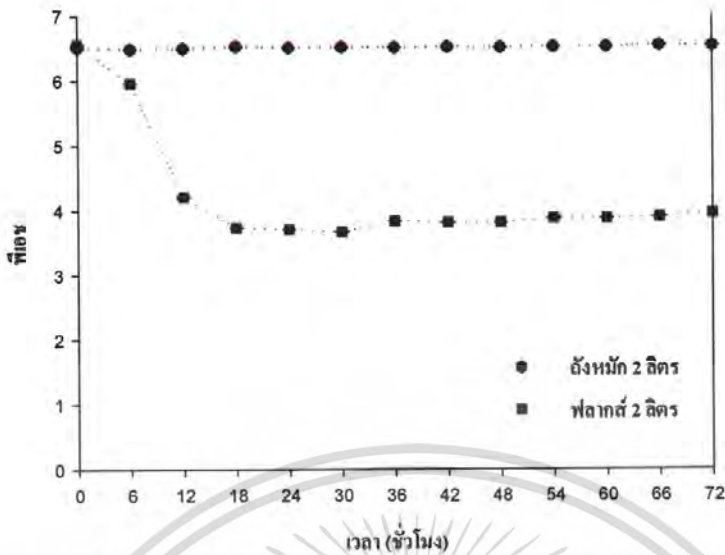
จากการศึกษาสภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร และมีอัตราเร็วของใบพัด 100 รอบต่อนาที มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่แตกต่างกันชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.9 โดยการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร จะสามารถควบคุมพีเอชให้คงที่ที่ 6.5 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แลคติกของเชื้อ แต่การผลิตกรดแลคติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ในสภาวะนิ่ง จะไม่สามารถควบคุมพีเอชได้ จึงทำให้พีเอชลดต่ำลง โดยมีพีเอชต่ำสุดเป็น 3.7 จากพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ จึงทำให้ได้ปริมาณกรดแลคติกต่ำ ซึ่งในการผลิตกรดแลคติกในถังหมักสามารถควบคุมค่าพีเอชให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกได้ดีกว่าการผลิตกรดแลคติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณที่สูงกว่าการผลิตกรดแลคติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร นอกจากนี้การหมักในถังหมักมีการกวนด้วยใบพัด มีผลทำให้เกิดการผสมของอาหารสังเคราะห์กับเชื้อที่ใช้ในการหมัก เชื้อจึงสามารถใช้สารอาหารที่อยู่ในถังหมักได้ดีขึ้น ทำให้ได้ปริมาณกรดแลคติกมากและใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Idris และ Suzana (2006) ที่ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก จากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรดโดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วและให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ John และคณะ (2006) ซึ่งศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุด ในการผลิตกรดแลคติก

ดังนั้นเราจึงกล่าวได้ว่า การผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที มีศักยภาพการผลิตกรดแลคติกดีกว่าการผลิตในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ในสภาวะนิ่ง เนื่องจากการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร สามารถควบคุมพีเอชให้คงที่และมีการกวน จึงทำให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตกรดแลคติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 อิสระ ที่ทำการวิจัยในสภาวะเดียวกัน พบว่าการผลิตกรดแลคติกด้วยเซลล์ตรึงจะได้ปริมาณกรดแลคติก 29.57 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งสูงกว่าการผลิตกรดแลคติกด้วยเซลล์อิสระที่ได้ปริมาณกรดแลคติกเพียง 15.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 (จิราภรณ์ และ ณัฐวาทิ, 2549 ; มัทนา และคณะ, 2549 ; เสกสรรค์ และ อรรถพนธ์, 2549)



รูปที่ 4.9 แสดงการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการหมักเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงในพลาสติก และดั่งหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า P-value ระหว่างการผลิตกรดแลคติกโดยใช้ดั่งหมักและพลาสติกขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T-Test

ระยะเวลาการหมักสูงสุด (ชั่วโมง)	กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตสูงสุด (ร้อยละ)	อัตราการผลิตสูงสุด (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)
ดั่งหมัก 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 :

ค่า p-value < 0.01

หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

ค่า p-value อยู่ในช่วง 0.01 < p-value < 0.05 หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

ค่า p-value > 0.05

หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

^a^b อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแนวสมมติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเตในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่ต่างกัน 4 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทราย พบว่าน้ำตาลกลูโคสให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 21.25 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 รองลงมาคือน้ำตาลแลคโตส ผลิตกรดแลคติกสูงสุด 18.68 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 น้ำตาลทราย ผลิตกรดแลคติกสูงสุด 16.02 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 84 น้ำตาลซูโครส ผลิตกรดแลคติกสูงสุด 9.99 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 ตามลำดับ และเมื่อนำค่าที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ากรดแลคติกที่ได้จากการใช้กลูโคสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น ดังนั้นจึงเลือกน้ำตาลกลูโคสมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลคติกได้ 28.65 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด

การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด 24.54 กรัมต่อลิตรใน ชั่วโมงที่ 60 โดยมีการใช้น้ำตาลกลูโคส 39.23 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ 98.08 จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร และค่าพีเอชต่ำสุด 3.8 ณ ชั่วโมงที่ 60 โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นจำนวน 4.8×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และเพิ่มจำนวนเป็น 6.2×10^{11} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 60

เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดแลคติกระหว่างการหมักในฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าถังหมักที่มีการควบคุมความเร็วรอบของใบพัดกวน 100 รอบต่อนาที และค่าพีเอชให้คงที่ที่ 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ สามารถการผลิตกรดแลคติกได้ 29.57 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 36 เมื่อนำมาคำนวณผลผลิตกรดแลคติกได้ร้อยละ 71.57 และอัตราการผลิตกรดแลคติกสูงสุดได้เท่ากับ 0.82 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ และการผลิตกรดแลคติกในฟลาสก์สามารถผลิตได้สูงสุด 26.80 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 เมื่อนำมาคำนวณผลผลิตกรดแลคติกได้ร้อยละ 66.99 และอัตราการผลิตกรดแลคติกสูงสุดได้เท่ากับ 0.45 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- จงกมล ขริยกุล, การผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341, วิทยานิพนธ์
วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอม
เกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง , กรุงเทพมหานคร, 2550
- จิราภรณ์และณัฐวุทธิ. 2549. ผลของแร่ธาตุปริมาณน้อยต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ
Lactobacillus casei ATCC 10863. โครงการพิเศษ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะ
วิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร,
2549.
- มัทนา และคณะ. 2549. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน สำหรับผลิตกรดแลคติก
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863. โครงการพิเศษ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะ
วิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร,
2549.
- วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2526. การผลิตและการใช้ immobilized enzymes. กรุงเทพมหานคร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิวาพร ศิวเวช. 2546. วัตถุประสงค์อาหาร เล่ม 1. นครปฐม : โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม
การเกษตรแห่งชาติ.
- ศิริประภา มั่นตรง, การเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341,
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย ,สถาบัน
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร, 2550
- สุรีย์ ทองวณิชนิม. 2543. “การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล เพื่อผลิต
วิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียม
แอลจินเนต”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิต
วิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เสกสรรค์และอรรณพณ์, 2549 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต
กรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863, โครงการพิเศษ ภาควิชาชีววิทยา
ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง,
กรุงเทพมหานคร, 2549.
- 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 of A.O.A.C. International. 17th ed. A.O.A.C. International. The United States of America.
- Ander Sodergard., Mikael Stolt. 2002. Properties of lactic acid based polymer and their correlation with composition. *International Dairy Journal*. 27 : 1123 – 1163
- Arasaratnam., Supplementation of whey with glucose and different nitrogen source for lactic acid production by *Lactobacillus delbrukii*. 1996., *Enzyme and microbial Technology*. 19 : 482 – 486
- Bulet, 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.
- Dubolis, M., Gijjes, K.A., Hamilton, J.K., Reber, P.A. and Smith F.1956. “Colorimetric method for determination of sugars and related substrate” *Analitical Chemistry*.28 : 350-356
- Fitzpatrick, J.J., Murphy, C., Mota, F.M. and Pauli, T. 2003. “Impurity and cost considerations for nutrient supplementation of whey permeate fermentations to produce lactic acid for biodegradable plastics.” *International Dairy Journal*. 13 : 575 – 580.
- Fitzpatrick, J.J. and O’Keeffe, U. 2001. “Influence of whey proteinhydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid.” *Process Biochemistry*. 37 : 183 – 186.
- Food and Drug Administration. 1998. “Code of Federal Regulations, U.S.Government Printing Office, Washington. D.C. Title 21.
- Fu, W. and Mathews, A.P. 1999. “Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum* : kinetic model and effects of pH, substrate and oxygen.” *Biochemical Engineering Journal*. 3 : 163-170.
- Huang, L.P., Jin, B., Lant, P., Zhou, J. 2005. “Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*.” *Biochemical Engineering Journal*. 23 : 265 – 276.
- Idris, A. and Suzana, W. 2006. “Effect of sodium alginate concentration, bead diameter , initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *L .delbrueckii*.” *Process Biochemistry*. 41 : 1117 – 1123

- John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2006. "Solid state fermentation for L-Lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*." *Process Biochemistry*. 41 : 759-763.
- Jones, M.L., Martoni, C., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T. and Prakash, S. 2005. "Deconjugation of bile acids with immobilized genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH11)." *Applied Bionics and Biomechanics*. 2 : 31-38.
- Kadam, S.R., Patail, 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
- 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.
- Kosikowski, F.V. 1977. *Cheeses and fermented milk foods*. Michigan : Enwards Erothers, Inc.
- Karin Hofvendahl, Barbel Hahn-Hagerdal., 1999. Factors affecting the fermentation lactic acid production from renewable resource. *Enzyme and Microbial Technology*, 26 : 81 – 107.
- Laskin, I.A. 1985. *Enzyme and Immobilized Cells in Biotechnology*. Canada : The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Mandel S., Puniya A.K, Singh K. 2005. Effect of alginate concentration on survival of microcapsulate *Lactobacillus casei* NCDC- 298. *International Dairy Journal*, 19 : 1190 - 1195
- Muller, V. 2001 "Bacterial Fermentation." *Encyclopedia of life Science*.
- Nakazawa, Y. and Hosono, A. 1992. *Functions of fermented milk*. Great Britain: University Press.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F. and Boudrant, J. 2001. "The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid a from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*." *Bioresource Technology*. 78 : 149 – 153.
- Nancib A., Nancib N., D.M. Cherif, A. Boubendir, M. Fick, J. Boudrant, 2005., Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp., *Rhamnosus*, *Bioresour. Technol.* 96 : 63–67.

- Narayanan, N. Roychoudhury, P.K. Srivastava, A. 2004. "L(+) Lactic acid fermentation and its product polymerization." *Electronic Journal of Biotechnology* Vol.7 No2 : 167 – 179.
- Oh, H., Y.J., Yun, J.S., Han, S.H., Jung, S. and Ryu, H.W. 2005 "Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw material." *Bioresource Technology*. 96 : 1492-1498
- Ohkouchi, Y and Inoue, Y. 2006. "Direct production of L(+) lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011." *Bioresource Technology*. 97 : 1554 – 1562.
- Ohkouchi, Y. and Inoue, Y. 2006. "Direct production of L(+) lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011." *Bioresource Technology*. 97 : 1554 – 1562
- Roukas, T and kotzekidou, P. 1998. " Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells 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*. 2 nd ed. New York : Marcel Dekker.
- Salminen, S., Wright, A. and Ouwehand, A. 2004. *Lactic acid bacteria*. 3 rd ed. New York :Marcel Dekker.
- Senthuran, A., Senthuran, V., Kaul, R.H. and Mattiasson, B. 1999. "Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization". *Journal of Biotechnology*. 73 : 61-70.
- 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. *Bioresource Technology*. 97 : 211 – 217.
- Wee, Y.J., Kim, J.N. Yun, S.S. and Pyu, H.W. 2004. "Utilization of sugar molass for Breconomical L(+) – lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*." *Enzyme and microbial Technology*. 35 : 568-578.
- Wee, Y.J., Kim, J.N. Yun, S.S. and Pyu, H.W. 2006. Pilot scale lactic acid production via batch culturing of *Lactobacillus* sp. RKY2 using corn steep liquor as a nitrogen source. *Food Technol Bio technol* 44., 2 : 293-298.
- Xu, Y.J. and A. Patil. 2006. Organic carbon fluxes from the Atchafalaya River into the Gulf of Mexico. In Y. J. Xu and V.J singh : coastal Enveronment and water quality, water resources Publication, LIC, high Lands Ranch, co, U.S.A., 217-256.

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* RKY 1. "Enzyme and Microbial Technology. 33 : 416-423.

available : <http://www.cem.msu.edu/~smithmr/Lactide.htm>

available : <http://www.chemistry.umeche.maine.edu/CHY251/dlwrong.html>

available : <http://www.cem.msu.edu/~smithmr/Lactide.htm>

available : <http://www.bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>

available : <http://www.bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>

available : http://www.rdi.ku.ac.th/cl/images/instru/HPLC_Afla.jpg

available : <http://www.Isbu.ac.uk/water/hyaly.html>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

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

วิธีการ

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ค่าประมาณ 6.5(IdrisและSuzuna , 2006) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้นิ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
2. ชั่งน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร (สูตรอาหารปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร) ปรับพีเอชให้ได้ค่าประมาณ 6.5(IdrisและSuzuna , 2006) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้นิ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที
3. นำอาหารและสารละลายกลูโคสที่ได้มาเทรวมกันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

1.2 อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (Peptone)	10	กรัม
กลูโคส (Glucose)	40	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.03	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

วิธีการ

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ค่าประมาณ 6.5 (Idris และ Suzuna, 2006) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้นึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. ชั่งน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร (สูตรอาหารปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร) ปรับพีเอชให้ได้ค่าประมาณ 6.5 (Idris และ Suzuna, 2006) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้นึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

3. นำอาหารและสารละลายกลูโคสที่ได้มาเทรวมกันขณะที่ยังร้อนอยู่เพื่อป้องกันการแข็งตัวของวุ้นภายใต้สภาวะปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

1.3 สูตรอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) (Altaf, 2005) ประกอบด้วย

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

วิธีการ

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมด นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ค่าประมาณ 6.5 (Idris และ Suzuna, 2006) และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้นึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. ชั่งน้ำตาลกลูโคสนำมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร (สูตรอาหารปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร) ปรับพีเอชให้ได้ค่าประมาณ 6.5 (Idris และ Suzuna, 2006) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้นึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

3. นำอาหารและสารละลายกลูโคสที่ได้มาเทรวมกันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

2. สารเคมี

สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) พีเอช 3.0

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้เป็นพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ความเข้มข้น 0.1

โมลาร์ (ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย B :กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ตวงกรดฟอสฟอริก 3.4 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส วิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois, 1956)

อุปกรณ์

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

สารเคมี

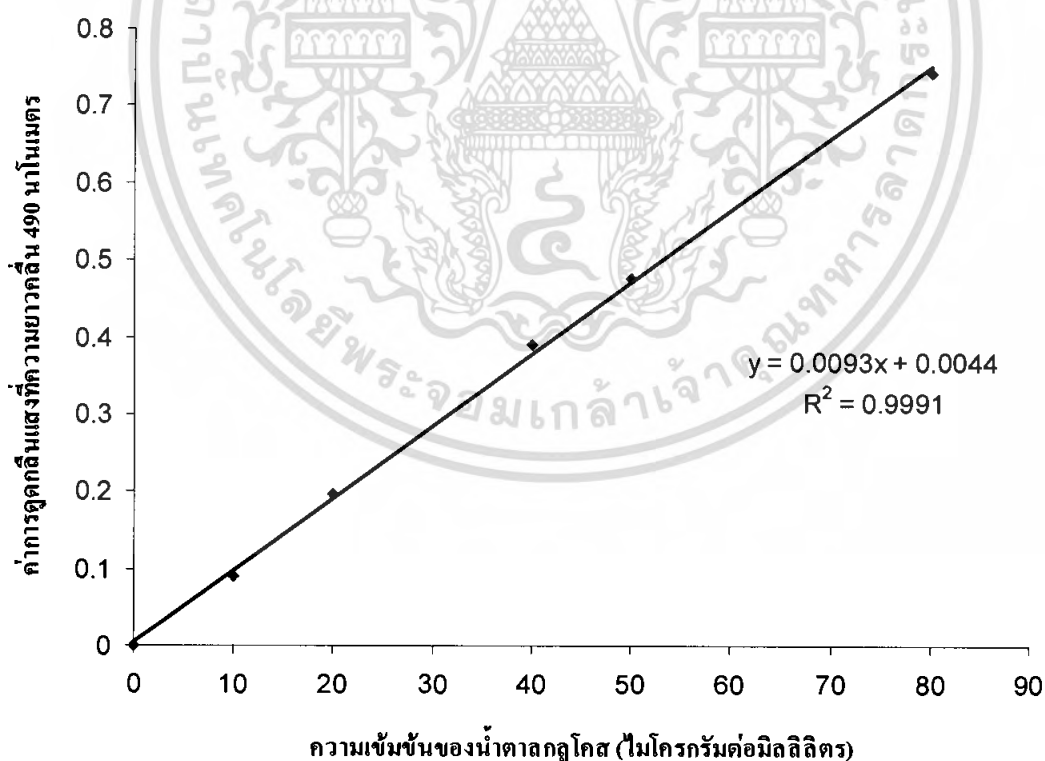
1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade ร้อยละ 95.5 , specific gravity 1.84)
2. สารละลายฟินอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟินอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 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. บีบสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายฟีนอลร้อยละ 5 ลงไป 1 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้น ได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าและนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้ำเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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



รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

วิธีการเตรียมน้ำเกลือร้อยละ 0.85

1. ชั่ง โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีการละลายเม็ดเจล (Mandal, 2005)

1. เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1 โมลาร์ ปรับพีเอช ประมาณ 7.4 ± 0.2 โดยคำนวณหาปริมาตร จากสีบเท้าของปริมาณเม็ดเจลที่ชั่งได้ (เป็นปริมาตรต่อ 1 ฟลากล)
 2. กรองเม็ดเจลด้วยผ้าขาวบางในตู้ปลอดเชื้อ แล้วนำเม็ดเจลใส่ลงไปในฟลากลที่มีสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยเทคนิคปลอดเชื้อ
 3. ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลละลาย

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจาง
 2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างแต่ละความเจือจางที่เหมาะสมใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วจานละ 1 มิลลิลิตร
 3. นำอาหารแข็งเอ็มอาร์เอส (MRS agar) ไปหลอมให้ละลายแล้วทิ้งให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร
 4. เขย่าจาน โดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนอุ่นแข็ง
 5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน
 6. นับจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีรวมทั้ง 3 จาน แล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นรายงานจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

3. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วยเครื่อง HPLC (กัญชานิกา และคณะ, 2548)

3.1 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

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

2.3 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 1-6 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

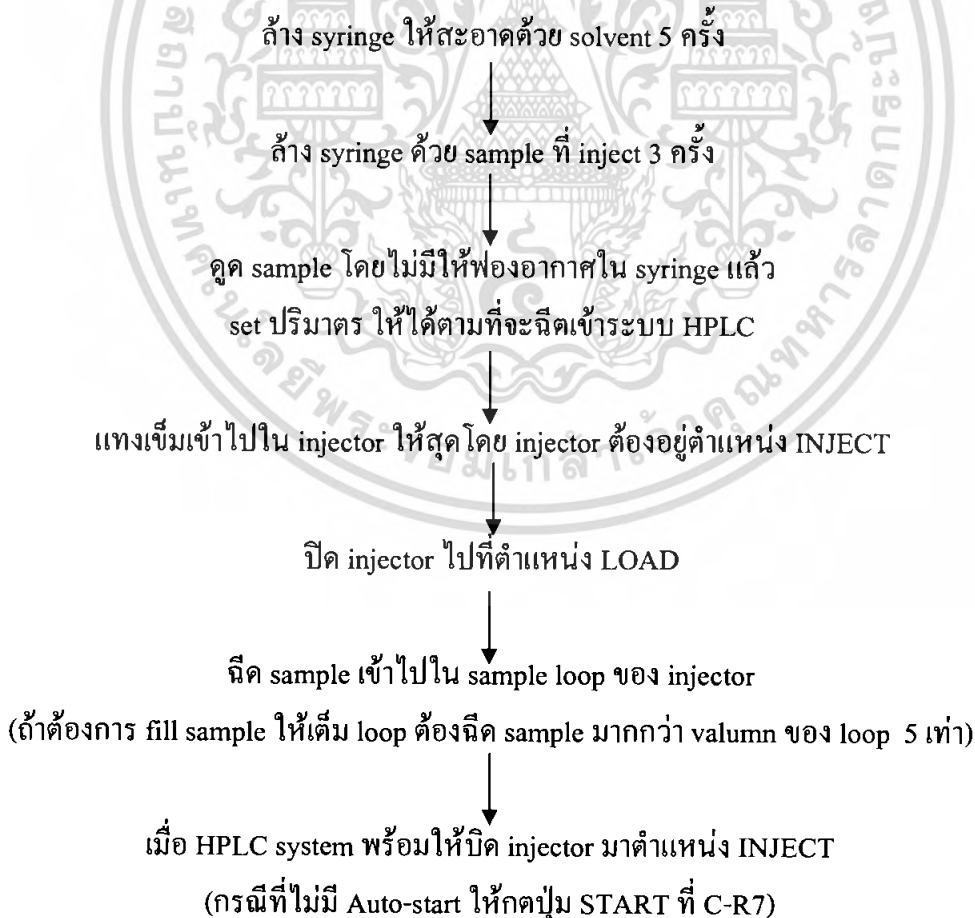
หมายเหตุ : การเปลี่ยน Mobile phase ต้องคำนึงถึงด้วยว่า Mobile phase เก่าและใหม่เข้ากันหรือเปล่า ถ้าไม่สามารถเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันได้ต้องใช้สารอื่นเป็นตัวเชื่อมกลาง โดย run mobile phase ตัวเชื่อมกลางอย่างน้อย 20 นาที

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 ก่อนข้างนี้
4. ถ้าต้องการให้เครื่องคำนวณ Slope ให้เลือกกด S
5. ถ้า Baseline หนึ่งอยู่ที่ตำแหน่งสูงกว่าศูนย์เล็กน้อย สามารถตั้งศูนย์อัตโนมัติกด Z
6. ทำการ Inject Sample

6.1 Rheodyne Manual Injector



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอประมาณ 10-5 วินาที แล้วดึง syringe ออกจาก injector



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. สั่ง Off pump
3. ปิด power ของ HPLC units แล้วยก Sinker ให้พื้น Mobile phase

หมายเหตุ : กรณีที่จะหยุดใช้ เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

5.3 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

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

หมายเหตุ

1. การเปลี่ยน mobile phase ที่ใช้งานมาเป็น mobile phase ที่ใช้เก็บ column ต้องระวังการผสมกันระหว่าง mobile phase ทั้ง 2 ว่า สามารถผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันได้ดีต้องมี mobile phase ข้นกลางอย่างละ 30 นาที
2. การล้างใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที หรือน้อยกว่าขึ้นกับชนิดของ column

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

Buffer solution 30 นาที



น้ำกลั่น HPLC 30 นาที



MeOH ร้อยละ 70 นาน 30 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

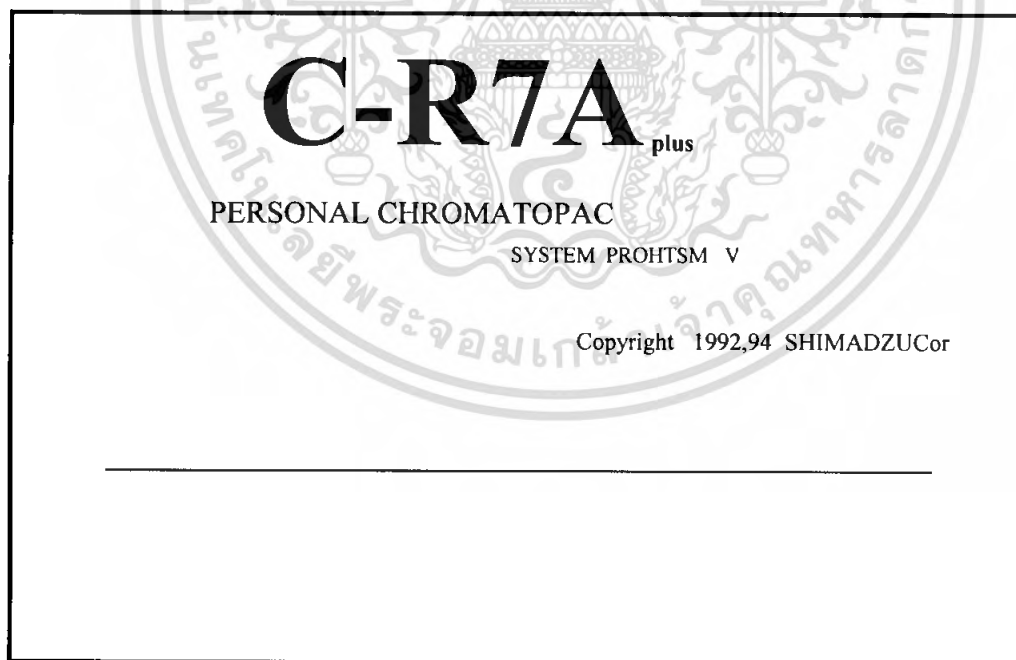
ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

6.3 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมือมากกว่า 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 MeOH ร้อยละ 70 แล้ว run เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง
5. Off pump แล้วปิดเครื่องทุก unit
6. ยก sinker ออกจากขวด mobile phase แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

7.3 ขั้นตอนการใช้งาน

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



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ 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 กด Y

จะปรากฏ

Part 1:	
File Name 2:	

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

Part 1:	
File Name 2:	ALCOHOL

หลังจากการ save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN 1

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

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

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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Directory Part 1:

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

- เลือก R เมื่อต้องการยกเลิกการตั้งชื่อข้างต้น
 C ยกเลิกการ Save ของ Chromatogram สุดท้าย
 A เมื่อต้องการให้เครื่อง Save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

4. เลือกข้อ 1 จากหน้าจอ Menu ของ WIN1 จากนั้นรอสังเกตเห็นเส้น Baseline ก่อนข้างเรียบจากนั้นทำการ 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

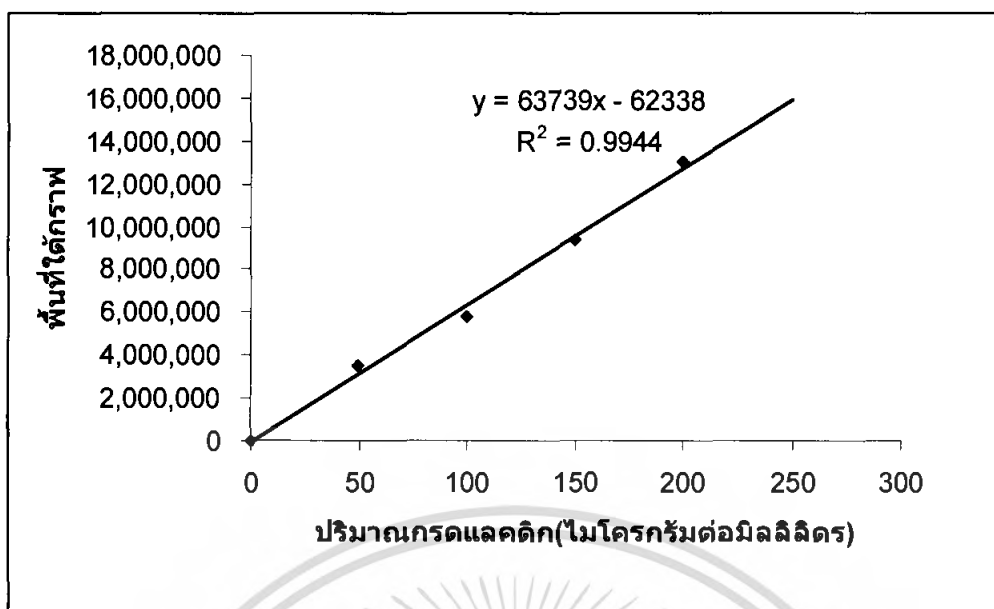
7. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณ และให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START

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



รูปที่ 2 แสดงโครมาโทแกรมค่า Retention time ของกรดแลกติกบริสุทธิ์ ได้ค่า Retention time ของกรดแลกติกเท่ากับ 5.831

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแลคติกบริสุทธิ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ 1 แสดงผลการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

ANOVA

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	212.340	3	70.780	787.672	.000
Within Groups	.719	8	.090		
Total	213.059	11			

DATA

Duncan

แหล่งคาร์บอน	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Sucrose	3	9.6933			
Sugar	3		15.5403		
Lactose	3			18.4300	
Glucose	3				21.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นกลูโคสที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก

ANOVA

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	165.596	3	55.199	474.691	.000
Within Groups	.930	8	.116		
Total	166.526	11			

DATA

Duncan

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
20.00	3	18.8900			
30.00	3		20.4800		
50.00	3			24.7100	
40.00	3				28.3933
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก

ANOVA

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	212.340	3	70.780	787.672	.000
Within Groups	.719	8	.090		
Total	213.059	11			

DATA

Duncan

แหล่งคาร์บอน	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Sucrose	3	9.6933			
Sugar	3		15.5403		
Lactose	3			18.4300	
Glucose	3				21.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นกลูโคสที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก

ANOVA

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	165.596	3	55.199	474.691	.000
Within Groups	.930	8	.116		
Total	166.526	11			

DATA

Duncan

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
20.00	3	18.8900			
30.00	3		20.4800		
50.00	3			24.7100	
40.00	3				28.3933
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก

T-Test

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 flask	20.1600	3	.10000	.05774
fermenter	23.8600	3	.12000	.06928

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 flask & fermenter	3	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	flask - fermenter	-3.70000	.02000	.01155	-3.74968	-3.65032	-320.429	2	.000

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิตกรดแลกติก

T-Test

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 flask	.5100	3	.10000	.05774
fermenter	.6000	3	.12000	.06928

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 flask & fermenter	3	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	flask - fermenter	-.09000	.02000	.01155	-.13968	-.04032	-7.794	2	.016

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการผลิตกรดแลกติก

T-Test

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 flask	.1700	3	.10000	.05774
fermenter	.3100	3	.10000	.05774

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 flask & fermenter	3	-1.000	.000

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 flask- fermenter	-.14000	.20000	.11547	-.63683	.35683	-1.212	2	.349

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณกรดแลคติกสูงสุดที่ผลิตได้จากการศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพการผลิตกรดแลคติกในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร

T-Test

Group Statistics

group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Lactic 1	3	29.5687	1.07890	.62290
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 9 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถังหมัก
ขนาด 2 ลิตร

T-Test

Group Statistics

group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
glucose 1	3	39.2889	2.08347	1.20289
glucose 2	3	38.9312	.88903	.51328

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
glucose	4.280	.107	.273	4	.798	.35767	1.30782	-3.27343	3.98877
Equal variances not assumed			.273	2.705	.804	.35767	1.30782	-4.07341	4.78875

ตารางที่ 10 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถังหมัก
ขนาด 2 ลิตร

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 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุดที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบสัถยภาพการผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และ
 ถังหมักขนาด 2 ลิตร

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									
Equal variances assumed	.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

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณกรดแลกติก จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	กลูโคส			
	ปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อลิตร)			เฉลี่ย
0	0.46	0.52	0.45	0.48
12	8.88	8.74	8.45	8.69
24	10.67	10.58	10.66	10.64
36	13.89	13.78	13.84	13.84
48	17.02	17.24	17.16	17.14
60	20.94	20.82	21.24	21.00
72	19.93	19.55	19.87	19.78
84	15.91	15.42	16.18	15.84
96	12.77	12.86	13.23	12.95
108	12.18	12.68	12.22	12.36
120	10.12	11.32	10.68	10.71

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณกรดแลกติก จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	แลคโตส			
	ปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อลิตร)			เฉลี่ย
0	0.30	0.36	0.21	0.29
12	0.63	0.69	0.94	0.75
24	1.01	1.25	1.32	1.20
36	1.40	1.84	2.16	1.80
48	3.50	4.02	4.22	3.91
60	8.23	8.37	8.12	8.24
72	10.90	10.67	11.07	10.88
84	17.60	17.45	18.52	17.86
96	18.29	18.68	18.32	18.43
108	6.21	6.89	7.28	6.79
120	2.64	3.65	3.46	3.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณกรดแลคติก จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	ซูโครส			เฉลี่ย
	ปริมาณกรดแลคติก(กรัมต่อลิตร)			
0	1.01	1.23	1.99	1.41
12	2.01	2.27	2.68	2.32
24	2.04	2.98	2.45	2.49
36	4.16	4.22	4.45	4.28
48	8.23	8.12	8.25	8.20
60	9.60	9.99	9.49	9.69
72	6.95	6.54	6.87	6.79
84	4.40	4.69	4.88	4.66
96	4.51	4.32	4.66	4.50
108	4.24	4.62	4.11	4.32
120	4.24	4.02	4.18	4.15

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณกรดแลคติก จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	น้ำตาลทราย			เฉลี่ย
	ปริมาณกรดแลคติก(กรัมต่อลิตร)			
0	0.25	0.86	0.45	0.52
12	4.34	4.98	5.13	4.82
24	5.17	5.23	5.47	5.29
36	8.44	7.99	8.68	8.37
48	10.50	10.86	10.66	10.68
60	11.66	11.85	11.26	11.59
72	12.03	13.45	13.65	13.04
84	15.15	16.02	15.45	15.54
96	10.30	10.78	10.36	10.48
108	8.14	8.35	8.84	8.44
120	5.12	5.02	5.46	5.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณน้ำตาล จากการศึกษากาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	กลูโคส			เฉลี่ย
	ปริมาณน้ำตาล(กรัมต่อลิตร)			
0	41.31	40.76	40.43	40.83
12	26.53	25.63	26.63	26.26
24	18.26	18.53	18.53	18.44
36	10.63	10.87	10.63	10.71
48	6.55	7.76	7.14	7.15
60	2.44	2.39	2.24	2.36
72	1.36	1.48	1.38	1.41
84	0.67	0.56	0.90	0.71
96	0.43	0.46	0.49	0.46
108	0.33	0.35	0.25	0.31
120	0.27	0.89	0.36	0.51

ตารางที่ 17 แสดงปริมาณน้ำตาล จากการศึกษากาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	แลคโตส			เฉลี่ย
	ปริมาณน้ำตาล(กรัมต่อลิตร)			
0	42.90	41.64	41.04	41.86
12	36.43	35.87	35.98	36.09
24	32.64	32.95	31.97	32.52
36	22.85	22.74	22.05	22.55
48	17.88	16.97	16.87	17.24
60	12.76	12.54	12.86	12.72
72	4.43	4.84	4.53	4.60
84	2.43	2.74	2.08	2.42
96	1.43	1.85	1.97	1.75
108	1.04	1.05	1.04	1.05
120	0.63	0.75	0.85	0.75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 แสดงปริมาณน้ำตาล จากการศึกษากการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	ซูโครส			เฉลี่ย
	ปริมาณน้ำตาล(กรัมต่อลิตร)			
0	42.85	41.87	41.14	41.95
12	32.46	32.75	33.16	32.79
24	18.64	18.36	19.06	18.69
36	13.77	12.05	13.43	13.08
48	10.75	10.54	10.54	10.61
60	7.97	7.95	7.14	7.68
72	5.85	5.37	5.53	5.58
84	3.88	3.43	3.97	3.76
96	2.98	3.06	3.13	3.06
108	1.97	1.87	1.88	1.90
120	1.08	1.14	1.18	1.13

ตารางที่ 19 แสดงปริมาณน้ำตาล จากการศึกษากการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	น้ำตาลทราย			เฉลี่ย
	ปริมาณน้ำตาล(กรัมต่อลิตร)			
0	42.69	41.74	40.64	41.69
12	28.37	28.95	28.47	28.60
24	20.43	20.76	20.36	20.52
36	14.85	14.85	13.97	14.56
48	10.75	10.64	10.22	10.54
60	7.95	7.34	7.14	7.48
72	3.73	3.12	3.53	3.46
84	1.85	1.36	1.08	1.43
96	0.96	0.87	0.57	0.80
108	0.36	0.47	0.53	0.45
120	0.25	0.97	0.68	0.63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	กลูโคส			
	พีเอช			เฉลี่ย
0	6.50	6.50	6.50	6.50
12	5.63	5.36	5.21	5.40
24	4.88	4.79	4.94	4.87
36	4.76	4.75	4.77	4.76
48	4.29	4.24	4.63	4.39
60	3.96	4.07	3.82	3.95
72	3.99	4.05	4.11	4.05
84	4.40	4.24	4.19	4.28
96	4.39	4.46	4.52	4.46
108	4.52	4.49	4.87	4.63
120	4.57	4.80	4.62	4.66

ตารางที่ 21 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	แลคโตส			
	พีเอช			เฉลี่ย
0	6.50	6.50	6.50	6.50
12	6.46	6.48	6.42	6.45
24	6.35	6.32	6.34	6.34
36	6.25	6.16	6.24	6.22
48	5.56	5.58	5.51	5.55
60	5.36	5.37	5.38	5.37
72	4.79	4.84	4.82	4.82
84	4.32	4.31	4.25	4.29
96	4.19	4.14	4.11	4.15
108	4.36	4.43	4.32	4.37
120	4.42	4.58	4.54	4.51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 22 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	ซูโครส			
	พีเอช			เฉลี่ย
0	6.50	6.50	6.50	6.50
12	6.30	6.32	6.46	6.36
24	6.00	5.83	5.84	5.89
36	5.47	5.50	5.54	5.50
48	5.45	5.59	5.42	5.49
60	4.80	4.96	4.74	4.83
72	4.85	5.06	5.12	5.01
84	5.18	5.04	5.01	5.08
96	5.28	5.31	5.10	5.23
108	5.19	5.22	5.14	5.18
120	5.08	5.19	5.02	5.10

ตารางที่ 23 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	น้ำตาลทราย			
	พีเอช			เฉลี่ย
0	6.50	6.50	6.50	6.50
12	6.23	6.27	6.28	6.26
24	5.65	5.73	5.78	5.72
36	5.48	5.41	5.32	5.40
48	5.27	5.39	5.24	5.30
60	5.05	5.08	5.02	5.05
72	4.73	4.41	4.68	4.61
84	4.44	4.34	4.54	4.44
96	4.97	4.87	5.05	4.96
108	5.14	5.17	5.24	5.18
120	5.25	5.23	5.18	5.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 24 แสดงปริมาณกรดแลคติก จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร			เฉลี่ย
	ปริมาณกรดแลคติก(กรัมต่อลิตร)			
0	3.21	3.28	3.66	3.38
12	8.35	8.45	8.66	8.49
24	12.54	12.896	12.45	12.63
36	15.55	15.6687	16.02	15.75
48	16.83	16.446	16.78	16.69
60	17.77	17.986	18.23	18.00
72	18.98	18.45	19.24	18.89
84	17.23	17.69	17.45	17.46
96	16.54	16.65	16.88	16.69
108	14.32	15.02	14.63	14.66
120	11.45	12.24	11.66	11.78

ตารางที่ 25 แสดงปริมาณกรดแลคติก จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร			เฉลี่ย
	ปริมาณกรดแลคติก(กรัมต่อลิตร)			
0	3.41	3.845	4.36	3.87
12	7.23	7.88	8.12	7.74
24	12.8	12.02	12.68	12.50
36	16.34	16.66	16.98	16.66
48	20.21	20.34	20.89	20.48
60	19.85	19.36	19.99	19.73
72	17.66	17.42	17.89	17.66
84	15.02	15.87	15.99	15.63
96	14.07	14.98	14.23	14.43
108	12.98	12.45	12.36	12.60
120	12.34	12.02	12.33	12.23

ตารางที่ 26 แสดงปริมาณกรดแลคติก จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	กลูโคส 40 กรัมต่อลิตร			
	ปริมาณกรดแลคติก(กรัมต่อลิตร)			เฉลี่ย
0	3.27	3.33	3.48	3.36
12	5.93	5.59	4.83	5.45
24	9.85	9.65	9.47	9.66
36	13.23	13.56	13.85	13.55
48	18.17	18.68	18.45	18.43
60	28.07	28.46	28.65	28.39
72	27.99	27.45	27.11	27.52
84	23.14	23.89	23.01	23.35
96	18.06	18.42	18.68	18.39
108	16.98	16.88	17.24	17.03
120	16.4	16.02	15.78	16.07

ตารางที่ 27 แสดงปริมาณกรดแลคติก จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมงที่	กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร			
	ปริมาณกรดแลคติก(กรัมต่อลิตร)			เฉลี่ย
0	2.46	2.56	2.38	2.47
12	5.56	5.68	5.88	5.71
24	9.78	9.96	9.12	9.62
36	14.5	14.77	14.45	14.57
48	18.85	18.64	18.47	18.65
60	19.25	19.63	19.44	19.44
72	24.67	25.02	24.44	24.71
84	23.24	23.28	22.86	23.13
96	20.32	20.46	20.84	20.54
108	18.45	19.18	18.22	18.62
120	16.74	17.36	17.02	17.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 28 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกต้อง

ชั่วโมงที่	กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร			เฉลี่ย
	ปริมาณน้ำตาล(กรัมต่อลิตร)			
0	20.000	20.000	20.000	20.00
12	15.532	15.625	15.635	15.60
24	12.263	12.525	12.525	12.44
36	9.626	9.865	9.627	9.71
48	4.546	4.764	4.135	4.48
60	2.436	2.388	2.243	2.36
72	1.627	1.478	1.578	1.56
84	0.367	0.560	0.690	0.54
96	0.430	0.630	0.386	0.48
108	0.226	0.147	0.350	0.24
120	0.166	0.190	0.362	0.24

ตารางที่ 29 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกต้อง

ชั่วโมงที่	กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร			เฉลี่ย
	ปริมาณน้ำตาล(กรัมต่อลิตร)			
0	30.000	30.000	30.000	30.00
12	21.532	21.625	21.635	21.60
24	14.263	14.525	14.525	14.44
36	7.626	7.865	7.627	7.71
48	4.546	4.764	4.135	4.48
60	2.436	2.388	2.243	2.36
72	1.627	1.478	1.578	1.56
84	0.977	0.850	0.690	0.84
96	0.425	0.526	0.525	0.49
108	0.543	0.524	0.632	0.57
120	0.425	0.526	0.652	0.53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 30 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

ชั่วโมงที่	กลูโคส 40 กรัมต่อลิตร			เฉลี่ย
	ปริมาณน้ำตาล(กรัมต่อลิตร)			
0	40.000	40.000	40.000	40.00
12	26.532	25.625	26.635	26.26
24	18.263	18.525	18.525	18.44
36	10.626	10.865	10.627	10.71
48	6.546	7.764	7.135	7.15
60	1.836	1.788	1.743	1.79
72	1.363	1.478	1.378	1.41
84	0.667	0.560	0.900	0.71
96	0.430	0.456	0.486	0.46
108	0.326	0.347	0.250	0.31
120	0.266	0.890	0.362	0.51

ตารางที่ 31 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

ชั่วโมงที่	กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร			เฉลี่ย
	ปริมาณน้ำตาล(กรัมต่อลิตร)			
0	50.000	50.000	50.000	50.00
12	34.532	34.625	34.635	34.60
24	26.263	26.525	26.525	26.44
36	19.626	19.865	19.627	19.71
48	14.000	15.764	15.135	14.97
60	10.836	10.788	10.743	10.79
72	3.567	3.474	3.778	3.61
84	2.667	2.560	2.900	2.71
96	1.430	1.456	1.486	1.46
108	1.326	1.347	1.000	1.22
120	1.266	1.890	1.362	1.51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 32 แสดงค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

ชั่วโมงที่	กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร			เฉลี่ย
	พีเอช			
0	6.50	6.50	6.50	6.5
12	6.12	6.18	6.11	6.1
24	5.88	5.80	5.84	5.8
36	5.53	5.45	5.50	5.5
48	5.10	5.20	5.24	5.2
60	5.05	5.09	5.00	5.0
72	4.87	4.89	4.78	4.8
84	4.89	4.96	4.92	4.9
96	5.07	5.10	5.14	5.1
108	5.24	5.22	5.20	5.2
120	5.25	5.30	5.28	5.3

ตารางที่ 33 แสดงค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

ชั่วโมงที่	กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร			เฉลี่ย
	พีเอช			
0	6.50	6.50	6.50	6.5
12	6.03	6.08	6.05	6.1
24	5.67	5.6	5.62	5.6
36	5.2	5.32	5.31	5.3
48	4.76	4.79	4.72	4.8
60	4.88	4.85	4.82	4.9
72	5.05	5.03	5.09	5.1
84	5.22	5.27	5.20	5.2
96	5.3	5.38	5.26	5.3
108	5.33	5.3	5.22	5.3
120	5.35	5.33	5.38	5.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 34 แสดงค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

ชั่วโมงที่	กลูโคส 40 กรัมต่อลิตร			เฉลี่ย
	พีเอช			
0	6.50	6.50	6.50	6.5
12	5.63	5.36	5.21	5.4
24	4.88	4.79	4.94	4.9
36	4.76	4.75	4.77	4.8
48	4.29	4.24	4.63	4.4
60	3.96	4.07	3.82	4.0
72	3.99	4.05	4.11	4.1
84	4.40	4.24	4.19	4.3
96	4.39	4.46	4.52	4.5
108	4.52	4.49	4.87	4.6
120	4.57	4.80	4.62	4.7

ตารางที่ 35 แสดงค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูกตรึง

ชั่วโมงที่	กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร			เฉลี่ย
	พีเอช			
0	6.50	6.50	6.50	6.5
12	5.50	5.45	5.33	5.4
24	4.76	4.70	4.80	4.8
36	4.60	4.65	4.68	4.6
48	4.44	4.43	4.38	4.4
60	4.33	4.30	4.28	4.3
72	3.90	4.05	4.07	4.0
84	4.12	4.16	4.19	4.2
96	4.28	4.30	4.35	4.3
108	4.55	4.50	4.58	4.5
120	4.75	4.70	4.78	4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 36 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลกลูโคส พีเอช และจำนวนเซลล์ จากการศึกษา การเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ที่ถูก ตีรัง

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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 37 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลกลูโคส และพีเอช จากการศึกษาศักยภาพการ
ผลิตกรดแลกติกในพลาสติก และถังหมักขนาด 2 ลิตร

ชั่วโมงที่	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)		น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)		พีเอช	
	ถังหมัก	พลาสติก	ถังหมัก	พลาสติก	ถังหมัก	พลาสติก
0	0.00	0.00	39.9995	39.9995	6.5	6.6
6	13.62	12.41	35.9852	36.4225	6.5	6.0
12	17.58	16.62	23.677	34.2647	6.5	4.2
18	20.29	18.88	12.8275	25.9135	6.5	3.7
24	22.54	21.56	2.9601	23.125	6.5	3.7
30	26.63	23.20	1.1318	18.9673	6.5	3.7
36	29.57	24.93	1.0723	17.2683	6.5	3.8
42	26.97	25.01	1.0619	8.3615	6.5	3.8
48	25.55	25.63	0.9866	5.5838	6.5	3.8
54	25.17	26.34	0.8755	4.444	6.5	3.9
60	24.97	26.80	0.8354	1.9866	6.5	3.9
66	24.32	26.28	0.7566	1.8404	6.5	3.9
72	24.12	24.46	0.7106	1.0683	6.5	3.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้