สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

นางสาวมัทนา ทองเลิศ
นางสาวณัฏฐพิชา ศรีอ่อนนวล
นางสาวอัมทิกา เมืองวงษ์

วพ.
ว13469
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72576
วัน,เดือน,ปี 20 ธ.ค. 2550

.b 17464529
.i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on optimization of Nitrogen Sources for Lactic acid Production by *Lactobacillus casei* ATCC 10863

Mattana Thonglert

Nattapicha Srionnual

Amtiga Muangwong

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of Requirement for

The Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863
นักศึกษา	นางสาวมัทนา ทองเลิศ รหัสประจำตัว 46050479
	นางสาวณัฏฐพิชา ศรีอ่อนนวล รหัสประจำตัว 46050481
	นางสาวอัมทิกา เมืองวงษ์ รหัสประจำตัว 46050497
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์
ปีการศึกษา	2549
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ ดร.จิดาภา ทิน้อย	
กรรมการ รศ. สุขใจ ชูจันทร์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

นักศึกษา นางสาวมัทนา ทองเลิศ รหัสประจำตัว 46050479

นางสาวณัฏฐพิชา ศรีอ่อนนวล รหัสประจำตัว 46050481

นางสาวอัมทิกา เมืองวงษ์ รหัสประจำตัว 46050497

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2549

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยศึกษาแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด 7 สูตรอาหาร แหล่งไนโตรเจนที่ศึกษามีทั้งแหล่งอินทรีย์ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ เปปโตน และยูเรีย แหล่งอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมไนเตรท ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดยีสต์ 5 กรัม ผสมกับเปปโตน 10 กรัม เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 28.81 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิต 1.25 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น และอัตราการผลิต 0.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 72 ของระยะเวลาการหมัก และได้ศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรทั้งที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักชนิดใบพัดกวนขนาด 2 ลิตรที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยให้ผลผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ซึ่งพบว่าในระดับถังหมัก ให้ผลผลิตกรดสูงสุดเมื่อเทียบกับระดับ ฟลาสก์ โดยผลิตกรดแลคติกได้ 15.28 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.72 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Study on optimization of Nitrogen Sources for Lactic acid Production by *Lactobacillus casei* ATCC 10863

Name Miss Matana Thonglert
Miss Nattapicha Srionnual
Miss Amtiga Muangwong

Department Applied Biology

Program Industrial Microbiology

Academic Year 2006

Special Project Advisor Associate Professor Sukjai Choojun

ABSTRACT

Optimization of nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus casei* ATCC 10863 was studied. Seven nitrogen sources were organic, yeast extract, peptone and urea and inorganic, ammonium sulphate and sodium nitrate. *L. casei* ATCC 10863 was cultured at 37 ^{o}C in stationary state. The result showed that the suitable nitrogen sources was 5 g of yeast extract mixed with 10 g of peptone. The lactic acid was 28.81 g/l for cultivation time of 72 hr and yield and productivity rate were 1.25 g/g substrate and 0.40 g/l.hr. respectively. The efficiency of lactic acid production in 2-liter-flask and fermentor were investigated and the supplement of calcium carbonate was also carried out. The result present that the supplement of calcium carbonate improved the production of lactic acid by *L. casei* ATCC 10863. Cultivation in fermentor showed better yield of lactic acid than 2-liter-flask. The lactic acid, yield and productivity rate were 15.28 g/l, 0.72 g/g substrate and 0.16 g/l.hr., respectively for cultivation time 96 hr.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษ ซึ่งโครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ การตอบข้อซักถามของผู้จัดทำ และช่วยปรับปรุงข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทำการทดลอง จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ ประธานกรรมการ และ ดร.จิดาภา ทิน้อย กรรมการ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และช่วยปรับปรุงข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ ในการเบิกเครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณนักศึกษาปริญญาโท ที่ให้คำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวกับการทดลอง และสอนการใช้เครื่องมือต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณแม่บ้าน และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่คอยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับเรื่องการเปิดและปิดห้องปฏิบัติการในวันที่มีการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ ที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และช่วยกันคิดแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างทำการทดลอง ทำให้การทำโครงงานพิเศษนี้เป็นไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนกำลังทรัพย์ในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่มีความสนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

มัทนา ทองเลิศ
ณัฏฐพิชา ศรีอ่อนนวล
อัมทิกา เมืองวงษ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 กรดแลคติก	3
2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก	9
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก	17
2.4 High-performance liquid chromatography (HPLC)	21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการโครงงานพิเศษ	28
3.1 อุปกรณ์	28
3.2 สารเคมี	29
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ	29
3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน	29
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	34
4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร	34
4.1.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ทั้งหมด 7 สูตรอาหาร	36
4.1.2 การศึกษาการผลิตกรดแลคติคของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ทั้ง 7 สูตรอาหาร	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

4.1.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันในการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 38

4.1.4 การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ทั้ง 7 สูตรอาหาร 38

4.2 การเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 43

4.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ระดับ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 43

4.2.2 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร 45

4.2.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 46

4.2.4 การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 47

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 52

เอกสารอ้างอิง 53

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี 56

ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ 58

ภาคผนวก ค ตารางบันทึกผลการทดลอง 68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก	4
2.2	แสดงลักษณะความแตกต่างของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	13
2.3	ลักษณะและความแตกต่างของ *Lactobacillus* sp.	14
2.4	ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรนที่เหมาะสมกับตัวทำละลายแต่ละชนิด	25
2.5	ชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ	30
4.1	สรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร	41
4.2	สรุปผลการทดลองเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของกรดแลคติกชนิด L (+) lactic acid และชนิด (-) lactic acid	4
2.2 โครงสร้างทางเคมีของกรดโพลีแลคติกแอซิด	5
2.3 ไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลคติก	5
2.4 เทคโนโลยีและการประยุกต์ใช้กรดแลคติก	9
2.5 กลไกการผลิตกรดแลคติก โดยแบคทีเรียกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ	11
2.6 กลไกการผลิตกรดแลคติก โดยแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ	12
2.7 ลักษณะของ *Lactobacillus casei*	16
2.8 รูปเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC)	21
4.1 แสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง	35
4.2 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง	35
4.3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง	37
4.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง	39
4.5 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

4.6 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดแลคติก การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่ 1 ที่มีแหล่งไนโตรเจนคือ ยีสต์สกัดและเปปโตนโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 42

4.7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 44

4.8 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง 44

4.9 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 46

4.10 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48

4.11 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

4.12 แสดงปริมาณกรดแลคติก การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในถังหมักแบบใบพัดกวน ขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

กรดแลคติก หรือกรดนม เป็นกรดอินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในอาหาร พบตามธรรมชาติในนม เปรี้ยว ผักดองชนิดต่าง ๆ เนยแข็ง เป็นต้น (Gardner, 1972) นิยมใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารที่มีความจำเป็นต่อวงการอุตสาหกรรมอาหารมาก เพราะกรดแลคติกที่เติมลงไปในอาหารนั้นจะเป็นตัวที่ช่วยเพิ่มกลิ่นและรสของอาหาร ช่วยควบคุมความเป็นกรด ด่าง ยืดอายุการเก็บของอาหาร ช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ และการงอกของสปอร์ ช่วยเสริมประสิทธิภาพของสารป้องกันการหืน และช่วยปรับปรุงลักษณะเนื้อของผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เป็นต้น (ศิวาพร, 2546) กรดแลคติกยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องหนัง เวชภัณฑ์ โลชั่น อุตสาหกรรมการทำพลาสติกในรูปของพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) (Fitzpatrick, 2003)

กรดแลคติกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตกรดแลคติกโดยวิธีการทางเคมีเป็นวิธีที่ใช้ค่าใช้จ่ายสูง และมีความยุ่งยากในช่วงการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากผลผลิตที่ได้จากกระบวนการทางเคมีจะเป็นกรดแลคติกผสม (D, L-Lactic) ส่วนการผลิตกรดแลคติกทางชีวภาพเป็นการนำจุลินทรีย์มาหมักกับสารตั้งต้น ซึ่งผลผลิตที่ได้จะอยู่ในรูป D-Lactic หรือ L-Lactic ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ นอกจากนี้สารตั้งต้นที่จุลินทรีย์ใช้นั้นสามารถนำวัสดุเหลือทิ้งหรือผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โมลาส เวย์ มาใช้แทนได้ จึงได้มีการศึกษาหาวิธีที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณมาก และเสียค่าใช้จ่ายในการลงทุนที่ต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิต ให้มีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะ และองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม (Senthuran และคณะ, 1999) การนำผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมมาเพิ่มมูลค่าเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นการลดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม และลดต้นทุนการผลิตเพราะมีราคาถูกหรือไม่มีมูลค่า เช่น เวย์ โมลาส เป็นต้น ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาลซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก พบว่าโรงงานอุตสาหกรรมเนยแข็งได้ผลิตผลพลอยได้ออกมา คือ เวย์ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม แต่มีประโยชน์เพราะในเวย์ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส น้ำ โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาเพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงส่วนประกอบของอาหารและกระบวนการผลิตกรดแลคติกให้ได้ผลผลิตสูงขึ้นอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ศึกษาการเจริญเติบโต และแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 โดยทำการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารสังเคราะห์

1.2.2 เปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เป็นการศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863 เพื่อทดลองหาสภาวะชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเปรียบเทียบในระดับฟลาสก์ กับถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการทางชีวภาพจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863
2. ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก
3. เป็นแนวทางของการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในระดับห้องทดลอง (lab scale) เพื่อประยุกต์ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กรดแลคติก (Lactic acid)

2.1.1 ความสำคัญของกรดแลคติก

กรดแลคติก หรือกรดนม ได้มีการค้นพบครั้งแรก โดย Scheele นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดนในปี ค.ศ. 1780 ในนมเปรี้ยว และได้ตั้งชื่อว่า Mjolksyra เป็นกรดชนิดแรก ๆ ที่มีการนำมาใช้ในอาหารพบตามธรรมชาติในนมเปรี้ยว กะหล่ำปลี ผักดองชนิดต่าง ๆ เบียร์ และเนยแข็ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในเลือด และกล้ามเนื้อของสัตว์ด้วย (Gardner, 1972)

กรดแลคติกมีคุณสมบัติดูดความชื้นได้ง่ายอาจอยู่ในรูปเป็นผลึก หรือของเหลวข้น ไม่มีสี มีกลิ่นครีมอ่อน ๆ ละลายน้ำได้ดี ให้รสเปรี้ยว ปานกลาง ในอุตสาหกรมอาหารมีการใช้กรดแลคติกเป็นสารที่ช่วยเพิ่มความเป็นกรด เป็นวัตถุกันเสีย เป็นส่วนผสมของสารที่ใช้ในการหมักเนื้อ เป็นสารให้กลิ่นรส เป็นสารช่วยเน้นกลิ่นรส ช่วยควบคุมความเป็นกรด ความเป็นด่าง และเป็นตัวทำละลาย เป็นต้น (FDA, 1988) ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้กรดแลคติก ได้แก่ แยม เยลลี เชอร์เบต ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน และเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ ซอส และผักดอง เป็นต้น โดยอาจจะใช้กรดแลคติกเพียงชนิดเดียว หรือรวมกับกรดชนิดอื่น ๆ (ศิวาพร, 2546)

สำหรับแคลเซียมแลคเตท มีการใช้ในผลิตภัณฑ์ผักผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพ็กติน ทำให้ผักและผลไม้มีความคงตัวมากขึ้น ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสีกลิ่นรสของผักและผลไม้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป โดยการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะที่ปนเปื้อนมา ช่วยทำให้เกิดเจลดีขึ้นในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ช่วยปรับปรุงคุณภาพของนมผง นมข้น นอกจากนั้นยังใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมสำหรับผู้ป่วยที่ขาดแคลเซียมด้วย โดยอาจจะเสริมในนม หรือในน้ำผลไม้ หรืออาหารอื่น ๆ หรืออาจบริโภคในรูปแคลเซียมแลคเตทได้เลย ส่วนผู้ขาดเหล็ก สังกะสี และแมกนีเซียม ก็สามารถบริโภคอาหารที่มีการเสริมด้วยเฟอรัสแลคเตท (ferrous lactate) ซิงค์แลคเตท (zinc lactate) และแมกนีเซียมแลคเตท (magnesium lactate) สำหรับในผลิตภัณฑ์ปลา เนื้อและสัตว์ปีก มีการใช้แลคติก หรือเกลือแลคเตท ช่วยในการยืดอายุการเก็บด้วย (Dailey และคณะ, 2000)

อนุพันธ์ของกรดแลคติก เช่น แลกทีเลตเตทโมโนและไดกลีเซอร์ไรด์ของกรดไขมัน (lactylated mono-and diglycerides of fatty acids) นิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ ขนมอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเฉพาะในแป้งเค้กสำเร็จรูปและเนยขาว เป็นต้น ส่วนแคลเซียมสเตียริล-2-แลกทิลเลต (calcium stearyl -2-lactylate) นิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมปัง (FDA. 1998)

2.1.2 คุณสมบัติของกรดแลคติก

คุณสมบัติทางกายภาพ

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก

ลำดับ	คุณสมบัติทางกายภาพ	กรดแลคติก
1	น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)	90.08
2	จุดหลอมเหลว (Melting point)	16.8 องศาเซลเซียส
3	จุดเดือด (Boiling point)	82 °C ที่ความดัน 0.5 มิลลิเมตรปรอท 122 °Cที่ความดัน 14 มิลลิเมตรปรอท
4	ค่าคงที่ของการแตกตัว (K_a ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)	1.37×10^{-4}
5	ค่าความร้อนของการเผาไหม้ ($\triangle H_c$)	1361 กิโลจูล/โมล
6	ค่าความร้อนจำเพาะ (Cp ที่อุณหภูมิ 20 °C)	190 จูล/โมล/องศาเซลเซียส

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

คุณสมบัติทางเคมี

กรดแลคติกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydorpropionic acid สูตรโมเลกุล $C_3H_6O_3$ ซึ่งมี 2 ไอโซเมอร์ คือ ดังแสดงในรูปที่ 2.1

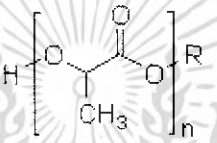
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดแลคติกชนิด L (+) lactic acid และชนิด D (-) lactic acid

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

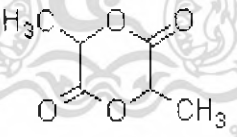
การเปลี่ยนรูปของ D (-) lactic acid และ L (+) lactic acid เกิดจากการหมุนของเอทิลีนออกไซด์บริดจ์ (ethylene oxide bridge) ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่หนึ่งและอะตอมที่สอง โดยเกิด tautomeric shift ของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) บนคาร์บอนอะตอมที่สองไปเป็นหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ของคาร์บอกซิล (carboxyl) กรดแลคติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสารปนเปื้อน กรดแลคติกสามารถละลายน้ำ เอทานอล อะซีโตน อีเทอร์ และไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียม อีเทอร์ คาร์บอนซัลไฟด์ (Narayanan และคณะ, 2004)

พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid) เกิดจากกรดแลคติกรวมกันหลายๆ โมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของกรดโพลีแลคติกแอซิด
ที่มา : www.cem.msu.edu/~smithmr/Lactide.htm

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



รูปที่ 2.3 ไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลคติก
ที่มา : Sodergard และ Stolt (2002)

กรดแลคติกที่สิ่งมีชีวิตผลิตได้จะมีประมาณความเข้มข้นต่ำ โดยกรดแลคติก ความเข้มข้นสูงเป็นอันตรายต่อร่างกายทั้งภายนอก และภายในเมื่อกรดสัมผัสกับผิวหนังจะมีลักษณะของแผลเหมือนถูกไฟลวก เมื่อกรดแลคติกถูกดวงตาสามารถทำให้ตาบอดได้ ในกรณีที่กรดถูกดวงตา หรือผิวหนัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควรล้างออกด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง การผลิตกรดแลคติกสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ

2.1.3 กระบวนการผลิตกรดแลคติก

2.1.3.1 กระบวนการผลิตกรดแลคติกทางเคมี ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 นำไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) ทำปฏิกิริยากับอะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ได้แลคโทไนไตร (lactonitrile) ทำปฏิกิริยาที่ความดันบรรยากาศ ดังแสดงในสมการที่ 2.1

$$CH_3CHO + HCN \longrightarrow CH_3CHOHCN \quad \text{.....(2.1)}$$

Acetaldehyde hydrogencyanide lactonitrile

ขั้นตอนที่ 2 นำแลคโทไนไตร มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟิวริก จะได้กรดแลคติก และเกลือแอมโมเนียม ซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง ดังสมการที่ 2.2

$$CH_3CHOHCN + H_2O + 1/2\ H_2SO_4 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + 1/2\ (NH_4)_2SO_4 \quad \text{.....(2.2)}$$

Lactonitrile water sulphuric acid lactic acid ammonium salt

ขั้นตอนที่ 3 นำกรดแลคติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำเป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ คือ เมทิลแลกเตต นำเมทิลแลกเตตมากลั่น แล้วนำมาย่อยจะได้กรดแลคติก ส่วนเมทานอล ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) และสารปนเปื้อนอื่น ๆ จะถูกกำจัดออกโดยนำมาผ่านถ่านกัมมันต์ และวิธีแลกเปลี่ยนไอออน (ionexchange) ดังแสดงในสมการที่ 2.3 และ 2.4

$$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOHCOOH_3 + H_2O \quad \text{.....(2.3)}$$

lactic acid methanol methyl lactate water

ขั้นตอนที่ 4

$$CH_3CHOHCOOH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \quad \text{.. ....(2.4)}$$

methyl lactate water lactic acid lactic acid methanol

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.2 การผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกิตกมี 2 ชนิด คือ โฮโมแลคติกแบคทีเรีย (Homolactic bacteria) และเฮทเทอร์โรแลคติกแบคทีเรีย (Heterolactic bacteria) ซึ่งขั้นตอนในการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงดังสมการที่ 2.5 และ 2.6 (Muller, 2001)

Homofermentative

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ CH_3CHOHCOOH$ .. ..(2.5)

Glucose lactic acid

Heterofermentative

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ CH_3CHOHCOOH + CH_2OH + CO_2$ ....(2.6)

Glucose lactic acid ethanol carbon dioxide

ที่มา : Muller (2001)

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

Rukas และ Kotzekidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactococcus lactis* พบว่า การหมักแบบกะโดยเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ *L. casei* ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 30 กรัมต่อลิตร *Lactococcus lactis* ให้ปริมาณกรด 25 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงแบบเซลล์ผสมปริมาณกรดแลคติกจะสูงถึง 45 กรัมต่อลิตร

Pauli และ Fitzpatrick (2002) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และมีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งไนโตรเจนสังเคราะห์ที่มีราคาแพง โดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด และสารสกัดจากมอลต์ลงไป แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตมอลต์เปรียบเทียบกับยีสต์สกัด โดยเชื้อ *L. casei* พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้ให้ผลผลิตเทียบเท่ากับยีสต์สกัด แต่มีข้อเสียคือ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิต ผลผลิตที่ได้จะไม่มีความบริสุทธิ์ และต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการทำให้ผลผลิตมีความบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส กาแลคโตส แลคโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์ และแป้ง โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่า ปริมาณกรดแลคติกจะสูงเมื่อใช้กลูโคส ฟรุกโตส และมอลโตส เป็นสารตั้งต้น

Bulut และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ซูโครส กลูโคส โมลาส ฝักถั่วและรำข้าวสาลี โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงเมื่อใช้กลูโคส เป็นสารตั้งต้น

Wee และคณะ (2004) ได้นำโมลาสซึ่งมีซูโครสเป็นองค์ประกอบมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาเป็นสารตั้งต้น นำมาผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงถึง 95.7 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 94.9

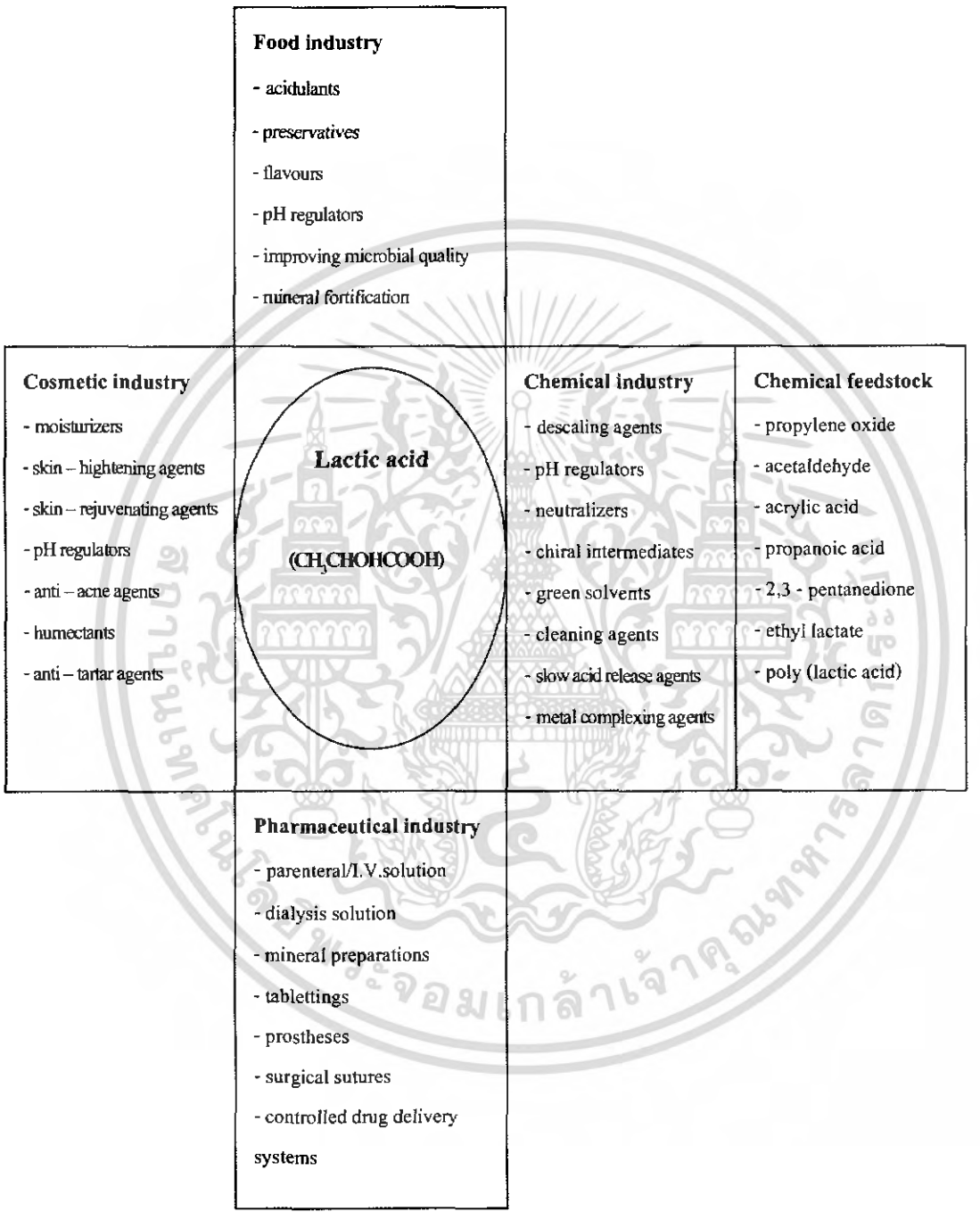
Huang (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูง ประมาณ 0.85 - 0.92 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้มีค่าสูงใกล้เคียงกัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 การประยุกต์ใช้กรดแลคติก



รูปที่ 2.4 เทคโนโลยีการผลิตกรดแลกติกและการนำมาประยุกต์ใช้

ที่มา : Wee และคณะ (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก

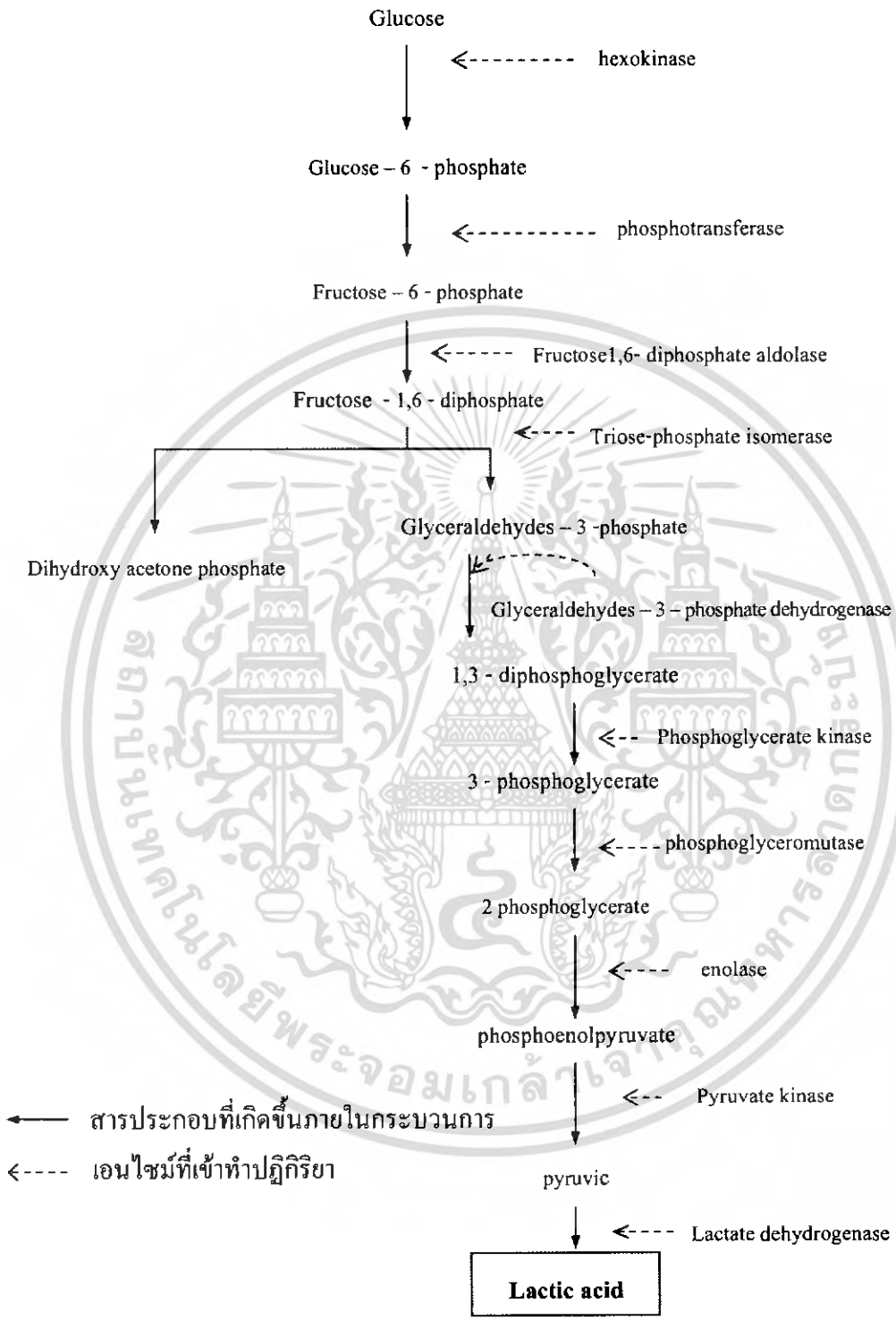
แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) จัดอยู่ในแฟมมิลี Lactobacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส ไม่มีไซโตโครมทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนกรด มีทั้งลักษณะรูปร่างกลม และรูปร่างท่อน (Salminen, 1998) ในการเจริญใช้พลังงานจากกระบวนการหมัก (fermentation) น้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสมีความต้องการอาหารที่สมบูรณ์ (complex medium) ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียแลคติก คือความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ซึ่งทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผักดอง เนยแข็ง แบคทีเรียแลคติกมีบทบาทในการหมักอาหาร และเครื่องดื่มหลายชนิดด้วยเช่นกัน เช่น นม เปรี้ยว เนยชนิดต่าง ๆ ผัก และผลไม้ดอง ไส้กรอก เบียร์ ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่าง ๆ แบคทีเรียแลคติก ต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังต้องการวิตามิน และเกลือแร่อีกหลายชนิดในการเจริญ ซึ่งความต้องการสารอาหารต่าง ๆ เหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิด และสายพันธุ์ (Priest และ Campbell, 1996) Orla-Jensen (1919) เป็นผู้เริ่มจัดอนุกรมวิธานแบคทีเรียแลคติกอย่างเป็นระบบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส แบ่งได้ 2 ชนิด ดังนี้

2.2.1 โฮโมแลคติกเฟอร์เมนเทชั่น (Homolactic fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยกลุ่มโฮโมเฟอเมนเตทีฟ (homofermentative) โดยกลไกการเกิดกรดแลคติก คือ การเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูวิกแอซิด (pyruvic acid) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ด้วยวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) แล้วเปลี่ยนไพรูวิกแอซิดเป็นกรดแลคติก ดังรูปที่ 2.5

2.2.2 เฮทเทอโรแลคติกเฟอร์เมนเทชั่น (Heterolactic fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลคติก เทอธานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก โดยกระบวนการหมักได้จากกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) ดังรูปที่ 2.6

ปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกออกเป็น 12 สกุล (Salminen, 1998) ได้แก่ *Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Vagococcus, Aerococcus, Pediococcus, Tetragenococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Weissella, Lactobacillus* และ *Carnobacterium* แสดงลักษณะ และความแตกต่างของแบคทีเรียแลคติกแต่ละสกุลแสดง ดังตารางที่ 2.2

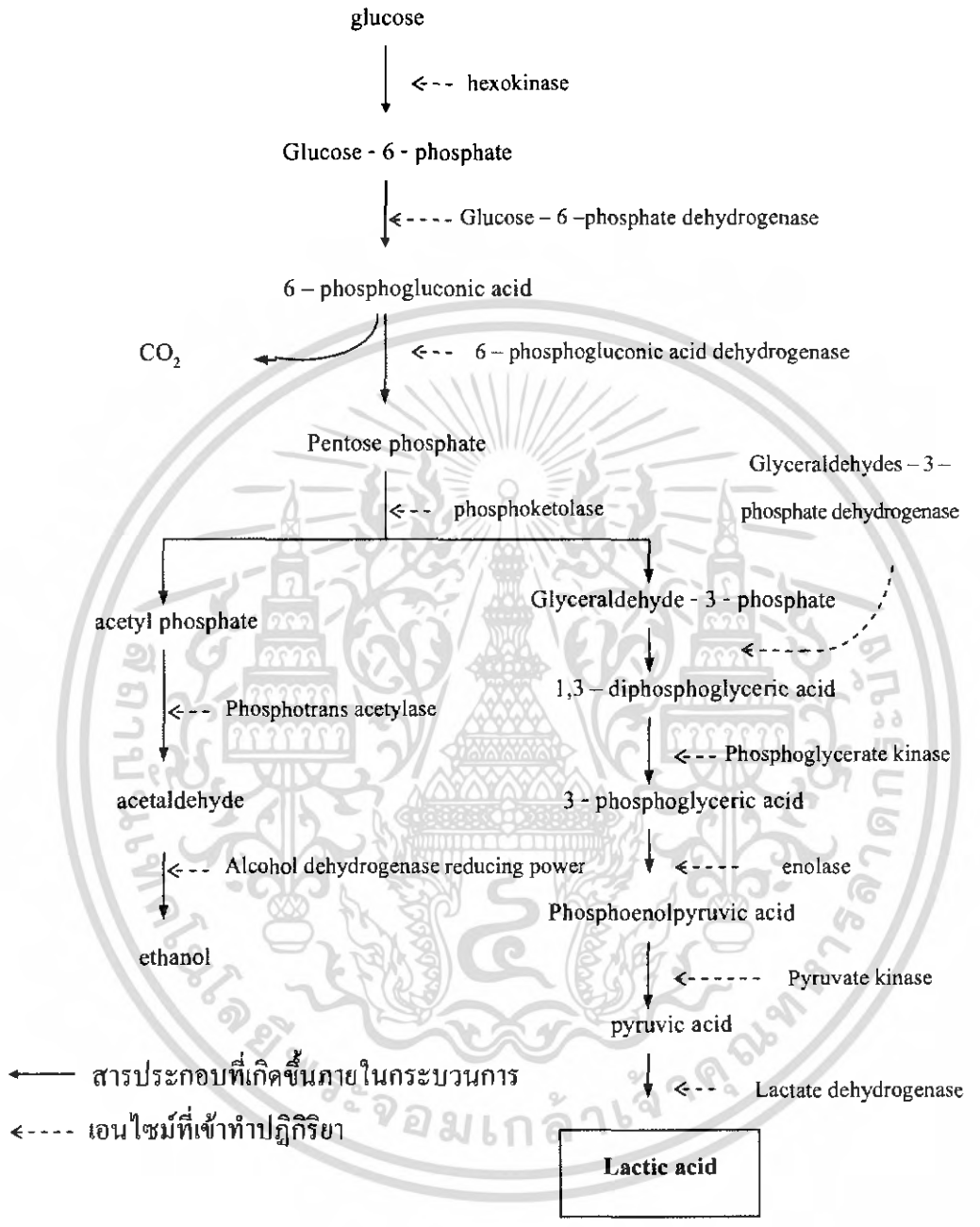
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 กลไกการผลิตกรดแลคติก ด้วยวิถีไกลโคไลซิสโดยแบคทีเรียกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.6 กลไกการผลิตกรดแลคติก โดยแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียแลคติก

ลักษณะ	รูปร่างท่อน		รูปร่างกลม							
	Carnob.	Lactob.	Aaeroc.	Enteroc.	Lactoc. Vagoc.	Leucon. Oenoc.	Pedioc.	Ttreptoc.	Tetragcnoc.	Weissella
1. เซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
2. ผลิต CO_2 จากกลูโคส	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
3. เจริญที่ 10 องศาเซลเซียส	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
4. เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
5. เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 6.5%	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±
6. เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 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)

Lactobacillus sp. เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลายหลายของลักษณะฟีโนไทป์ คุณสมบัติทางชีวเคมี และทางสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G + C ภายในสกุลสูงระหว่างร้อยละ 32-53 (Bd, Tm) สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 22-53 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่ 30-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5.5-6.2 หรือเจริญได้ที่ พีเอช 5.0 หรือต่ำกว่านี้ได้

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

Obligately homofermentative

Facultative heterofermentative

Obligately heterofermentative

ลักษณะความแตกต่างของแต่ละกลุ่มแสดงความแตกต่างดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ลักษณะและความแตกต่างของ *Lactobacillus* sp.

ลักษณะ	กลุ่ม I Obligately homofermentative	กลุ่มII Facultatively heterofermentative	กลุ่ม III Obligately heterofermentative
การหมักน้ำตาลเพนโตส	-	+	+
การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส	-	-	+
การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคเนส	-	+	+
เอนไซม์ FDP aldolase	+	+	-
เอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส	-	+	+
ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียแลคติก	*L. acidophilus* *L. delbruckii* *L. helveticus* *L. Salivarius*	*L. casei* *L. curvatus.* *L. plantarum* *L. sakei*	*L. brevis* *L. buchneri* *L. fermentum* *L. reuteri*

ที่มา : Salminen และคณะ (1998)

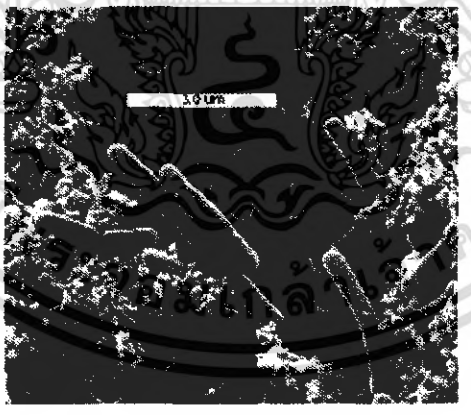
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส (มากกว่าร้อยละ 85) เป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ Fructose-1,6-bisphophate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส ดังนั้นจึงไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโตส และกลูโคเนตได้ (Wood และ Holzapfel, 1995)

กลุ่ม Facultative heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส เป็นกรดแลคติก โดยวิถี Embden-Meyerhof-Parnad (EMP) จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์อัลโดเลส และ เอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส ดังนั้นจึงหมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโตสได้ (Wood และ Holzapfel, 1995)

กลุ่ม Obligate heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโตสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนต เป็นแลคเตท เอทานอล (กรดอะซิติก) และคาร์บอนไดออกไซด์ (Wood และ Holzapfel, 1995)

Lactobacillus sp. เป็น facultative anaerobic จัดอยู่ในกลุ่ม facultative heterofermentative lactobacilli แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นท่อน ขนาด 0.7-1.1 x 2.0-4.0 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.7 แบคทีเรียแลคติกที่มีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรม พบในน้ำนม ผลิตภัณฑ์จากพืช และสามารถพบได้ในบริเวณลำไส้ของมนุษย์ และสัตว์ด้วย *L. casei* สายพันธุ์ชิโรต้า เป็นสายพันธุ์หลักในการผลิตนม นอกจากนี้ได้มีการนำ *L. casei* ไปใช้ในงานวิจัย และอุตสาหกรรมต่าง ๆ



รูปที่ 2.7 ลักษณะของ *Lactobacillus casei*

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก

2.3.1 แหล่งคาร์บอน

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์ โดยเชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าเมื่อนำเวย์มาเติมกลูโคสลงไป 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับยีสต์สกัดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าจะสามารถผลิตกรดแลคติกได้เพิ่มขึ้น

Yun และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตกรดแลคติก จากเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลคโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์ และแป้ง พบว่าใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลมอลโตส ทำให้สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงถึง 18.18, 17.95 และ 16.80 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนน้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลคโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์ และแป้ง จะให้ปริมาณกรดแลคติก 2.7, 1.26, 2.24, 1.68, 1.83 และ 1.19 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีปริมาณกรดต่ำ

Yun และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ โดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อเซลล์เจริญในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณการผลิตจะอยู่ระหว่าง 5.2 – 6.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กรดแลคติกที่ได้คิดเป็น 0.96 กรัมต่อแหล่งคาร์บอน การผลิตกรดแลคติกจากกลูโคส ฟรุกโตส และมอลโตส โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 สามารถให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูง

Bulut และคณะ (2004) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส โมลาส ฝักถั่ว และรำข้าวสาลี พบว่ากลูโคสให้กรดแลคติกในปริมาณสูง เช่นเดียวกับที่ใช้น้ำตาลจากฝักถั่วซึ่งให้ปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 58 กรัมต่อลิตร

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากโมลาสในการผลิตกรดแลคติก โดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 7.0 ได้ปริมาณกรดแลคติก 95.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94.9

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

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด โดยใช้เอนไซม์มาย่อยแล้วจึงนำไปผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าเมื่อใช้ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลีเป็นสารตั้งต้นจะให้ปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กรดแลคติกมากกว่า 0.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่ออาหารประกอบด้วยแป้งสาลีที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 200 กรัมต่อลิตร แป้งข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตจะสูงถึง 5.36 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณเซลล์จะสูงถึง 14.08 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้แป้งสาลีเพียงอย่างเดียว

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส แลคโตส กาแลคโตส ไซโลส มอลโตส ที่สามารถให้ปริมาณกรดที่สูง โดยเชื้อ *L. delbrueckii* พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูงที่สุด

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเศษอาหารเหลือทิ้งจากโรงอาหาร โดยเชื้อ *L. manihotvorans* พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 19.5 กรัมต่อ 200 กรัม สารตั้งต้น

Tanaka และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกในรูปของ D-form จากรำข้าวซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้สูงถึง 9.2 กรัมต่อลิตร

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

2.3.2 แหล่งไนโตรเจน

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ถั่วเหลือง และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในเวย์ โดยใช้กลูโคสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดีและเหมาะสมที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก ได้แก่ ยีสต์สกัด

Kulozik และ Wilde (1999) พบว่าเมื่อเติมยีสต์สกัดลงไปในเวย์จะทำให้ชีวมวล และปริมาณกรดเพิ่มขึ้น แต่เมื่อไม่เติมยีสต์สกัดทำให้การเจริญของเซลล์ และปริมาณกรดน้อยตามไปด้วย

Fitzpatrick และ O′Keeffe (2001) ศึกษาอิทธิพลของการเติม whey protein hydrolysate (WPH) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนลงไปใน whey permeate สำหรับการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. helveticus* พบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสในเวย์ให้เป็นกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงภายในระยะเวลา 40-30 ชั่วโมง

Nancib และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *L. casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตกรดแลคติกได้ดี คือ ยีสต์สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

72576

Altaf และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วเบงกอล ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และเบเกอร์ยีสต์ ที่เติมลงในแป้งซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. amylophilus* GV 6 พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้จะสูงถึงร้อยละ 92

Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปทิซอย ยูเรีย เปปโตน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัม พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนส่งผลต่อปริมาณกรดแลคติกจะสูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตร

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพด ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์ โดยเชื้อ *L. delbrueckii* NCIM 2365 พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงถึง 89 กรัมต่อลิตร

2.3.3 แหล่งแร่ธาตุ

Fitzpatrick และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. casei* ที่มีการเติมแมงกานีสในรูปของแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) ร่วมกับยีสต์สกัดลงไปในเวย์ พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดจะสั้นลง และเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสได้ดี แต่เมื่อไม่มีการเติมแมงกานีสเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดจะนานขึ้น และเชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ได้ดีเท่าที่ควร

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

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้ง และอาหารเหลือทิ้งจากร้านอาหาร โดยเชื้อ *L. manihotivorans* LMG 18011 พบว่าเมื่อเติมแมงกานีสลงไป ปริมาณกรดแลคติกที่ได้จะสูงกว่าการที่ไม่เติมแมงกานีส

2.3.4 อุณหภูมิ

Idris และSuzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรด โดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาอุณหภูมิที่ระดับ 27, 30, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2.3.5 ค่าพีเอช

Wenge Fu และ A.P Mathew (1999) ศึกษาอิทธิพลของพีเอช สารตั้งต้น และปริมาณออกซิเจน ในการผลิตกรดแลคติก จากน้ำตาลแลคโตส โดยใช้เชื้อ *L. plantarum* พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมของเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกอยู่ในช่วง 5.0-6.0 และการเลี้ยงในสภาวะไม่มีอากาศ (Anaerobic) จะให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะให้อากาศ (Aerobic) 2.3 เท่า

Idris และ Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก จากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรดโดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วและให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูง

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

2.4 High-performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC เป็นวิธีการหนึ่งของการแยกทางโครมาโทกราฟี ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นของเหลวพาสารละลายตัวอย่างไหลผ่านเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) ที่เป็นอนุภาคเล็กซึ่งบรรจุอัดแน่นในท่อสแตนเลส ที่เรียกว่าคอลัมน์ (Column) ทำให้เกิดการแยกสารประกอบจากสารละลายตัวอย่างเข้าสู่เครื่องตรวจวัดสัญญาณ (Detector) การไหลของเฟสเคลื่อนที่นี้ต้องอาศัยแรงดันมากพอสมควร จึงจะสามารถส่งผ่านไปทั้งระบบได้ ส่วนที่เป็นหลักในการสร้างแรงดันคือปั๊ม (Pump) นั่นเอง

ดังนั้นคำว่า HPLC จึงมีความหมายได้ว่า

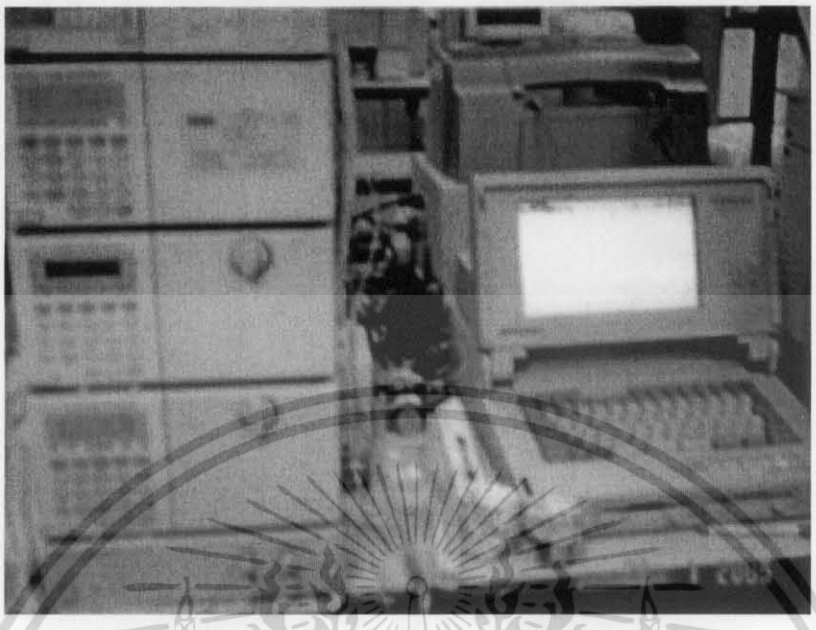
High Performance Liquid Chromatography

High Pressure Liquid Chromatography

High Speed Liquid Chromatography

รูปเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) ดังแสดงในรูปที่ 2.8

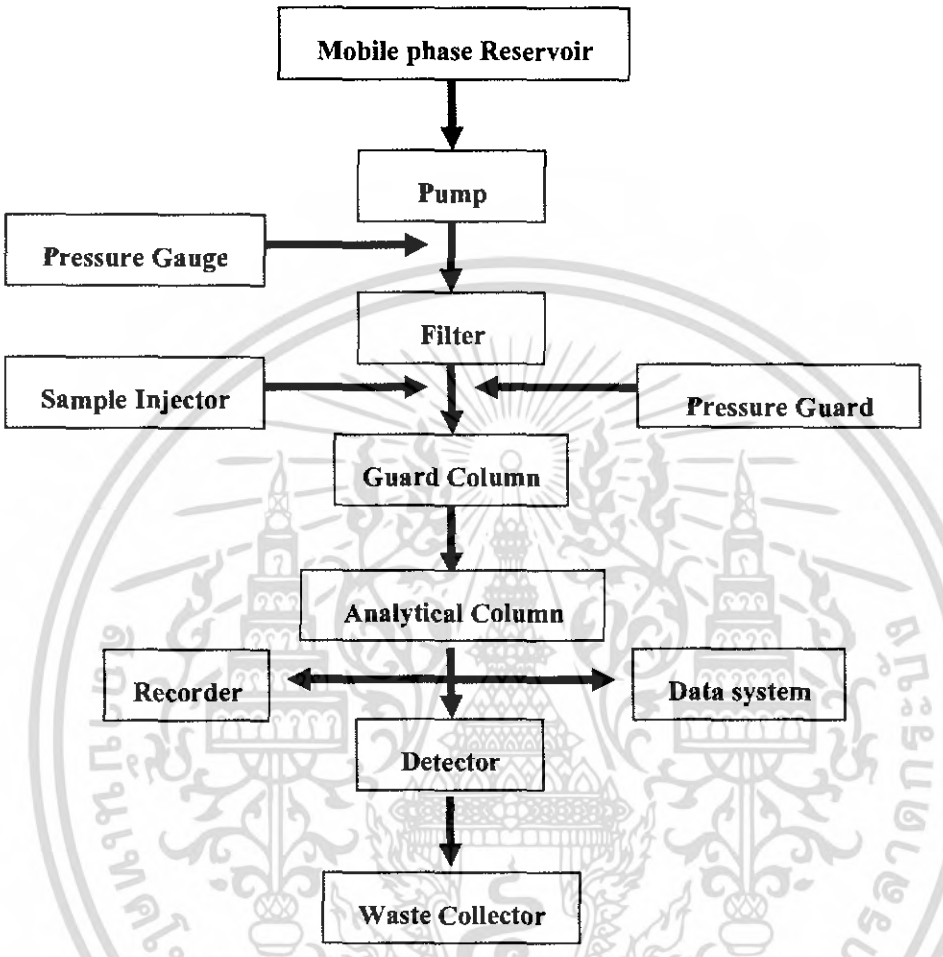
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 รูปเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC)
ที่มา : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC



2.4.1.1 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase reservoir)

ภาชนะที่บรรุเฟสเคลื่อนที่ ควรเป็นขวดแก้วเพื่อที่จะได้ไม่เกิดปฏิกิริยาทางเคมีใด ๆ กับเฟสเคลื่อนที่ ในปัจจุบันขวดที่ใส่เฟสเคลื่อนที่นี้จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น ก๊าซออกซิเจน จุดประสงค์ของการไล่อากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ก็คือ ต้องการกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่กับเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหาขณะทำการทดลอง

สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ และสารละลายของเกลือชนิดต่างๆ ที่ถูกปรับพีเอชให้มีค่าที่เหมาะสมกับการแยก ในกรณีที่ใช้น้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ ควรบรรจุในขวดแก้วสีชาเพื่อลดความเข้มของแสงที่จะทำให้แบคทีเรีย หรือจุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำเจริญเติบโตได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติที่ดีของเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ใน HPLC คือ

1. มีความบริสุทธิ์สูง
2. ละลายสารตัวอย่างได้ดี
3. มีความหนืดต่ำ
4. ปราศจากผง ฝุ่น และอนุภาคที่จะทำให้ระบบอุดตัน
5. เหมาะสมกับเครื่องวัดสัญญาณ (Detector)
6. ไม่ทำปฏิกิริยากับเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase)
7. ปัจจัยอื่น ๆ ที่ควรคำนึงถึง คือ ความเป็นพิษ จุดเดือด การติดไฟ และราคา

2.4.1.2 ระบบของปั๊ม (Pumping system)

ทำหน้าที่สูบดันเฟสเคลื่อนที่เข้าคอลัมน์ในอัตราเร็วที่กำหนดได้อย่างแม่นยำ โดยความดันของระบบจะขึ้นอยู่กับอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ ถ้ากำหนดให้มีอัตราเร็วในการไหลของเฟสเคลื่อนที่สูง ความดันของปั๊มก็จะเคลื่อนที่สูง โดยปกติความดันที่ใช้ในเครื่อง *HPLC* ไม่ควรเกิน *400* บาร์ ซึ่งถ้าขณะอ่านผลผ่านเครื่องโครมาโทแกรม (chromatogram) ความดันของปั๊มเกิดลดลงอย่างมากจนเกือบ 0 บาร์ แสดงว่าต้องมีการรั่ว (leak) ในเครื่องให้ตรวจสอบและแก้ไข ในทางตรงกันข้ามถ้าความดันมีค่าสูงเกิน *400* บาร์แสดงว่ามีสิ่งอุดตันในระบบ ต้องตรวจสอบและแก้ไข โดยระบบปั๊มมี 2 ชนิด ได้แก่

(1) Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตรการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่ ปั๊มประเภทนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

- Syringe pump เป็นปั๊มที่มีลักษณะเป็นทรงกระบอกสูบ

- Reciprocating เป็นปั๊มที่มีลักษณะเป็นแบบชักลูกสูบ

(2) Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

หลักการเลือก Pumping system

- ปั๊มและส่วนประกอบต้องทำด้วยวัสดุที่ทนต่อการสึกกร่อนด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ และสะดวกต่อการบำรุงรักษา

- ปั๊มเฟสเคลื่อนที่ในปริมาตรมาก ๆ ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีค่าขัดข้อง

- สามารถให้ความดันได้ถึง 4,000 ถึง 6,000 psi เพื่อปั๊มผ่านคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กได้ อย่างน้อยต้องให้ความดันถึง 500 psi

- สามารถให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงถึง 3 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นอย่างน้อยและคงที่

- ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต้องไม่เกินร้อยละ 1 ถึง 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ควรมีปริมาตรภายใต้ความดันต่ำเพื่อความสะดวก และรวดเร็วในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

2.4.1.3 หน่วยฉีดสสารตัวอย่าง (Injection Unit)

การฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์ต้องมีความเที่ยงตรง และแม่นยำสูง ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ต้องไม่เกินขีดจำกัด หรือทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง โดยทั่วไปแล้ว Injection มีให้เลือกใช้ทั้งชนิดอัตโนมัติ และไม่อัตโนมัติ

2.4.1.4 คอลัมน์ (Column)

ในส่วนของคอลัมน์ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Guard column และ Analysis column

- **Guard column** โดยปกติส่วนมากที่ใช้มีขนาด 5.0 เซนติเมตร x 4.6 เซนติเมตร วัสดุที่บรรจุภายในเครื่องเป็นประเภทเดียวกับคอลัมน์ที่ใช้แยก แต่มีอนุภาคใหญ่กว่าหรือเท่ากันกับคอลัมน์ ทำหน้าที่กรอง อนุภาคขนาดเล็ก ช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมภ์สำหรับงานวิเคราะห์ (Analysis column)

- **Seperating column** โดยมากทำด้วยสแตนเลสซึ่งทนต่อความดันสูงๆได้ดี ผิวด้านในเรียบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากันตลอด โดยปกติที่ใช้งานทั่วไปมีขนาดดังนี้

เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก	6.35	มิลลิเมตร (1/4 นิ้ว)
เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน	4.6	มิลลิเมตร
ความยาว	10-100	เซนติเมตร
ขนาดของอนุภาค	5.50	ไมโครเมตร

แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

- **คอลัมน์สำหรับงานวิเคราะห์ (Analytical column)** เป็นคอลัมน์ที่ใช้งานสำหรับงานวิเคราะห์คุณภาพทางปริมาณ ในวิธี HPLC

- **คอลัมน์สำหรับเตรียมตัวอย่าง (Preparative column)** เป็นคอลัมน์ที่ใช้แยกสารผสมออกจากกัน แล้วเก็บแต่ละส่วนที่แยกออกจากกันได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นต่อไป

2.4.1.5 เครื่องตรวจวัด (Detector) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

(1) Solute property หรือ Selective detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น

- UV – VIS Detectors

หลักการ คือ อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง นิยมใช้กันมากใน HPLC เพราะเครื่องตรวจนี้มีลักษณะพิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหล และอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างจะมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) Fixed wavelength UV detector

2) Variable UV detector

3) *Photodiode array detector* (PDA)

- Fluorescent Detector

มีสภาพไวสูงและเฉพาะ เนื่องจากมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ออกมาจากตัวละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวีจากแหล่งกำเนิด โดยผ่านเครื่องกรองแสง หรือโมโนโครเมเตอร์ เพื่อให้แสงที่มีความยาวคลื่นตามที่ต้องการผ่านเข้าไปยัง flow cell ที่ใส่สารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์ สารตัวอย่างจะให้ฟลูออเรสเซนต์ออกมาซึ่งมีความยาวคลื่นเฉพาะจะผ่านไปยังฟิลเตอร์ หรือโมโนโครเมเตอร์เพื่อตัดแสงที่ไม่ต้องการออก จากนั้นจึงให้แสงผ่านเข้าไปยังดีเทคเตอร์ซึ่งเป็นโฟโตเซลล์

(2) Bulk property หรือ General detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมกับตัวถูกละลาย

เครื่องดิฟเฟอเราเชียล รีแฟรกโตทิเตอร์ (Differential refractometers)

ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดรรชนีหักเห (refractive index, IR) อย่างต่อเนื่องระหว่างเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายอยู่ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ ให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด ตราบที่ตัวถูกละลายมีค่าดรรชนีหักเหแสงต่างจากเฟสเคลื่อนที่ โดนเครื่องวัด IR มีอยู่ 3 ชนิด คือ เครื่อง Fresnel refractometer, Deflection refractometer และ Interferometric refractometer

2.4.1.6 เครื่องบันทึกข้อมูล และประมวลผล (Recorder and Data procession)

ปัจจุบันการบันทึกข้อมูลและประมวลผลต่างๆ สามารถทำได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (software computer) ที่บริษัทผู้ผลิตเครื่องมือเป็นผู้สร้างขึ้น และระบบการทำงานของเครื่องมือทั้งหมดถูกควบคุมได้ด้วยคอมพิวเตอร์ ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง และเที่ยงตรงมากขึ้น ข้อมูลที่ถูกบันทึกไว้ในคอมพิวเตอร์ทำให้ผู้วิเคราะห์มีความสะดวก และง่ายในการนำข้อมูลมาประมวลผล และเก็บผลนั้นไว้ได้โดยไม่สิ้นเปลืองกระดาษบันทึกผล

2.4.2 ขั้นตอนในการใช้ HPLC

2.4.2.1 การเตรียมสารละลายที่จะใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่

การเตรียมสารละลายของเฟสเคลื่อนที่ให้มีความเข้มข้น และปริมาณตามที่ต้องการ ซึ่งขึ้นอยู่กับเรื่องที่จะทำการทดลอง และต้องการรอเฟสเคลื่อนที่ด้วยแผ่นเมมเบรนขนาด 0.2 หรือ 0.45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครเมตร ก่อนนำไปใช้ด้วยชุดกรอง ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรนต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของตัวทำละลายด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรน ที่เหมาะสมกับตัวทำละลายแต่ละชนิด

ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรน	ตัวทำละลายที่เหมาะสม
Cellulose	ใช้ได้กับสารละลาย Aqueous
Nitrocellulose	ใช้ได้กับสารละลาย Aqueous
Nylon 66 R	ใช้ได้ทั้งสารละลาย Aqueous และ Non Aqueous แต่ไม่เหมาะสมกับกรด หรือเบสแก่

ในกรณีที่ไม่ได้ติดตั้ง Online degasser ให้นำสารละลายที่กรองแล้วนี้ ไปทำการไล่ฟองอากาศออก ด้วยการ Purge ด้วยก๊าซฮีเลียมหรือนำไปเข้าเครื่อง Ultrasonic bath เป็นเวลา 15 ถึง 30 นาที ก่อนใช้งาน

2.4.2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ตัวอย่างที่จะนำเข้าไปฉีดในระบบต้องสะอาดเพียงพอ คือปราศจากสิ่งปนเปื้อนที่จะไปทำลายประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ทำการวิเคราะห์ และต้องไม่ให้มีตะกอนหรือฝุ่นผง ดังนั้นตัวอย่างต้องผ่านขั้นตอนในการเตรียมที่เหมาะสมเพื่อขจัดมลทินออกไป วิธีกำจัดสิ่งปนเปื้อนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น Liquid – Liquid Extraction, Solid – Phase Extraction และ Supercritical Fluid Extraction

เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างนั้น ๆ แล้ว ก่อนฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ควรกรองตัวอย่างด้วย syringe membrane filter ขนาด 0.20 ไมโครเมตรก่อน

หมายเหตุ เฟสเคลื่อนที่ และตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างควรเป็นเกรด HPLC เพื่อผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ด้วย

2.4.2.3 การเลือกคอลัมน์ และเฟสเคลื่อนที่ (Column selection and Mobile phase selection)

เมื่อต้องการอ่านผลผ่านเครื่องโครมาโทแกรม (chromatogram) ของสารตัวอย่าง ต้องศึกษาคุณสมบัติของสารตัวอย่าง เพื่อเลือกคอลัมน์ และเฟสเคลื่อนที่ให้ถูกต้อง ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดในการทำการทดลอง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิด และคุณสมบัติของสารตัวอย่าง

ปัจจุบันคอลัมน์ที่นิยมนำมาใช้ ในการวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทต่าง ๆ คือ bond – phase column ที่มีหมู่ฟังก์ชันนอลได้หลายชนิด มีทั้งที่มีขั้ว (polar) เช่น ไซยาโน (cyano) หรืออะมิโน (amino)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ทำให้เกิดการวิเคราะห์แบบ normal phase) และชนิดไม่มีขั้ว (non polar) เช่น ออกตะเดซิล (octadecyl) (ทำให้เกิดการวิเคราะห์แบบ reverse phase) โดยคอลัมน์ที่นิยมใช้มากกว่า คือ reverse phase column ชนิด C_8 หรือ C_{18} ซึ่งสามารถแยกได้ทั้งสารตัวอย่างที่มีขั้ว และไม่มีขั้ว ในกรณีของตัวอย่างที่มีขั้วจะใช้หลักการของ ion – pair เมื่อต้องการให้เกิดการแยกสามารถใช้วิธีปรับเปลี่ยนค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่หรือความเข้มข้นของ pairing ion ในกรณีของสารตัวอย่างไม่มีขั้ว สามารถทำให้เกิดการแยกได้โดยปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่

2.4.2.4 การอ่านผล

ทำการศึกษาวิธีการใช้เครื่อง HPLC อย่างละเอียดก่อนลงมืออ่านผลผ่านเครื่องโครมาโทแกรม (chromatogram) เมื่ออ่านผลเสร็จแล้ว ข้อมูลต้องถูกบันทึกไว้ในแฟ้ม (folder) ที่จำเพาะของการเก็บข้อมูล และเป็นของแต่ละผู้วิเคราะห์ ไม่ควรปะปนกัน เพื่อความสะดวกในการเรียกข้อมูลมาทำการประเมินและแปรผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการโครงงานพิเศษ

3.1 อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท SHIMADZU รุ่น C-R7 Ae plus

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

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

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

เครื่องเขย่า (Shaker) ของบริษัท Gallenkamp

เครื่องอบลมร้อน ของบริษัท Binder

โถดูดความชื้น (Desicator)

ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)

เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX

กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX

บีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX

ปิเปตต์ (Pipette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป MRS

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)

เปปโตน (Peptone)

ยูเรีย (Urea)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($NH_2 SO_4$)

กลูโคส (Glucose)

Tween 80

วุ้น (Agar)

น้ำกลั่น

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ไฮโดรคลอริก (HCl)

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

โพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)

ฟอสฟอริก ($H_3 PO_4$)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

ใช้เชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติก จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ แล้วลาก (Streak) ลงในอาหารแข็ง (MRS agar) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกใส่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (Subculture) ทุก ๆ 2 สัปดาห์

3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เชื้อที่ใช้ในการศึกษา คือ *L. casei* ATCC 10863 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง (MRS agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ ทุก ๆ 2 สัปดาห์

การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว (MRS broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

3.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863

ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหาร 7 สูตร ดังตารางที่ 2.5

3.4.2.1 สูตรอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) (Altaf, 2005)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

สูตรอาหาร / สารเคมี	สูตร 1 (กรัมต่อลิตร)	สูตร 2 (กรัมต่อลิตร)	สูตร 3 (กรัมต่อลิตร)	สูตร 4 (กรัมต่อลิตร)	สูตร 5 (กรัมต่อลิตร)	สูตร 6 (กรัมต่อลิตร)	สูตร 7 (กรัมต่อลิตร)
Yeast extract	5	5	5	5	-	-	-
Peptone	10	-	-	-	10	10	10
Urea	-	10	-	-	5	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	10	-	-	5	-
$NaNO_3$	-	-	-	10	-	-	5
Glucose	40	40	40	40	40	40	40
K_2HPO_4	1	1	1	1	1	1	1
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่เติม

3.4.2.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งหมด 7 สูตรอาหาร ดังตารางที่ 2.5 เตรียมโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

- ละลายน้ำตาลกลูโคสในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ผสมส่วนผสมทั้งสองโดยวิธีปลอดเชื้อ ในตู้ปลอดเชื้อ

2) เติมหัวเชื้อที่บ่มเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ร้อยละ 5 ลงในอาหารที่เตรียมไว้ทั้ง 7 สูตร โดยให้มีปริมาตรอาหารรวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิตร

3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

4) เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุก ๆ 12 ชั่วโมงโดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 96 เพื่อหาปริมาณชีวมวล ปริมาณกรดแลคติก ค่าพีเอช และน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

3.4.3.1 สูตรอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium)

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

โดยกำหนดความเร็วรอบที่เหมาะสม คือ สภาวะนิ่ง อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส และพีเอชเหมาะสมคือ 6.5

3.4.3.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ตามสูตรอาหาร โดยเตรียมปริมาตร 2 ลิตร

1.1) ฟลาสก์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เตรียมอาหารตามสูตรอาหาร โดยแยกเป็น 2 ส่วนดังนี้

- ละลายน้ำตาลกลูโคส ในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหารโดยไม่ต้องเติมแคลเซียมคาร์บอเนต จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2) ฟลาสก์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เตรียมอาหารตามสูตรอาหารเช่นเดียวกันแต่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

2) เติมหัวเชื้อที่บ่มเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ร้อยละ 5 ลงในอาหารที่เตรียมไว้ (โดยให้มีปริมาตรอาหารรวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรฟลาสก์) ปริมาตรอาหาร 1,520 มิลลิลิตร ปริมาตรหัวเชื้อ 80 มิลลิลิตร

3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุก ๆ 12 ชั่วโมงโดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 96 เพื่อหาปริมาณชีวมวล ปริมาณกรดแลคติก ค่าพีเอช และน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป

3.4.3.3 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

1) ทำการเตรียมอาหารสังเคราะห์ที่จะใช้เลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในถังหมัก โดยแยกเป็น 2 ส่วนดังนี้

- ละลายน้ำตาลกลูโคส ในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหาร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 จากนั้นนำอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมเสร็จแล้วเทลงถังหมัก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาที

2) เทน้ำตาลกลูโคสที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในถังหมักโดยวิธีปลอดเชื้อ

3) เติมหัวเชื้อที่บ่มเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ร้อยละ 5 ลงในอาหารที่เตรียมไว้ โดยให้มีปริมาตรอาหารรวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรถังหมัก (ปริมาตรอาหาร 1,520 มิลลิลิตร ปริมาตรหัวเชื้อ 80 มิลลิลิตร)

4) มีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 ความเร็วรอบของใบพัดกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ใช้เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง

5) เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุก ๆ 12 ชั่วโมงโดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 96 เพื่อหาปริมาณชีวมวล ปริมาณกรดแลคติก ค่าพีเอช และน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป

3.4.4 การวิเคราะห์ผล

1) วัดชีวมวลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Nancib และคณะ, 2005)

2) วัดชีวมวลโดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้งโดยวิธีของ AOAC, 1990 (ภาคผนวก ข)

3) วัดกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (ภาคผนวก ข)

4) วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก โดยวิธีของ Dobois, 1956 (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ

แต่ละการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างอิสระโดยสมบูรณ์ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าทางสถิติใช้ของ SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple rangetest ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในการพิจารณาถึงการมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

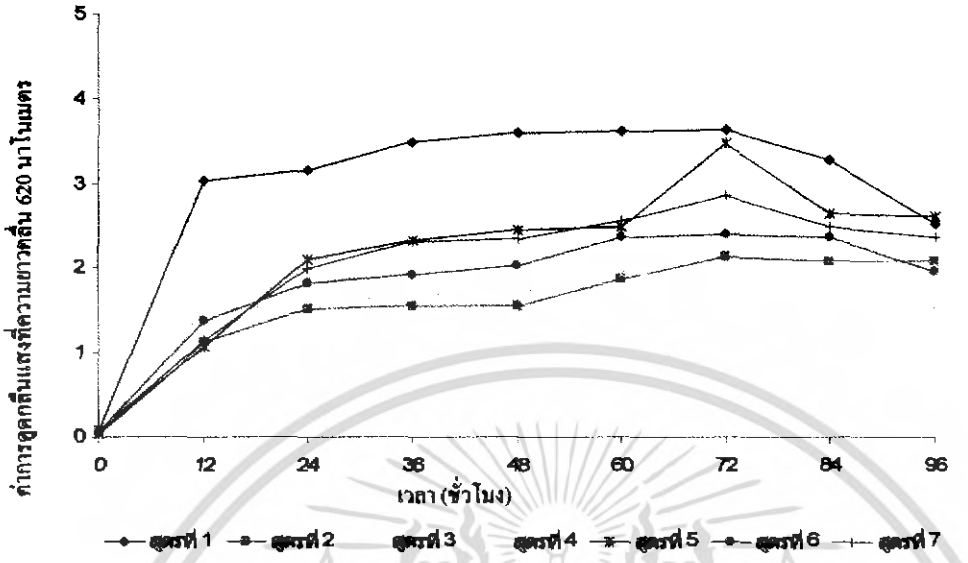
บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

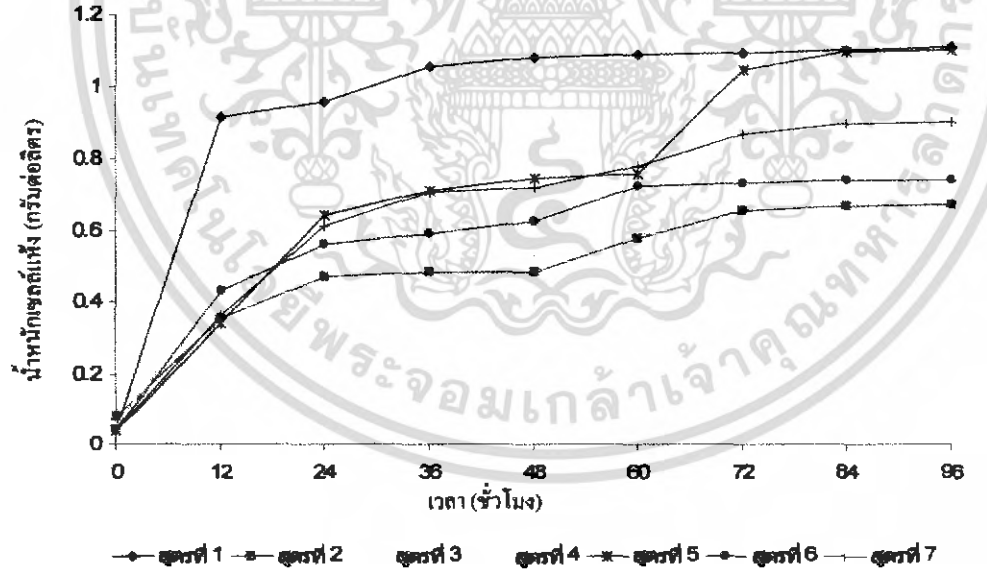
4.1.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกันทั้ง 7 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 2.5 เพื่อทำการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเชื้อในแต่ละช่วงเวลา พบว่าการเจริญของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่ 1 ที่มียีสต์สกัด และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่ 5 ที่มีเปปโตนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อที่เจริญในอาหารสังเคราะห์สูตรที่ 1 มีระยะการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เท่ากับ 3.63 และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.09 กรัมต่อลิตร และเชื้อที่เจริญในอาหารสังเคราะห์สูตรที่ 5 มีระยะการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ 620 นาโนเมตร เท่ากับ 3.48 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.05 กรัมต่อลิตร นอกจากนั้นพบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรอื่นๆ มีระยะการเจริญเติบโตสูงสุดใกล้เคียงกันคือ ชั่วโมงที่ 72 แล้วหลังจากนั้นเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 มีการเจริญเติบโตลดลงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Nancib และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *L. casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตกรดแลคติกได้ดี คือ ยีสต์สกัด ซึ่งผลของค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งดังแสดงในรูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง



รูปที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.1 และ 4.2 เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่ชั่วโมงเดียวกัน เชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์สกัด และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนมีการเจริญเติบโต สูงสุด รองลงมาได้แก่ เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของArasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ถั่วเหลือง และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในเวย์ โดยใช้กลูโคสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดีและเหมาะสมที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก ได้แก่ ยีสต์สกัด

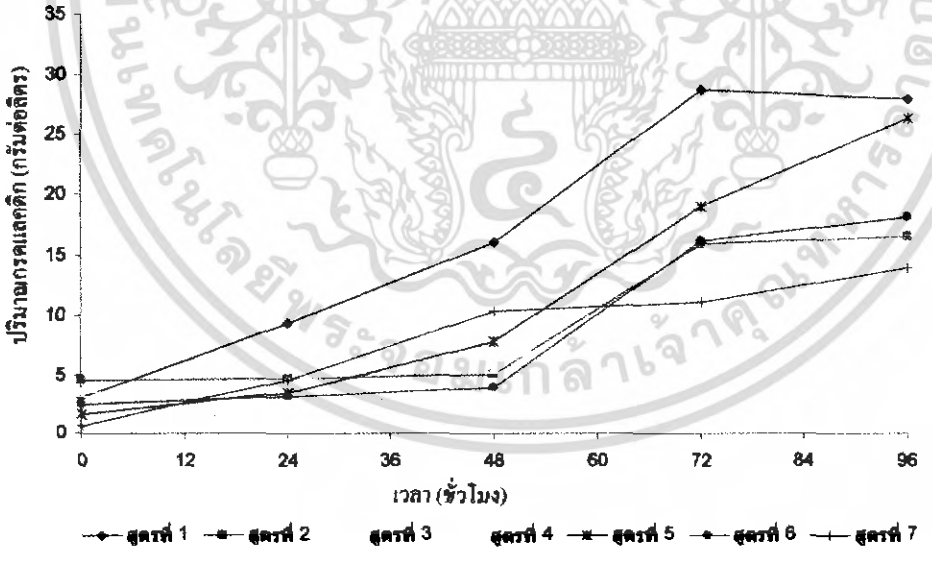
4.1.2 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ทั้ง 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ โดยมีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ที่แตกต่างกันทั้ง 7 สูตรอาหาร แสดงในตารางที่ 2.5 พบว่าเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่ 1 มียีสต์สกัด และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตกรดได้ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่ 5 ที่มีเปปโตน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่ 1 สามารถผลิตกรดได้สูงที่สุด โดยมีการผลิตกรดแลคติกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จะสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 ปริมาณกรดแลคติกที่สูงสุดได้เท่ากับ 28.81 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตคิดเป็น 1.25 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคือ เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่ 5 มีการผลิตกรดแลคติกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 72 ถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่ได้จะสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดที่ได้เท่ากับ 26.43 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตคิดเป็น 1.08 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.28 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่เชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรอื่น ๆ ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกดังรูปที่ 4.3

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าปริมาณกรดที่ผลิตได้โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มียีสต์สกัด และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จากการทดลองนี้เมื่อดูผลได้ของผลผลิตต่อสารตั้งต้น และอัตราการผลิตของกรดแลคติกที่ผลิตได้จากเชื้อ *L .casei*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ATCC 10863 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มียีสต์สกัด และเปปโตนจะมีค่าสูงกว่าผลผลิตที่ได้จากเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มียีสต์สกัดและเปปโตนจะให้ค่าผลผลิต (Product) เท่ากับ 28.81 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิต เท่ากับ 1.25 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีช่วงการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดมากกว่า รวมทั้งระยะเวลาที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดนั้นสั้นกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ดังนั้นจากผลการทดลองจึงเลือกยีสต์สกัดและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร และในถังหมักขนาด 2 ลิตรต่อไปซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปทิซอย ยูเรีย เปปโตน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัม พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะสูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Kadam และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพด ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์ โดยเชื้อ *L. delbrueckii* NCIM 2365 พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงถึง 89 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันในการเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง

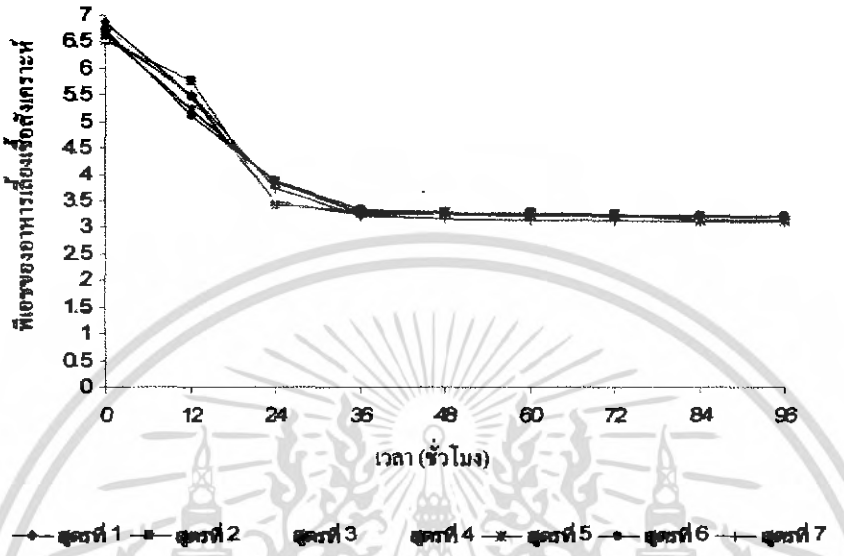
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 พบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโต จะมีการผลิตกรดแลคติกโดยสังเกตจากค่าพีเอชของอาหารจะมีค่าลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้น สอดคล้องกับการทดลองของ Idris และ Suzana (2006) ได้ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก จากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสัปปะรดโดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วและให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติก พีเอชแต่ละสูตรอาหารลดลงต่ำเรื่อยๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.4 โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์แต่ละสูตรจะมีแนวโน้มการลดลงของค่าพีเอชใกล้เคียงกันคือ ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 6.5 ซึ่งจะลดลงอย่างรวดเร็ว ในชั่วโมงที่ 24 และจะลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 96 โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่ 1 ซึ่งมีการผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.87 พีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 3.46 และจะลดลงอย่างคงที่จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.17 พีเอชที่เปลี่ยนแปลงนั้นแสดงได้ดังรูปที่ 4.4

4.1.4 การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ทั้ง 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง

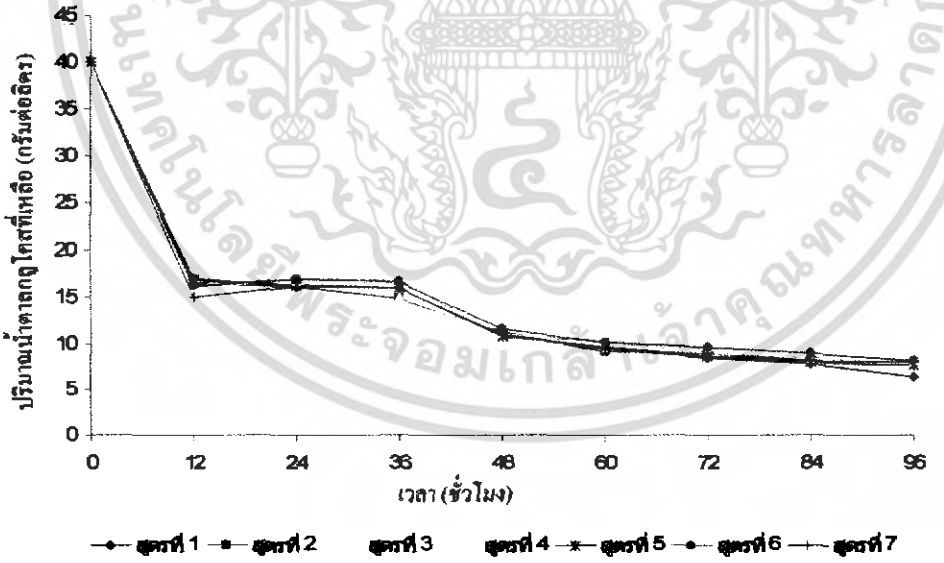
จากการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่นำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *L.casei* ATCC 10863 โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองที่ได้พบว่าที่ชั่วโมงที่ 72 เชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตร 1 ที่มียีสต์สกัดและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน มีการใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดโดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป ลดลงจากเดิมเหลือเท่ากับ 16.94 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 57.65 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 96 เหลือน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 12.84 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 67.9 ในขณะที่เชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรอื่น ๆ ได้แก่สูตรที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ในชั่วโมงที่ 96 จะมีปริมาณน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดลงเหลือ 15.96, 16.24, 16.06, 15.50 , 16.24 และ 15.92 ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 60.1, 59.4, 59.85, 61.25, 61.25 และ 60.2 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ในสภาวะนิ่ง



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาที่ได้พบว่าน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงสอดคล้องกับการผลิตกรดแลคติกที่ได้คือ เชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์มียีสต์สกัด และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด และมีการใช้สารตั้งต้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้นจึงทำการเลือกยีสต์สกัด และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร และในถังหมักขนาด 2 ลิตรต่อไปสรุปได้ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ถั่วเหลือง และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในเวย์ โดยใช้กลูโคสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรด แลคติก โดยเชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดีและเหมาะสมที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติก ได้แก่ ยีสต์สกัด นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Nancib และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปทิซอย ยูเรีย เปปโตน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัม พบว่าปริมาณกรดแลคติกจะสูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

เมื่อนำค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ที่ได้จากการศึกษาในการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่ 1 ที่มียีสต์สกัด และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงสุดนั้น ค่าต่าง ๆ จะมีความสัมพันธ์กันดังรูปที่ 4.6

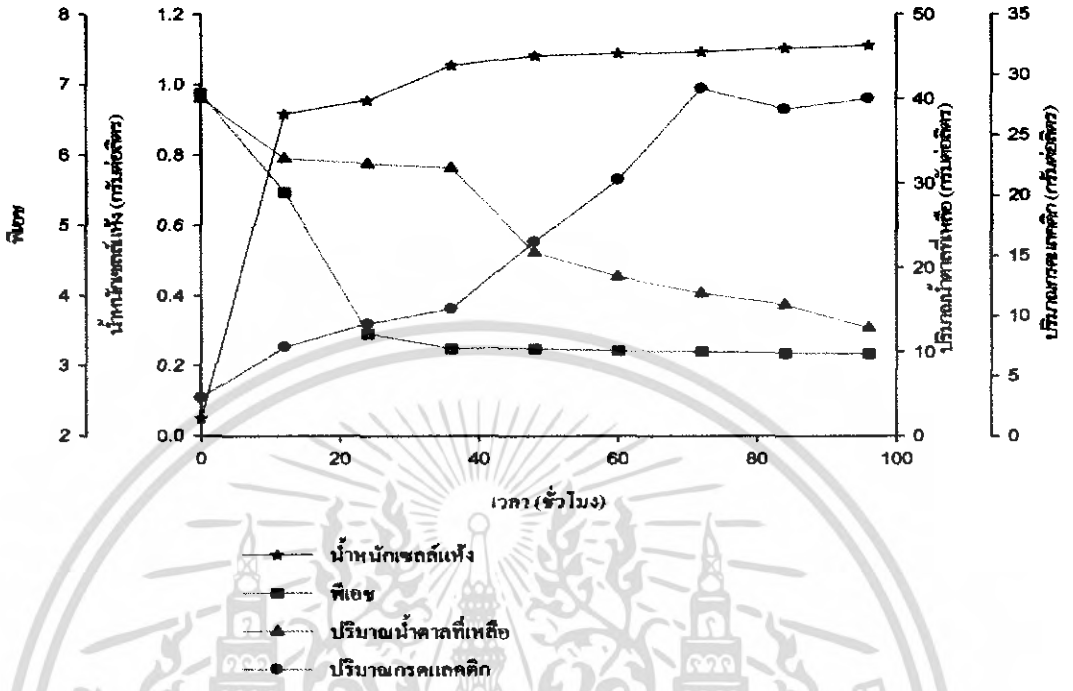
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 สรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด 7 สูตรอาหาร สำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

สูตรอาหาร	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของผลผลิต (กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
สูตรที่ 1	72	28.81^{a}	1.25^{a}	0.40^{a}	23.06^{a}	3.20^{a}
สูตรที่ 2	96	16.53^{bc}	0.69^{b}	0.17^{bc}	24.04^{a}	3.19^{a}
สูตรที่ 3	96	13.99^{c}	0.59^{b}	0.15^{c}	23.76^{a}	3.17^{a}
สูตรที่ 4	96	6.21^{d}	0.26^{c}	0.06^{d}	23.94^{a}	3.19^{a}
สูตรที่ 5	96	26.43^{a}	1.08^{a}	0.28^{a}	24.50^{a}	3.12^{a}
สูตรที่ 6	96	18.20^{b}	0.77^{b}	0.19^{b}	23.76^{a}	3.21^{a}
สูตรที่ 7	96	13.95^{c}	0.56^{b}	0.15^{c}	24.71^{a}	3.09^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

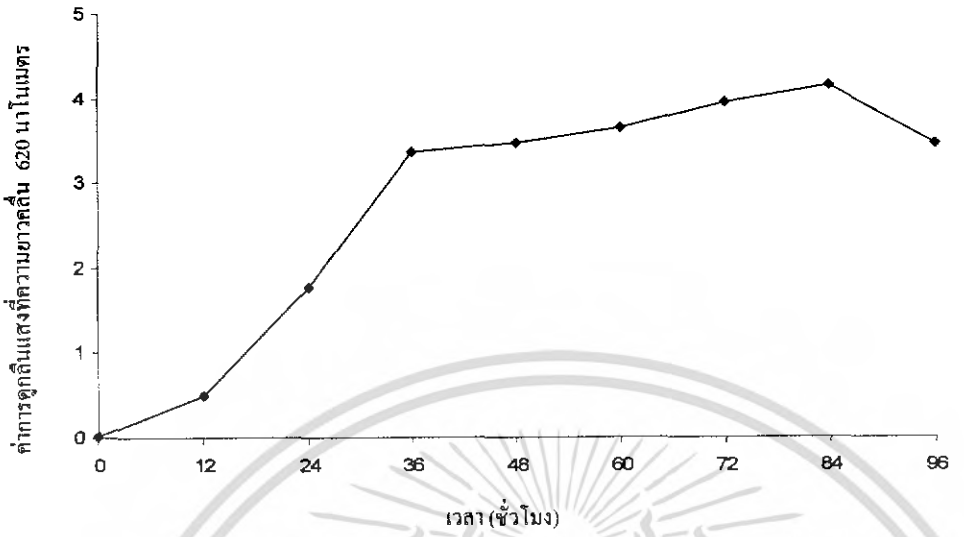
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



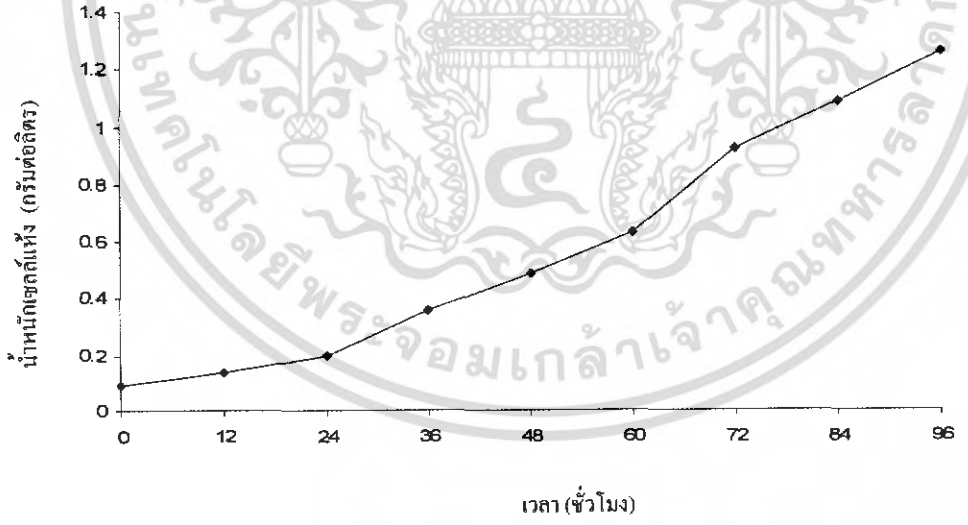
รูปที่ 4.6 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดแลคติก การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่ 1 ที่มีแหล่งไนโตรเจนคือ ยีสต์สกัด และเปปโตน โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

จากรูปที่ 4.6 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่ 1 ซึ่งมียีสต์สกัด และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีระยะการเจริญเติบโตสูงสุดชั่วโมงที่ 72 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.09 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลคติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 28.81 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงเท่ากับ 3.20 และมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่คงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 16.94 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 57.65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง



รูปที่ 4.8 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

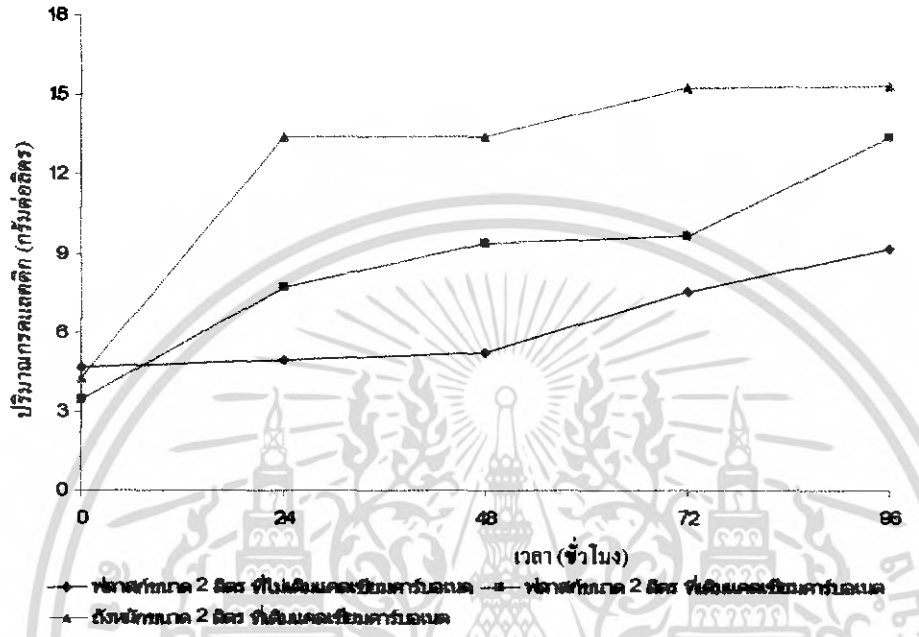
4.2.2 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ทั้งที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าความสามารถในการผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดคือ เชื้อที่เจริญในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต โดยมีการผลิตกรดแลคติกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 ปริมาณกรดแลคติกที่สูงสุดได้เท่ากับ15.27 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.72 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคือเชื้อที่เจริญในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต โดยมีการผลิตกรดแลคติกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 ปริมาณกรดแลคติกที่สูงสุดได้เท่ากับ 13.35 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.67 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเชื้อที่เจริญในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตสามารถผลิตกรดแลคติกได้ต่ำสุด โดยมีการผลิตกรดแลคติกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 72 ถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 ปริมาณกรดแลคติกที่สูงสุดได้เท่ากับ 9.16 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.56 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร แสดงในรูปที่ 4.9

จากรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่เจริญในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุด ทั้งนี้เนื่องมาจากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักสามารถควบคุมความเร็วรอบของใบพัดกวนในอัตราเร็วที่เหมาะสมได้ซึ่งในการทดลองนี้กำหนดให้ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที (Quesada-Chanto, 1994) ทำให้เชื้อสามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึงและในถังหมักสามารถควบคุมค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ได้ การเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไป เพื่อให้แคลเซียมคาร์บอเนตแตกตัว เกิดเป็นแคลเซียมแลคเตท และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งเป็นตัวสะเทิน (neutralizer) ในระหว่างการหมัก แต่ถ้าแคลเซียมคาร์บอเนตมีความเข้มข้นมากถึง 10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ กลายเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลึกของแคลเซียมแลคเตทได้ยาก ทำให้การสกัดสารละลายแลคเตท ยากตามไปด้วย (Ohkouchi และ Inoue, 2006)



รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่เจริญในถังหมัก จะมีช่วงเวลาของการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดมากกว่า ดังนั้นจึงเห็นว่าการผลิตกรดแลคติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีประโยชน์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดแลคติกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

4.2.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตสภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

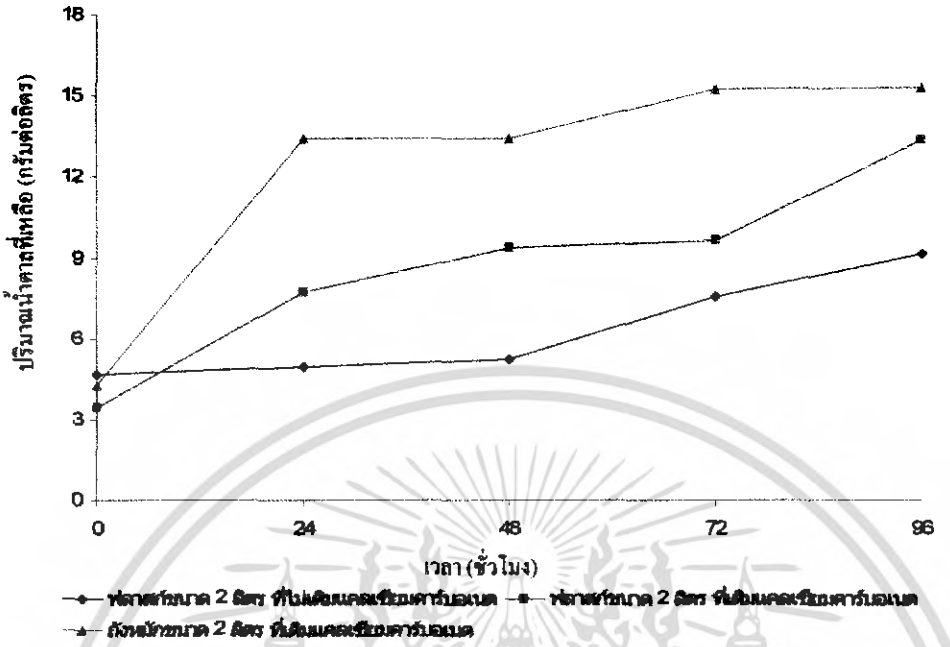
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต และในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโต เชื้อจะมีการผลิตกรดแลคติกออกมาโดยสังเกตจากค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่าลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้น ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.55 พีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 4.98 หลังจากนั้นค่าพีเอชจะลดลงอย่างคงที่จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 96 พีเอชเท่ากับ 3.00 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.54 พีเอชจะลดลงอย่างช้า ๆ ในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 6.17 หลังจากนั้นพีเอชจะลดลงจนกระทั่งคงที่ เมื่อถึงชั่วโมงที่ 96 พีเอชเท่ากับ 3.80 และค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงจากค่าพีเอชเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.88 และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ชั่วโมงที่ 96 พีเอชเท่ากับ 6.56 จากการทดลองจะสังเกตเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตนั้น ค่าพีเอชของอาหารจะมีค่าลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นสอดคล้องกับการทดลองของ Idris และ Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก จากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสัปปะรดโดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วและให้ปริมาณกรดแลคติกที่สูง John และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติก ซึ่งค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงนั้นแสดงได้ดังรูปที่ 4.10

4.2.4 การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

จากการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 40.0 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองที่ได้พบว่าในชั่วโมงที่ 96 เชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร มีการใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือเท่ากับ 18.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 53.05 ในขณะที่เชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือ 19.94 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



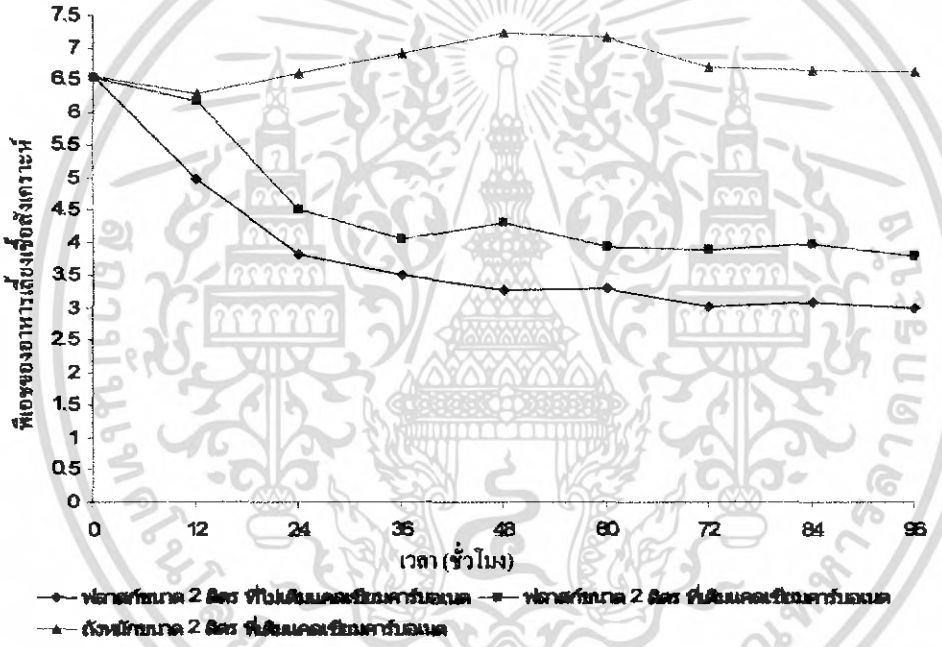
รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จากการเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับฟลาสก์ ขนาด 2 ลิตร ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 15.27 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช ลดลงเท่ากับ 6.63 และมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่คงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 18.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 52.83 ดังแสดงในรูปที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

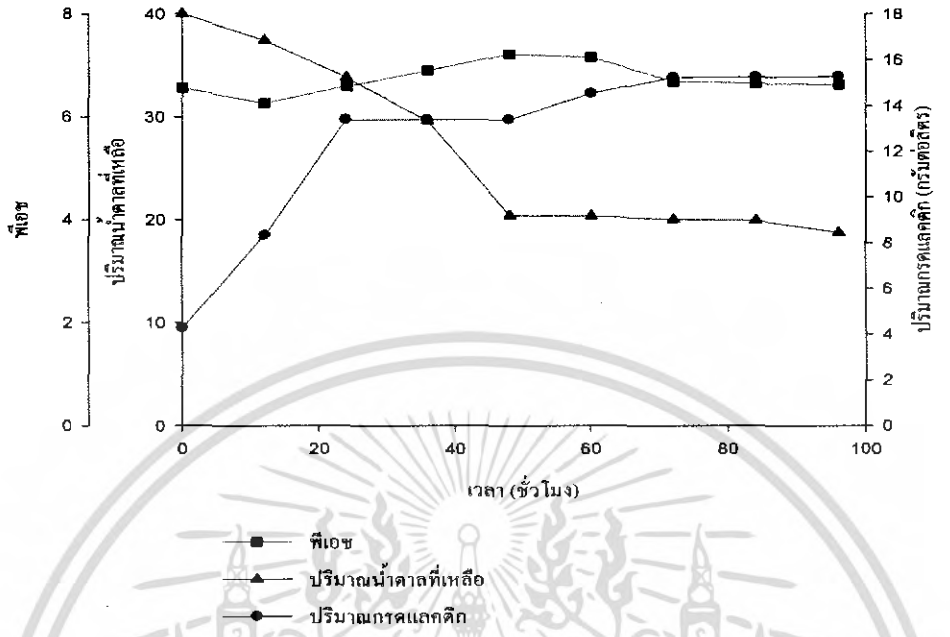
ใช้ไปร้อยละ 50.15 ส่วนในฟลาสก์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือ 23.58 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 41.05 ดังแสดงในรูปที่ 4.11

จากการศึกษาพบว่าค่าน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง สอดคล้องกับการผลิตกรดแลคติกที่ได้เชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในถังหมักขนาด 2 ลิตร สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด คือ15.27 กรัมต่อลิตร และมีการใช้สารตั้งต้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุด ดังนั้นจึงสามารถใช้การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในถังหมักขนาด 2 ลิตรในการผลิตกรดแลคติก เป็นแนวทางในการศึกษา และพัฒนาการผลิตกรดแลคติกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป



รูปที่ 4.10 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ใน ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดแลคติก การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต โดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 สภาวะการหมักมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 สรุปผลการทดลองเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

สูตรอาหาร	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของผลผลิต (กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	96	9.16	0.56	0.10	16.42	3.00
ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรเติมแคลเซียมคาร์บอเนต	96	13.35	0.67	0.14	20.06	3.80
ถังหมักขนาด 2 ลิตรเติมแคลเซียมคาร์บอเนต	96	15.27	0.72	0.16	21.22	6.63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกันทั้ง 7 สูตรอาหาร พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์สูตรที่มียีสต์สกัด และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนมีการผลิตกรดแลคติกสูงใกล้เคียงกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแหล่งไนโตรเจนที่มียีสต์สกัด และเปปโตนให้ผลผลิตกรดสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 สามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 28.81 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 1.25 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 สามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 26.43 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 1.08 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.28 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงทำการเลือกใช้ยีสต์สกัดและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก การศึกษาการเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในระดับ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่เติม และไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตรที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในระดับถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ให้ผลผลิตกรดสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 15.27 กรัมต่อลิตร ผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.72 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น อัตราการผลิตเท่ากับ 0.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยอาหารสังเคราะห์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะให้ผลผลิตกรดแลคติกเร็วกว่าที่ไม่เติม และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อใน ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร กับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าเชื้อที่เจริญในถังหมักมีการสัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึง ส่งผลให้เชื้อ *L. casei* ATCC 10863 มีการผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้น

เนื่องจากเมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าปริมาณของกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้ง 7 สูตรไม่แตกต่าง กันในทางสถิติ ในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยการนำผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรม เช่น เวย์ โมลาส เป็นต้น พบว่าผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็ง คือ เวย์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส น้ำ โปรตีน วิตามิน และแร่ต่างๆ (Roukas, 1997) เหมาะแก่การนำมาเป็นสารตั้นต้นในการผลิตกรดแลคติก ซึ่งถือเป็นการทดลองที่ต่อยอดจากการศึกษาเดิม และยังเป็นการนำผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัญชนิกา และคณะ. 2548. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

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

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 technol Biotechnol 43., 3 : 235 – 239.

Bulut, S., Elibol, M., Ozer and Dursum. 2004. Effect of different carbon sources on L (+) lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. Biochemical Engineering Journal., 21 : 33-37.

Dailey, O. D., Dowd, M.K. and Mayorga, J.C. 2000. Influences of lactic acid on the solubilization of protein during steeping. Journal Agriculture Food Chemistry, 48 : 1352-1357.

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

Fitzpatrick, J. J., Ahrens and M. Smith, S. 2001. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. Process Biochemistry., 36 : 671-675.

Fitzpatrick, J. J. and O'Keeffe, U. 2001. Influence of whey proteinhydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. Process Biochemistry., 37 : 183-186.

Fitzpatrick, J. J., Murphy, C., Mota, F. M. and Pauli, T. 2003. Impurity and cost consideration for nutrient supplementation of whey permeate fermentation to produce lactic acid for biodegradable plastics. International Dairy Journal., 13 : 575-580.

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

Huang ,L. P., Jin, B., Lant, P. and Zhou, J. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch waste water to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. Biochemical

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Engineering Journal., 23 : 265-276.

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

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

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

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

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

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

Narayanan, N., Roychoudhury, P. K. and Srivastava, A. 2004. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology 7., 2 : 167-179.

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

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

Pauli, T. and Fitzpatrick, J. J. 2002. Malt combing nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. Process Biochemistry., 38 : 1-6.

Quesada-Chanto, A., Afschar, A.S. and Wagner, F. 1994. Optimizaruio of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose. Appiled and Microbiology., 42 : 16-21.

Roukas, T. and kotzekidou, P. 1998. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* cell using fedbatch culture. Enzyme and Microbial Technology., 22 : 199-204.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A. 1998. Lactic acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. 2nd ed. New York:Marcel dekker.Inc.

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

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

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

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

Wee, Y.J., Kim, H.O.,Yun, J.S. and Ryu, HW. 2006. Pilot – Scale lactic acid production via batch culturing of *Lactobacills* sp.RKY2 Using Corn Steep Liquor As a nitrogen source. Food Technol Biotechnol 44., 2 : 293 – 298.

Wee, Y.J., Kim, J.N. and Ryu, H.W. 2006. Biotechnological Production of Lactic acid and Its Recent Applications. Food Technol Biotechnol 44., 2 : 163 – 172.

Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. 1995. The Genera of Lactic acid Bacteria.Blackie academic and professional.

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.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

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

วิธีการ

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

1.2 อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตด (CH_3COONa)	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมซิเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.05	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

วิธีการ

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

2. สารเคมี

สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 3

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส วิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dobois, 1956)

อุปกรณ์

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

สารเคมี

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมฟีนอล 5 % ลงไป 1 มิลลิลิตร

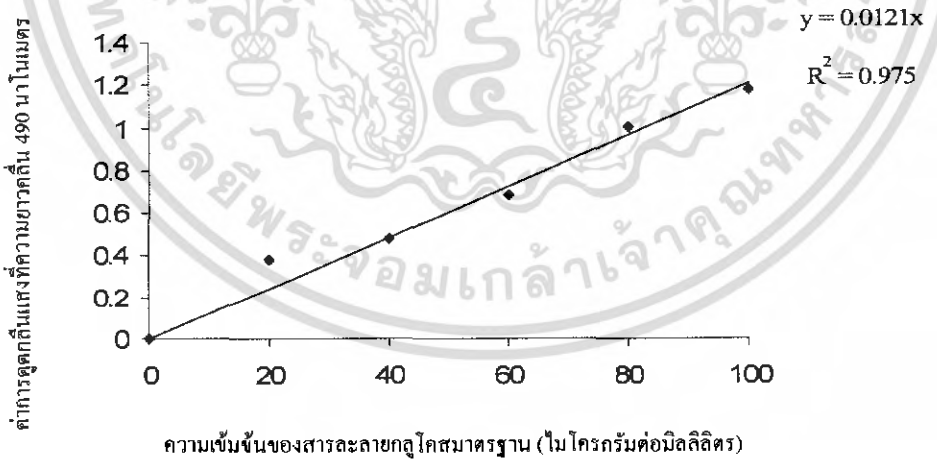
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด

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

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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



รูปที่ 1 กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 .น้ำหนักเซลล์แห้ง (AOAC, 1990)

วิธีการ

เตรียมหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน

1. ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยของเซลล์ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนลอยที่แช่แข็งเก็บไว้สำหรับการวิเคราะห์ค่าปริมาณน้ำตาล และกรดแลคติก เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองและนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 1-2 ครั้ง
2. รินส่วนลอยน้ำทิ้ง นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
3. ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
4. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งจาก

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

3. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วยเครื่อง HPLC *(กัญชนิกา และคณะ, 2548)*

3.1 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ขั้นตอนการเปลี่ยน MOBILE PHASE

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

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

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

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

3.3 ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.1 Rheodyne Manual Injector

3.4 ขั้นตอนการปิดเครื่อง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : กรณีที่จะหยุดใช้ เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

3.5 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

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

หมายเหตุ

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

<u>ตัวอย่าง</u> การล้างเครื่อง โดยมี mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็น buffer solution และ mobile phase ที่เก็บ column เป็น %70 MeOH

Buffer solution 30 นาที

↓

น้ำกลั่น HPLC 30นาที

↓

%70 MeOH 30 นาที

↓

ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

3.6 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)

1. Run Mobile Phase ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run Mobile Phase ที่ใช้เก็บ Column 1 ชั่วโมง
3. หยุด Pump แล้วถอด column ออกจากระบบแล้วต่อ pipe เปล่าแทนที่ และปิด column ด้วย plug ให้แน่น
4. เปลี่ยน mobile phase เป็น 70 % MeOH แล้ว run เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง

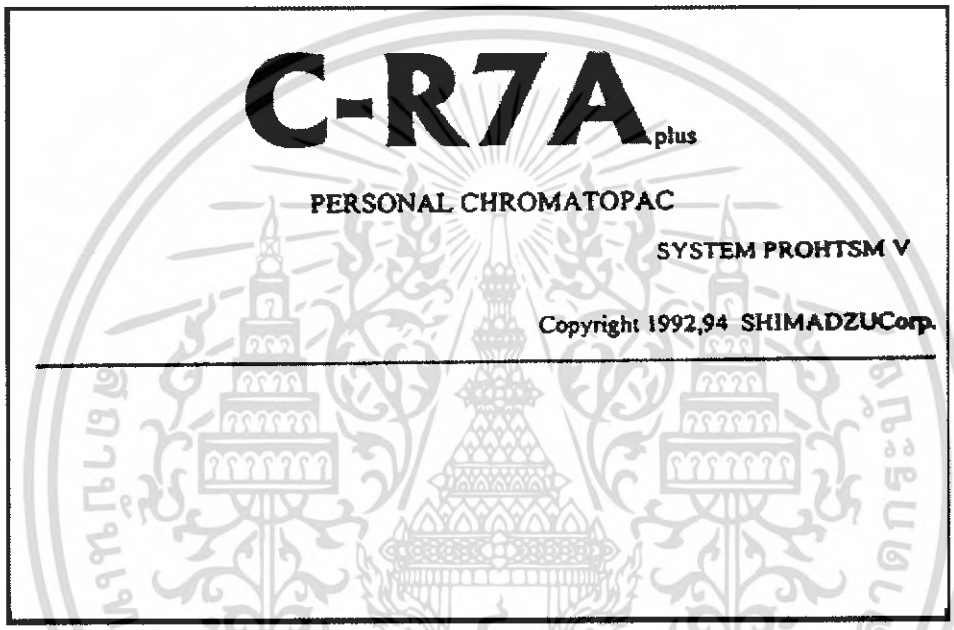
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Off pump แล้วปิดเครื่องทุก unit

6. ยก sinker ออกจากขวด mobile phase แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

3.7 ขั้นตอนการใช้งาน

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



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

เลือก L เพื่อเรียก Analysis File ในกรณีเคยสร้าง File เก็บไว้

E ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูกโหลดขึ้นมาใช้งาน

R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่าใน Analysis File ที่โหลดขึ้นมาใช้งานอยู่

A ในกรณีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File กับทุก ๆ ครั้งของการฉีด

การสร้าง Analysis File ใหม่

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

DRIFT(uV/min) 0

และ T.DBL(min) 1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- กด EXIT เพื่อออกจากหน้าจอ จะปรากฏคำถาม | Save FILE? Y: yes N:no | กด **Y** จะปรากฏ

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

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

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

หลังจากการ save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN 1

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

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

เลือก S เมื่อต้องการตั้งชื่อ File สำหรับ Save จะปรากฏ

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

กำหนด Drive และ File ตามด้วย ". C00" และ ENTER จำนวน Chromatogram ที่ต้องการ Save ในชื่อเดียวกันนี้ (สูงสุด99) และ ENTER เช่น

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

เลือก R เมื่อต้องการยกเลิกการตั้งชื่อข้างต้น

C ยกเลิกการ Save ของ Chromatogram สุดท้าย

A เมื่อต้องการให้เครื่อง Save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

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

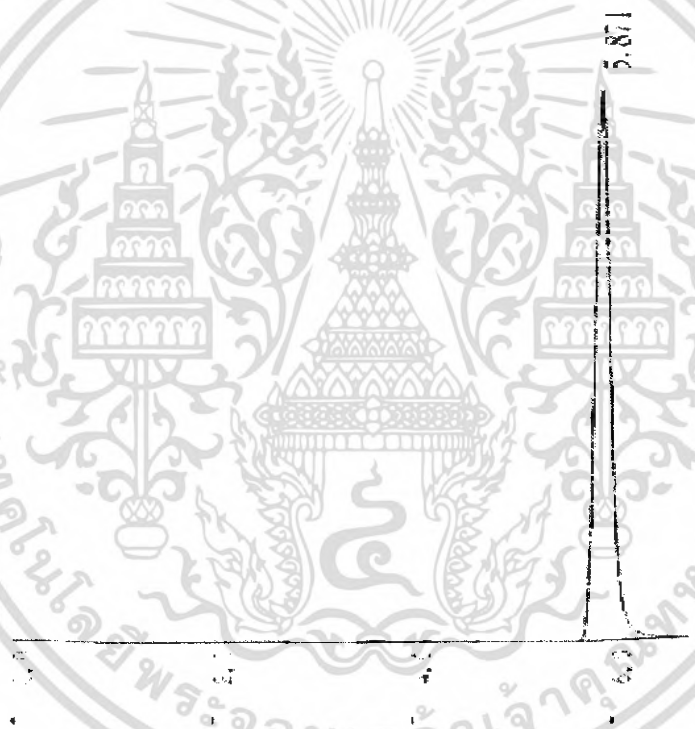
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

6. Menu ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis File

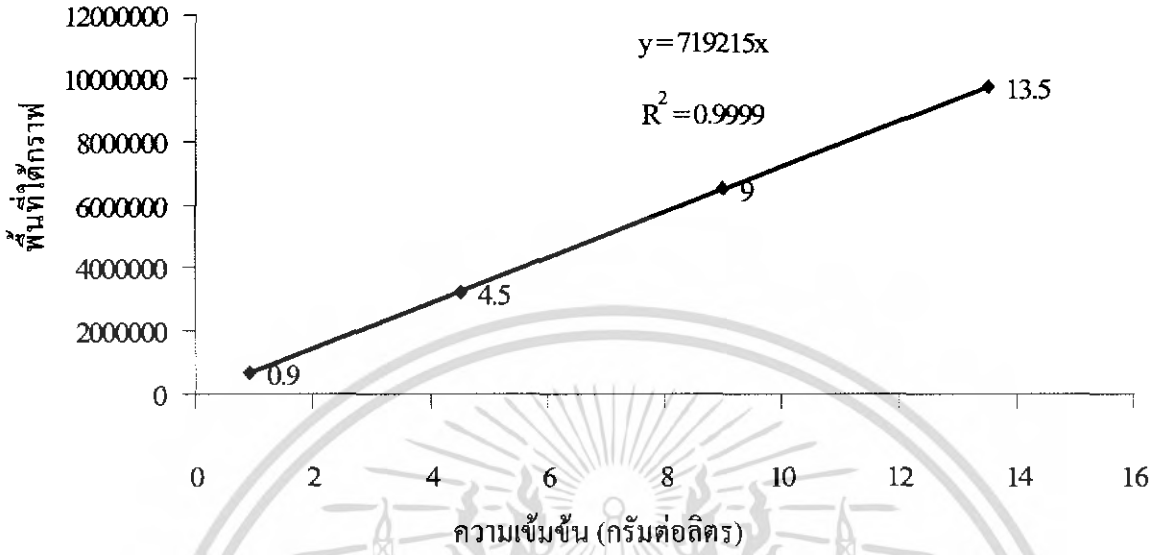
7. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณ และให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START

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



รูปที่ 2 แสดงค่า Retention time ของกรดแลคติกค่าเท่ากับ 5.874

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ทั้งหมด 7 สูตรอาหาร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)						
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	0.05	0.08	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04
12	0.92	0.36	0.49	0.46	0.34	0.43	0.36
24	0.96	0.47	0.58	0.49	0.64	0.56	0.61
36	1.05	0.48	0.58	0.52	0.71	0.59	0.71
48	1.08	0.48	0.58	0.53	0.75	0.62	0.72
60	1.09	0.58	0.62	0.59	0.75	0.72	0.78
72	1.09	0.65	0.74	0.59	1.05	0.73	0.87
84	1.10	0.66	0.80	0.60	1.10	0.74	0.90
96	1.11	0.67	0.80	0.65	1.10	0.74	0.90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (OD_{620}) ของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน ทั้งหมด 7 สูตรอาหาร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร						
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	0.07	0.07	0.07	0.05	0.03	0.05	0.04
12	3.03	1.12	1.59	1.49	1.06	1.37	1.14
24	3.16	1.51	1.87	1.57	2.09	1.82	1.99
36	3.50	1.54	1.89	1.68	2.32	1.92	2.31
48	3.59	1.55	1.89	1.70	2.45	2.02	2.35
60	3.61	1.87	2.03	1.91	2.48	2.36	2.56
72	3.63	2.13	2.44	1.93	3.48	2.40	2.86
84	3.28	2.08	2.18	1.66	2.65	2.36	2.48
96	2.52	2.08	2.01	1.51	2.61	1.96	2.36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ทั้งหมด 7 สูตรอาหาร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง						
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	6.87	6.52	6.61	6.78	6.64	6.72	6.63
12	5.47	5.78	5.36	5.41	5.22	5.10	5.50
24	3.46	3.42	3.59	3.43	3.84	3.86	3.72
36	3.24	3.29	3.47	3.34	3.27	3.33	3.20
48	3.24	3.26	3.22	3.28	3.26	3.27	3.15
60	3.21	3.26	3.19	3.26	3.25	3.24	3.13
72	3.20	3.24	3.19	3.24	3.24	3.22	3.13
84	3.18	3.19	3.17	3.20	3.14	3.22	3.10
96	3.17	3.19	3.17	3.19	3.12	3.21	3.09

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ทั้งหมด 7 สูตรอาหารในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)						
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	3.15	4.65	3.48	0.41	1.56	2.47	0.60
24	9.34	4.75	4.72	2.16	3.44	3.17	4.57
48	16.12	5.11	5.62	3.92	7.90	4.02	10.32
72	28.81	15.94	13.28	5.80	19.07	16.22	11.05
96	27.98	16.53	13.99	6.21	26.43	18.20	13.95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ทั้งหมด 7 สูตรอาหาร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)						
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
12	32.90	33.74	31.84	32.62	33.44	32.24	29.78
24	32.30	32.06	33.42	33.70	32.34	33.70	32.24
36	31.78	29.44	30.04	33.56	31.84	33.26	31.82
48	21.78	22.40	22.26	21.82	21.54	23.02	21.80
60	18.92	18.36	19.14	20.44	19.18	20.34	19.18
72	16.94	17.84	18.20	18.02	17.42	19.18	17.24
84	15.62	16.24	17.16	16.94	16.04	18.06	16.24
96	12.84	15.96	16.24	16.06	15.50	16.24	15.92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง และในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	ฟลาสก์ 2 ลิตร ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	ฟลาสก์ 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	ถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร
0	0.09	-	-
12	0.14	-	-
24	0.51	-	-
36	0.84	-	-
48	1.00	-	-
60	1.09	-	-
72	1.19	-	-
84	1.25	-	-
96	1.26	-	-

- หมายถึงไม่ได้ทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (OD_{620}) ของเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง และในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร		
	ฟลาสก์ 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	ฟลาสก์ 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	ถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร
0	0.02	-	-
12	0.49	-	-
24	1.76	-	-
36	3.36	-	-
48	3.46	-	-
60	3.64	-	-
72	3.94	-	-
84	4.13	-	-
96	3.45	-	-

- หมายถึงไม่ได้ทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง และในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง		
	ฟลาสก์ 2 ลิตร ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	ฟลาสก์ 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	ถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร
0	6.55	6.54	6.56
12	4.98	6.17	6.27
24	3.82	4.52	6.60
36	3.49	4.05	6.90
48	3.27	4.30	7.22
60	3.30	3.93	7.16
72	3.02	3.88	6.69
84	3.08	3.98	6.65
96	3.00	3.80	6.63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ใน ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง และในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)		
	ฟลาสก์ 2 ลิตรที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	ฟลาสก์ 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต	ถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร
0	4.67	3.43	4.26
24	4.93	7.72	13.38
48	5.23	9.38	13.39
72	7.55	9.65	15.23
96	9.16	13.35	15.27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ATCC 10863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งและในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณกรดแลคติกด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่างซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติแบบ Duncan New multiple rangetest ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1083.341	6	180.557	45.139	0.000
Within Groups	56.000	14	4.000		
Total	1139.341	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan[a]

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่	จำนวนข้อมูล (N)	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4	3	6.21			
7	3		13.95		
3	3		13.99		
2	3		16.53	16.53	
6	3			18.20	
5	3				26.43
1	3				28.81
Sig.		1.00	0.155	0.324	0.167

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของผลได้ของผลผลิต ด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่างซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple rangetest ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.99	6	0.33	25.83	0.00
Within Groups	0.18	14	0.01		
Total	2.17	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan[a]

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่	จำนวนข้อมูล (N)	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4	3	0.26		
7	3		0.56	
3	3		0.59	
2	3		0.69	
6	3		0.77	
5	3			1.08
1	3			1.25
Sig.		1.00	0.05	0.08

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของอัตราการผลิตกรดแลคติก ด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่างซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple rangetest ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.12	6	0.02	94.67	0.00
Within Groups	0.003	14	0.00		
Total	0.13	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan[a]

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่	จำนวนข้อมูล (N)	Subset for alpha = 0 .05			
		1	2	3	4
4	3	0.06			
7	3		0.15		
3	3		0.15		
2	3		0.17	0.17	
6	3			0.19	
5	3				0.28
1	3				0.30
Sig.		1.0	0.13	0.12	0.12

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ถูกไป ด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่างซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple rangetest ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.25	6	0.88	0.22	0.96
Within Groups	56.00	14	4.00		
Total	61.25	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan[a]

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่	จำนวนข้อมูล (N)	Subset for alpha = 0.05
		1
1	3	23.06
3	3	23.76
6	3	23.76
4	3	23.94
2	3	24.04
5	3	24.50
7	3	24.71
Sig.		0.38

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่าพีเอชที่เวลาการผลิตกรดแลคติกสูงสุด ด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) ตรวจสอบความแตกต่างซึ่งแสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Duncan New multiple rangetest ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.017	6	0.003	0.270	0.942
Within Groups	0.147	14	0.010		
Total	0.164	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan[a]

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่	จำนวนข้อมูล (N)	Subset for alpha = 0.05
		1
5	3	3.12
7	3	3.15
3	3	3.17
2	3	3.19
4	3	3.19
1	3	3.20
6	3	3.21
Sig.		0.35

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้