

การเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ
Lactobacillus casei TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนต

INCREASE PRODUCTIVITY OF LACTIC ACID FROM WHEY
USING CALCIUM ALGINATE IMMOBILIZED

Lactobacillus casei TISTR 1341



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาความหลังสูตรปรีดิคณาภิเษาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขานิติเวชในโรยี่ชีภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KMITL-2003-SC-M-020-426

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ

Lactobacillus casei TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต

INCREASE PRODUCTIVITY OF LACTIC ACID FROM WHEY
USING CALCIUM ALGINATE IMMOBILIZED

Lactobacillus casei TISTR 1341



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 87088
วัน,เดือน,ปี 30 ส.ค. 2552

b. 190.10021
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

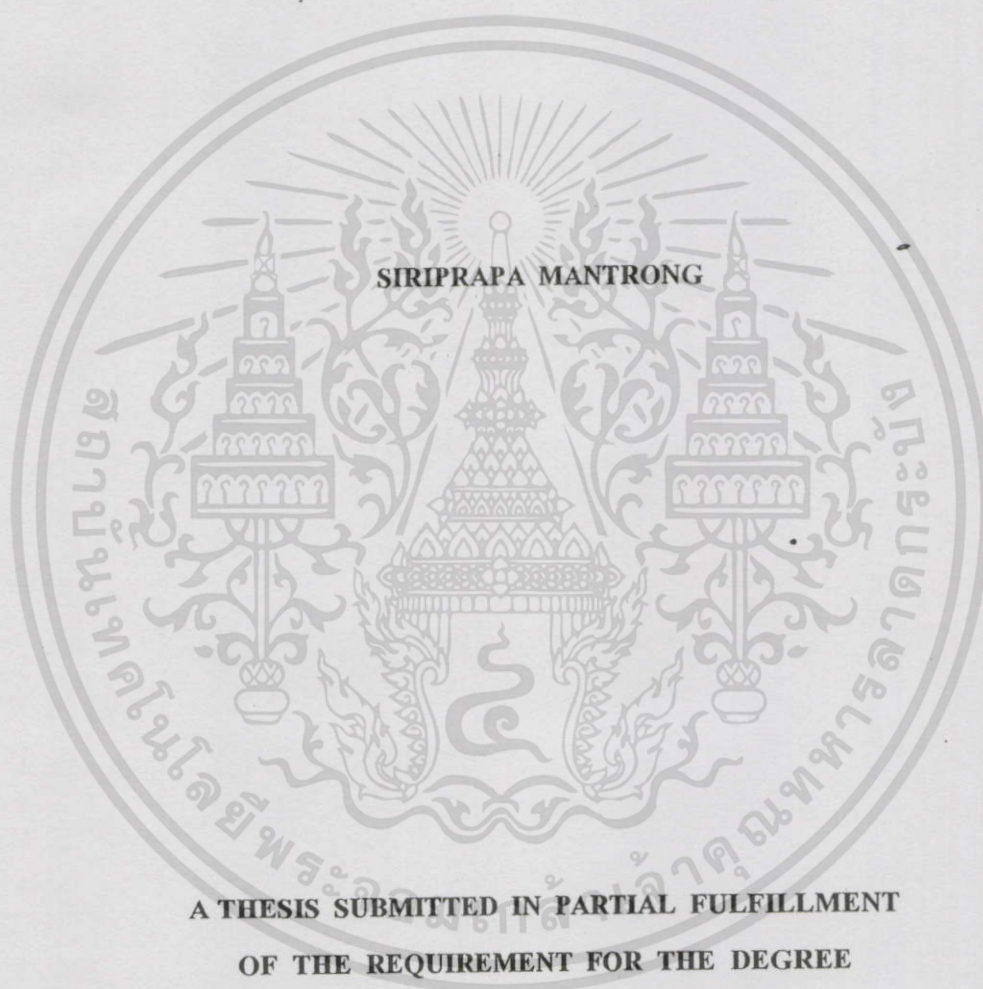
พ.ศ. 2551

KMITL-2008-SC-M-020-426

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**INCREASE PRODUCTIVITY OF LACTIC ACID FROM WHEY
USING CALCIUM ALGINATE IMMOBILIZED**

Lactobacillus casei TISTR 1341



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2008

KMITL-2008-SC-M-020-426

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2008

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักบริหารวิชาการ
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341
ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนต

Increase Productivity of Lactic Acid from Whey Using Calcium Alginate-
Immobilized *Lactobacillus casei* TISTR 1341

ชื่อนักศึกษา นางสาวศิริประภา มั่นตรง

รหัสประจำตัว 49068307

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.สุขใจ ชูจันทร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี	พนา โลหะทรัพย์ทวี
รศ.สุขใจ ชูจันทร์	สุขใจ ชูจันทร์
รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์	มาลินี ตันติยาภรณ์
รศ.ดร.พรณี จิตาภิชาติ	พรณี จิตาภิชาติ

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 1 สิงหาคม 2551 เวลา 10.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารามวลัยลักษณ์ I ห้อง 424

สำนักบริหารวิชาการรับรองแล้ว

(รศ.ดร.รวีวรรณ ชินะตระกูล)

ผู้อำนวยการสำนักบริหารวิชาการ

วันที่ 18 เดือน กันยายน พ.ศ. 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ
Lactobacillus casei TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วย
แคลเซียมแอลจิเนต

นักศึกษา

นางสาวศิริประภา มั่นตรง

รหัสประจำตัว

49068307

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

พ.ศ.

2551

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 โดยเปรียบเทียบการใช้เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์และอาหารตั้งเคราะห์ที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเวย์มีประสิทธิภาพดีที่สุด สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ประกอบด้วย ระยะทางระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 12-16 เซนติเมตรและโซเดียมแอลจิเนตร้อยละ 2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกคือ เวย์ความเข้มข้นร้อยละ 90 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตรคือ อัตราการกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชที่ 6.5 โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 8.16 กรัมต่อลิตร ผลได้ 0.226 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิต 0.170 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมากกว่าการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมพีเอช โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 7.14 กรัมต่อลิตร ผลได้ 0.212 กรัมต่อกรัม อัตราการผลิต 0.119 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 60 และมากกว่าการผลิตในระดับฟลาस्कขนาด 2 ลิตร สภาวะนิ่งและไม่มีการควบคุมพีเอช ซึ่งผลิตกรดแลกติกได้ 6.51 กรัมต่อลิตร ผลได้ 0.21 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิต 0.090 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 72 เมื่อศึกษาการนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำพบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 2 รอบ โดยรอบแรกและรอบที่สองสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 8.47 และ 3.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีการสะสมกรดแลกติกภายในเม็ดเจล

Thesis Title	Increase productivity of lactic acid from whey using calcium alginate immobilized <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 1341
Student	Miss Siriprapa Mantrong
Student ID.	49068307
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2008
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Sukjai Choojun

ABSTRACT

Lactic acid production from *Lactobacillus casei* TISTR 1341 with free and immobilized cell in calcium alginate in whey and synthetic medium were compared. It was found that immobilized cell in whey medium was the most effective. The optimum conditions for immobilization were the distance from the end of the tube to the surface of the calcium chloride solution were 12 to 16 cm. and 2% sodium alginate. The optimum conditions for lactic acid production were 90% whey concentration and the temperature was 37°C. The optimum conditions for lactic acid production in 2 liters fermenters were controlled in an agitation rate of 100 rpm and the pH of 6.5 which was able to produce 8.16 g/l lactic acid with a yield of 0.226 g/g and the productivity was 0.170 g/l.h. at the 48th h. These conditions were more effective than the production in 2 liters fermenters controlled by the agitation rate of 100 rpm but the pH was not controlled, the lactic acid was 7.14 g/l and the yield was 0.212 g/l while the productivity was 0.119 g/l.h at the 60th h. while the production in a 2 liters flasks at static conditions and the pH not controlled, the lactic acid was 6.51 g/l with a yield was 0.210 g/l and the productivity was 0.090 g/l.h at the 72nd h. The immobilized cell was able to produce 2 cycles of lactic acid production with the first and second cycles were able to produce 8.47 and 3.61 g/l lactic acid, respectively. Moreover, it was found that lactic acid was not accumulated in the alginate beads.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถประสบความสำเร็จได้เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ รศ. มาลินี ดันดียาภรณ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน ภาควิชา และ รศ.ดร. พรณี จิตาภิชิต ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาควิชา และ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจ แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบริษัท Minor Cheese Limited ที่อนุเคราะห์เวย์ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นำมาใช้ใน งานวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ได้ให้คำปรึกษา ตลอดจนช่วยเหลือ และเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวจงกมล จริยกุล นางสาวฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ ที่ได้คำแนะนำและ คำปรึกษา

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนครอบครัวมันตรงทุกท่านที่ได้สนับสนุนและให้ กำลังใจในการศึกษา และขอขอบคุณพี่น้องและเพื่อนๆที่ได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ที่ได้ช่วยให้ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี

ศิริประภา มันตรง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญรูป.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ประวัติความเป็นมาและความสำคัญของกรดแลกติก.....	4
2.2 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของกรดแลกติก.....	5
2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติก.....	7
2.4 การหมักกรดแลกติก.....	9
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก.....	11
2.6 ความหมายของเอนไซม์และเซลล์ที่ถูกตรึง.....	15
2.7 วิธีการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์.....	16
2.8 แอลจินต.....	19
2.9 ข้อดีและข้อเสียของการใช้เอนไซม์และเซลล์ที่ถูกตรึง.....	20
2.10 ข้อควรคำนึงเมื่อใช้เอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึงกับอาหาร.....	21
2.11 เวย์.....	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	29
3.1 อุปกรณ์.....	29
3.2 วัสดุดิบ.....	30
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย.....	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.4	สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย.....	31
3.5	การเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตใน อาหารสังเคราะห์และอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2	32
3.6	การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต	33
3.7	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 1341	34
3.8	การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงด้วย แคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2	35
3.9	การศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเซลล์ ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในถังหมักขนาด 2 ลิตร	36
3.10	การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักและพลาสติกขนาด 2 ลิตร	36
3.11	การนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตรในเวย์ที่เติม แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2	37
3.12	การศึกษาการสะสมกรดแลกติกภายในเม็ดเจลแคลเซียมแอลจิเนต	37
3.13	การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติ	38
บทที่ 4	ผลการวิจัยและวิจารณ์.....	39
4.1	ผลการเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารสังเคราะห์และอาหารเวย์ ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2	39
4.2	ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์	43
4.3	ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงด้วย แคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2	47
4.4	ผลการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก ของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในถังหมักขนาด 2 ลิตร	51

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักและฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร	54
4.6 ผลการศึกษาการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเตตกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตรในอาหารเวย์ที่เติม แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2	57
4.7 ผลการศึกษาการสะสมกรดแลกติกภายในเม็ดเจลแคลเซียมแอลจินเตต	60
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	61
บรรณานุกรม	62
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	69
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์.....	72
ภาคผนวก ค ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ	85
ภาคผนวก ง รูปเม็ดเจล	96
ประวัติผู้เขียน.....	99

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก	6
2.2 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกในสกุล <i>Lactobacillus</i>	9
2.3 แสดงชนิดของกรดแลกติกที่สร้างโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ	11
2.4 องค์ประกอบโดยประมาณของสปีทเวย์และแอซิโดเวย์.....	24
2.5 องค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์.....	25
2.6 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในโปรตีนอ้างอิงของ FAO จากไข่ นม และเวย์	26
4.1 แสดงปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปในอาหารเวย์ และอาหารสังเคราะห์ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง	38
4.2 แสดงผลของความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนตที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป และค่าพีเอช จากการตรึงเซลล์ <i>L. casei</i> TISTR 1341 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง ณ ชั่วโมงที่ 72.....	43
4.3 แสดงผลของความเข้มข้นของเวย์ที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป และค่าพีเอชจากการตรึงเซลล์ <i>L. casei</i> TISTR 1341 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง ณ ชั่วโมงที่ 72.....	46
4.4 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป และค่าพีเอชในอาหารเวย์ จากการตรึงเซลล์ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ณ ชั่วโมงที่ 72.....	49
4.5 แสดงผลของอัตราการกวนในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต ณ ชั่วโมงที่ 48.....	51
4.6 แสดงปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป โดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต ในถังหมัก และพลาสติกขนาด 2 ลิตร.....	53
4.7 แสดงปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตโดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ.....	56

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงโครงสร้างของกรดแลกติก	5
2.2 แสดงรูปร่างของเชื้อ <i>Lactobacillus casei</i>	8
2.3 แสดงวิธีเมแทบอลิซึมของการใช้น้ำตาลกลูโคสแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ และเฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ.....	10
2.4 แสดงการเชื่อมเอนไซม์หรือเซลล์กับตัวพุง (carrier binding)	17
2.5 แสดงการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์โดยการเชื่อมขวาง (Cross-linking method).....	17
2.6 แสดงการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์โดยการห่อหุ้มเอนไซม์หรือเซลล์ในช่องตาข่าย (Lattice type)	18
2.7 แสดงการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์โดยการห่อหุ้มในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type)...	19
2.8 แสดงโครงสร้างพอลิเมอร์ของแอลจินเนต.....	19
2.9 แสดงสูตรโครงสร้างของน้ำตาลแลคโตสที่ถูกไฮโดรไลซ์.....	24
2.10 Whey permeate.....	26
2.11 ความเป็นไปได้ที่จะนำเวย์มาใช้ประโยชน์.....	28
4.1 แสดงปริมาณกรดแลกติกในอาหารเวย์และอาหารสังเคราะห์ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 134 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	42
4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสในอาหารเวย์และอาหารสังเคราะห์ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 134 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนต อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	42
4.3 แสดงจำนวนเซลล์ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและ เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนต ในอาหารเวย์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง	43
4.4 แสดงผลของความเข้มข้นของโซเดียมแอลจินเนตที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก ในอาหารเวย์จากการตรึงเซลล์ <i>L. casei</i> TISTR 1341 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	46
4.5 แสดงผลของความเข้มข้นของโซเดียมแอลจินเนตที่มีต่อการใช้น้ำตาลแลคโตส ในอาหารเวย์จากการตรึงเซลล์ <i>L. casei</i> TISTR 1341 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	46

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6 แสดงผลของความเข้มข้นของเวย์ที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก จากการตรึงเซลล์ <i>L. casei</i> TISTR 1341 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	48
4.7 แสดงผลของความเข้มข้นของเวย์ที่มีการใช้น้ำตาลแลคโตสของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	49
4.8 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตส จากการตรึงเซลล์ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	51
4.9 แสดงผลของอัตราการกวนในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	53
4.10 แสดงผลของอัตราการกวนในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีต่อการใช้น้ำตาลแลคโตส ของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	53
4.11 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วย แคลเซียมแอลจิเนต ในถังหมักและพลาสติกขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	56
4.12 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต ในถังหมักและพลาสติกขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	56
4.13 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียม แอลจิเนตโดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ	59
4.14 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปโดยเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วย แคลเซียมแอลจิเนตโดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ.....	59

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดแลกติกและอนุพันธ์ของกรดแลกติกเช่น lactylated mono and diglycerides of fatty acids, glyceryl lactostearate และ glyceryl lactopalmitate ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านอาหาร เกษษกรรม อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เนื่องจากกรดแลกติกประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลและไฮดรอกซิล ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงหมู่ทางเคมีได้หลากหลาย จึงได้สารเคมีชนิดใหม่ที่มีประโยชน์เช่น propylene oxide, propylene glycol, acrylic acid, 2,3-pentanedione และ lactate ester กรดแลกติกเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดพอลิแลกติก (polylactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) สามารถทดแทนพลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม นอกจากนี้ยังนิยมใช้เป็นสารปรับความเป็นกรดต่ำ (Acidity Regulator) และใช้เป็นวัตถุกันเสีย สำหรับแคลเซียมแลคเตตมีการใช้เป็นวัตถุทำให้คงรูป (Firming Agents) โดยใช้กับผลไม้ที่นำมาผลิตแยม รวมทั้งผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของพวกดิน ในทางการแพทย์ใช้แคลเซียมแลคเตตเป็นส่วนผสมของยาลดกรดในกระเพาะ และช่วยรักษาการขาดแคลเซียมในร่างกาย (Dailey et al. 2000)

การผลิตกรดแลกติกสามารถผลิตได้จากกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ แต่การผลิตทางเคมีจะทำให้ได้กรดแลกติกที่อยู่ในรูปผสม (DL Lactic) ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์จึงมีค่าใช้จ่ายสูงและมีความยุ่งยาก แต่การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพสามารถเลือกผลิตให้อยู่ในรูป D (-) Lactic หรือ L (+) Lactic โดยการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เหมาะสม สามารถเจริญได้ในวัตถุดิบที่มีราคาถูก ให้ผลผลิตสูง ดังนั้นการนำวัสดุเหลือทิ้งหรือผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่นกากน้ำตาล เวช มาใช้ในการผลิตกรดแลกติกทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ (Laskin. 1985) การหมักแบบกะเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม โดยมีการใช้เซลล์อิสระถึงร้อยละ 50 แต่พบว่าผลผลิตที่ได้มีปริมาณน้อย เนื่องจากในการหมักกรดแลกติกนั้นมักมีปัญหาในเรื่องของปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังนั้นการนำเทคนิคการตรึงเซลล์มาป้องกันไม่ให้เซลล์สัมผัสกับกรดแลกติกโดยตรง เพื่อให้สามารถทนต่อปริมาณกรดแลกติก ช่วยรักษาเซลล์ ลดการยับยั้งเนื่องจากยับยั้งที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อให้เชื้อผลิตกรดแลกติกได้มาก สามารถแยกตัวเซลล์ออกจากอาหาร โดยไม่ต้องอาศัยการปั่นเหวี่ยงหรือการกรอง ซึ่งเป็นการลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ และสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้

การนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอุตสาหกรรมมาเพิ่มมูลค่าเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากการลดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมและลดต้นทุนการผลิตเพราะมีราคาถูกหรือไม่มีมูลค่า เช่น เว้ย กากน้ำตาล ลิกโนเซลลูโลส เป็นต้น ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีองค์ประกอบที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติก เว้ยเป็นผลิตภัณฑ์ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมเนยแข็ง ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม แต่เว้ยสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้เนื่องจากในเว้ยประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส น้ำ โปรตีนที่ละลายได้ วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ (Roukas, 1997) ซึ่งเหมาะแก่การนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติก จึงได้มีการศึกษาการนำเว้ยมาใช้ประโยชน์เช่น การนำเว้ยมาผลิตกรดแลกติก โดยวิธีเลี้ยงแบบกึ่งกะ การนำมาผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการเลี้ยงแบบกะ (Fitzpatrick and O'Keefe, 2001)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาการเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกโดยการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ด้วยแคลเซียมแอลจีเนต
- 1.2.2 ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเว้ยในการผลิตกรดแลกติกเปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์
- 1.2.3 ศึกษาสัณฐานภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงโดยการนำมาใช้ซ้ำ (cell recycle) เพื่อผลิตกรดแลกติก
- 1.2.4 ศึกษาการสะสมกรดแลกติกภายในแคลเซียมแอลจีเนต

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ทดลองเพื่อเปรียบเทียบชนิดของอาหาร ได้แก่ อาหารสังเคราะห์และอาหารเว้ย และลักษณะของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก ได้แก่การใช้เซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึง โดยศึกษาในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และศึกษาสัณฐานภาพในการผลิตกรดแลกติกของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนตในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตรและฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรในอาหารเว้ยโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก พีเอช และน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปก่อนและหลังการหมัก จากนั้นนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อศึกษาจำนวนรอบในการหมักแบบกะโดยเซลล์ที่ถูกตรึงยังคงมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติก และศึกษาการสะสมกรดแลกติกภายในเม็ดเจลแคลเซียมแอลจีเนตในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกจากเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินेट

1.4.2 เป็นการนำเวย์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็งมาใช้ประโยชน์ รวมทั้งเพิ่มมูลค่าและลดปัญหาสิ่งแวดล้อม

1.4.3 เป็นการนำเวย์มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติก เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.4.4 ลดขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อโดยการนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการผลิตกรดแลกติก



บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติความเป็นมาและความสำคัญของกรดแลกติก

แบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกเป็นที่รู้จักและนำมาใช้ประโยชน์เป็นเวลานานในการผลิตนมเปรี้ยว เนยแข็ง ผักและผลไม้หมักดอง และขนมปังจากโคเปรี้ยว กรดแลกติกได้ผลิตขึ้นเป็นการค้าครั้งแรกที่เมือง Littleton รัฐ Massachusetts ในปีค.ศ.1881 และในปีค.ศ.1980 สหรัฐอเมริกาและยุโรปผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมมากถึง 40,000 ตัน โดยการหมักแบบกะและการสังเคราะห์ทางเคมี เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมอาหาร (Wee *et al.* 2004) กรดแลกติกเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดพอลิแลกติก (polylactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สามารถทดแทนพลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม ในอุตสาหกรรมอาหารจะมีการใช้กรดแลกติกเป็นสารปรับความเป็นกรดค่า (Acidity Regulator) กรดแลกติกได้นำมาใช้ในการปรับความเป็นกรดค่าในอุตสาหกรรมต่างๆเช่น ใช้ผสมกับน้ำยาที่ช่วยเพิ่มความแข็งให้กับเซลโลเฟนเพื่อใช้ในการบรรจุอาหาร น้ำยาล้างฟิล์มถ่ายรูป การพิมพ์สิ่งทอ น้ำยาเคลือบโลหะและขี้ดงา ใช้เป็นวัตถุดิบเสียในอาหาร ในด้านเภสัชกรรมนิยมใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง ครีม และเป็นส่วนผสมของครีมเพื่อป้องกันสิว พอลิเมอร์ของกรดแลกติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ได้นำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์เช่น โหนเย็บแผล การทำศัลยกรรมกระดูก เป็นต้น (Laskin, 1985)

แคลเซียมแลคเตตมีการใช้เป็นวัตถุทำให้คงรูป (Firming Agents) ใช้กับผลไม้ที่นำมาผลิตแยม ใช้ในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพกติน ทำให้ผักและผลไม้มีความคงตัวมากขึ้น ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสีและกลิ่นรสของผักและผลไม้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป สำหรับในผลิตภัณฑ์ปลา เนื้อ และสัตว์ปีก มีการใช้กรดแลกติกหรือเกลือแลคเตตเพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษา ในผลิตภัณฑ์ขนมอบช่วยทำให้เกิดเจลที่ดีขึ้น ช่วยปรับปรุงคุณภาพของนมผง นมข้น (สิวาพร สิวเวช. 2546) ในทางการแพทย์ใช้แคลเซียมแลคเตตเป็นส่วนผสมของยาลดกรดในกระเพาะ และช่วยรักษาการขาดแคลเซียมในร่างกาย โดยอาจจะเสริมในนม หรือน้ำผลไม้ หรืออาหารอื่นๆ หรือจะบริโภคในรูปแบบของแคลเซียมแลคเตต ส่วนผู้ขาดธาตุเหล็ก สังกะสีและแมกนีเซียม ก็สามารถบริโภคอาหารที่มีการเสริมด้วยเฟอร์รัสแลคเตต (ferrous lactate) ซิงค์แลคเตต (zinc lactate) และแมกนีเซียมแลคเตต (magnesium lactate) (Dailey *et al.* 2000)

อนุพันธ์ของกรดแลกติกชนิดอื่น เช่น lactylated mono and diglycerides of fatty acids, glyceryl lactostearate และ glyceryl lactopalmitate นิยมใช้เป็นตัวกระทำอิมัลชันในผลิตภัณฑ์ขนมอบ โดยเฉพาะในแป้งเค้กสำเร็จรูปและเนยขาว เป็นต้น สำหรับ calcium stearyl - 2 - lactylate นิยมใช้

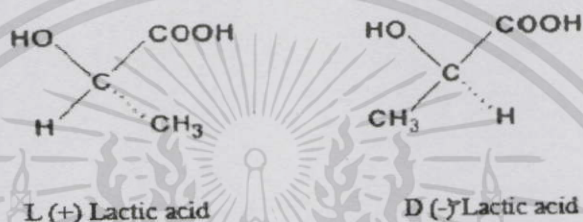
เอกสารนี้เป็นตัวกระทำอิมัลชันในผลิตภัณฑ์ขนมปัง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้กรดแลกติก ได้แก่ แยม เยลลี่ ไม่ว่าจะฉีกใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซอร์เบต ผลิตภัณฑ์ขนมหวานเช่น ลูกกวาด ลูกอม ช็อกโกแลต หมากฝรั่ง เครื่องดื่มชนิดต่างๆ ซอส และผักดอง (FDA. 1988)

2.2 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดแลกติก

2.2.1 คุณสมบัติทางเคมี

กรดแลกติกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid สูตรโมเลกุล $C_3H_6O_3$ กรดแลกติกมี 2 ไอโซเมอร์ดังรูป 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของกรดแลกติก

ที่มา: www.bioline.org.br/.../ej0402/ej04016e4.jpg

2.2.2 คุณสมบัติทางกายภาพ

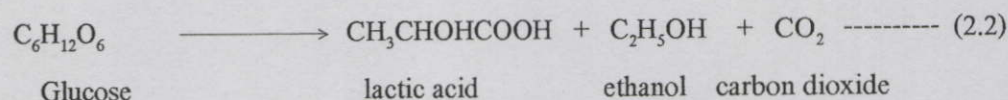
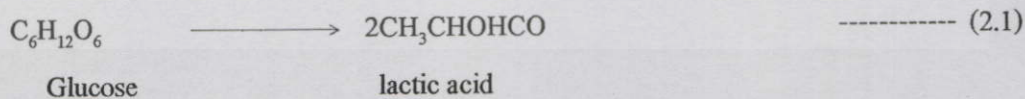
คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติกแสดงในตารางที่ 2.1

2.2.3 กระบวนการผลิตกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกมี 2 ชนิด คือ โฮโมแลกติกแบคทีเรียและเฮเทอโรแลกติกแบคทีเรีย ซึ่งขั้นตอนในการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงดังสมการที่

2.1 และ 2.2



ที่มา : Muller (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

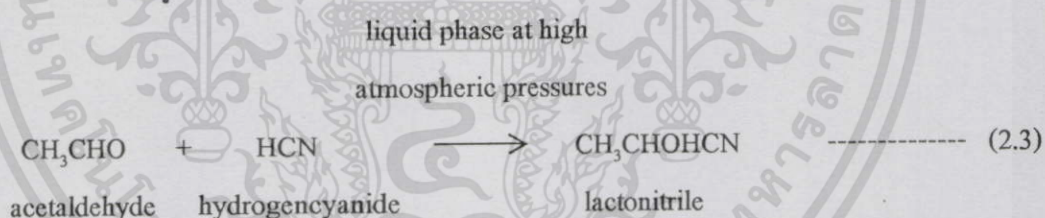
คุณสมบัติทางกายภาพ	กรดแลกติก
น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)	90.08
จุดหลอมเหลว (Melting point)	16.8 °C
จุดเดือด (Boiling point)	82 °C ที่ความดัน 0.5 mm.Hg 122 °C ที่ความดัน 14 mm.Hg
ค่าคงที่ของการแตกตัว (K_a ที่อุณหภูมิ 25 °C)	1.37×10^{-4}
ค่าความร้อนของการเผาไหม้ (ΔH_c)	1361 KJ/mole
ค่าความร้อนจำเพาะ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

ที่มา : Narayanan *et al.* (2004)

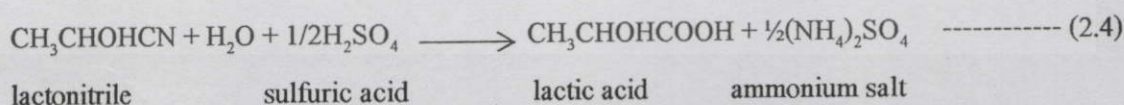
การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี

การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมีแบ่งได้ 3 ขั้นตอนดังนี้

1. นำ hydrogen cyanide ทำปฏิกิริยากับ acetaldehyde ได้ lactonitrile ทำปฏิกิริยาที่ความดันบรรยากาศ ดังสมการที่ 2.3

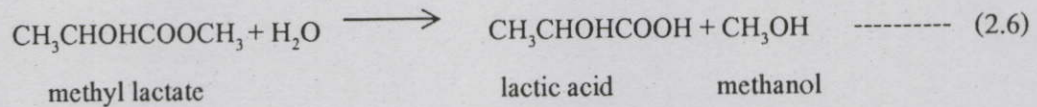
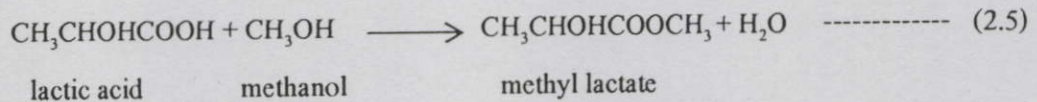


2. นำ lactonitrile มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟิวริกจะได้กรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียม ดังสมการที่ 2.4



3. นำกรดแลกติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเตอร์ คือเมทิลแลกเตต จากนั้นนำเมทิลแลกเตตมากลั่นและย่อยจะได้กรดแลกติก ส่วนเมทานอล hydrogen cyanide และสารปนเปื้อนอื่นๆจะกำจัดออกโดยนำมาผ่านถ่านกัมมันต์ และการแลกเปลี่ยนไอออน ดังสมการที่ 2.5 และ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ที่มา: Narayanan *et al.* (2004)

2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติก

Salminen *et al.* (2004) ได้อธิบายถึงแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกว่าเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างแท่ง (rod) หรือกลม (cocci) สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมัก การจัดสกุสต่างๆเข้าสู่กลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกพิจารณาจากรูปร่างพื้นฐาน การหมักน้ำตาลกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ลักษณะกรดแลกติกที่สร้าง ความสามารถในการเจริญในบริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง การทนต่อความเป็นกรดต่ำ ประกอบด้วยสกุสที่มีความสำคัญทางด้านเทคโนโลยีด้านอาหาร เช่น *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella*

Lactic acid bacteria เป็นคำที่ใช้เรียกมานานตั้งแต่ก่อน ค.ศ. 2000 หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่ทำให้นมเปรี้ยว (milk-souring organisms) แบคทีเรียชนิดแรกที่แยกได้บริสุทธิ์ คือ *Bacterium lactis* โดย J. Lister ในปี ค.ศ. 1873 มีการพัฒนาวิธีการจัดจำแนกเกิดขึ้นเมื่อพบความเหมือนระหว่างแบคทีเรียที่ทำให้นมเปรี้ยวและแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกจากแหล่งต่างๆ ต่อมา Orla-Jensen ได้เสนอโมโนกราฟ (monograph) แสดงการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางรูปร่างพื้นฐาน การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และการใช้น้ำตาล สามารถจัดจำแนกได้ 6 สกุสคือ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* และ *Enterococcus*

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก ได้แก่

Lactobacillus

Lactobacillus แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามตารางที่ 2.2

Pediococcus

แบคทีเรียในสกุสนี้จะอยู่กันเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายสั้นๆ ทนต่อความเป็นกรดสูง และมีการหมักน้ำตาลแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ ให้กรดประมาณร้อยละ 0.5-0.9 ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักผลิตภัณฑ์จากพืชต่างๆ เช่น กะหล่ำปลีคอง แดงกวาดอง และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์เช่น ไส้กรอก และเบคอน

Leuconostoc

แบคทีเรียในสกุลนี้มีรูปร่างทรงกลม อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสกุลนี้เป็นสาเหตุทำให้เนยแข็งและน้ำเชื่อมเสื่อมสภาพ ทำให้มีปัญหาในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลซูโครสจากน้ำอ้อย แต่มีประโยชน์ในการทำแป้งหมักขนมปัง

Lactococcus

แบคทีเรียในสกุลนี้มีรูปร่างทรงกลม มีการหมักน้ำตาลแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ มีความสำคัญในการผลิตโยเกิร์ต และเนยแข็ง แหล่งที่พบแบคทีเรียสกุลนี้ได้แก่ นมสด ถั่วและฮอป

Streptococcus

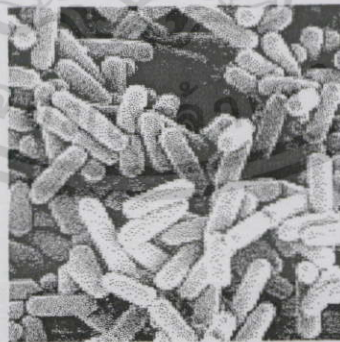
แบคทีเรียในสกุลนี้ส่วนมากก่อให้เกิดโรค อย่างไรก็ตาม *Streptococcus thermophilus* มีความสำคัญในด้านการผลิตโยเกิร์ต เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนยแข็ง

Enterococcus

แบคทีเรียในสกุลนี้ส่วนมากพบในลำไส้ใหญ่ หากพบเชื้อนี้จะบ่งบอกสุขลักษณะที่ไม่สะอาด (Bamforth, 2005)

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาคือ *Lactobacillus casei* เป็นแบคทีเรียทนกรด (acid tolerant) รูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เซลล์มีขนาด 0.7-1.1 x 2.0-4.0 ไมโครเมตร มีกระบวนการหมักแบบแฟลคัลเททีฟเฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (facultative heterofermentative) ได้ผลิตภัณฑ์หลักคือกรดแลคติก สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นมดิบ นมหมัก ผักผลไม้หมัก ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ในอุตสาหกรรมมีการผลิตเพื่อเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกและเชื้อตั้งต้นในอุตสาหกรรมนมหมักเป็นต้น (Salminen et al., 2004) รูปร่างของเชื้อ *Lactobacillus casei* แสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงรูปร่างของเชื้อ *Lactobacillus casei*

ที่มา : bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm

ตารางที่ 2.2 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกในสกุล *Lactobacillus*

ลักษณะ	กลุ่ม1	กลุ่ม2	กลุ่ม3
	Obligately homofermentative	Facultative heterofermentative	Obligately heterofermentative
การหมักน้ำตาลเพนโตส	-	+	-
การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	-	-	+
การสร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส	-	+	+
เอนไซม์ FDP aldolase	+	+	-
เอนไซม์ Phosphoketolase	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbruckii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. reuteri</i>

ที่มา: Salminen *et al.* (1998)

ตัวอย่างแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกแสดงในตารางที่ 2.3

นอกจากแบคทีเรียยังมีเชื้อราและยีสต์ที่สามารถสร้างกรดแลกติก ได้แก่ *Rhizopus oryzae* *Aspergillus awamori* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น (Salminen *et al.* 2004)

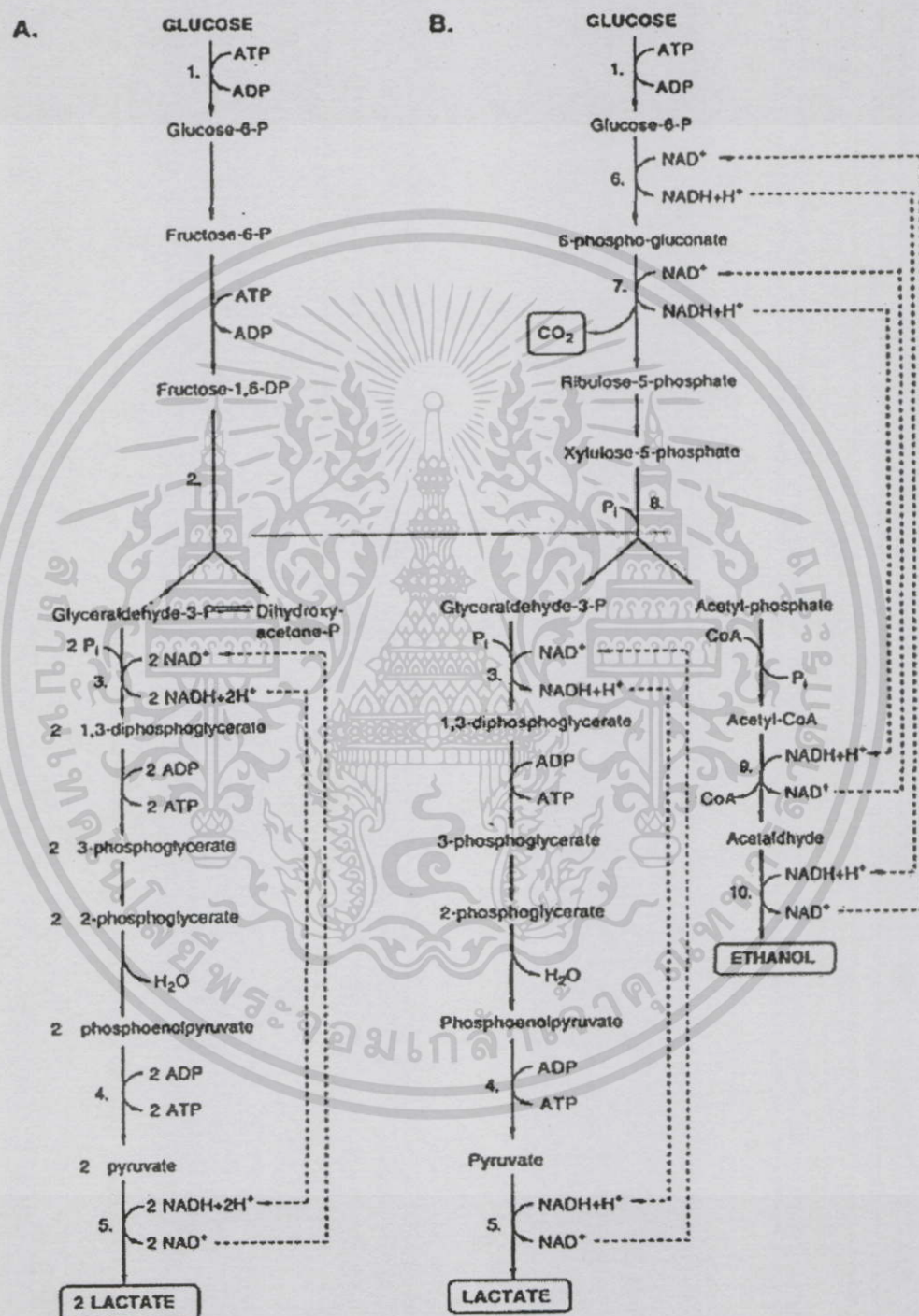
2.4 การหมักกรดแลกติก (Lactic acid fermentation)

กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมักกลูโคสของแบคทีเรียพวกที่สร้างกรดแลกติก กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสมี 2 แบบคือ

2.4.1 โฮโมแลกติกเฟอเมนเตทีฟ (Homolactic fermentative) เป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือกรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ โดยกลไกการเกิดกรดแลกติกคือการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ด้วยวิถีไกลคอลิซิส (glycolysis) แล้วเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแลกติกดังรูป 2.3 (A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 เซทเทอโรแลกติกเฟอร์เมนเตทีฟ (Heterolactic fermentative) เป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลกติก เอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือกรดอะซิติก กลไกการเกิดกรดแลกติก ดังรูป 2.3 (B)



รูปที่ 2.3 แสดงวิถีเมแทบอลิซึมของการใช้น้ำตาลกลูโคสแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (A) และเซทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (B)

ที่มา: Salminen *et al.* (2004) การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่จำกัดลิขสิทธิ์อื่น ๆ อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงชนิดของกรดแลกติกที่สร้างโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

ชนิดของกรดแลกติก	แบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติก
L(+) lactic acid (95%)	Streptococci ทุกสายพันธุ์ที่สร้างกรดแลกติก <i>L. casei</i> <i>L. xylosum</i>
D (-) lactic acid (100%)	<i>L. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>
สร้างได้ทั้ง L (+) และ D (-) lactic acid	<i>L. helveticus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. brevis</i>

ที่มา: Nakazawa and Hosonoc (1992)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆต่อไปนี้

2.5.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นข้อจำกัดที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเป็นการลดต้นทุนในการผลิต และเป็นการใช้วัสดุเหลือทิ้งให้เกิดประโยชน์ ซึ่งมีหลากหลายชนิดดังนี้

เวย์ (whey) เป็นแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในการผลิตกรดแลกติก เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็ง โดยทั่วไปใช้เป็นแหล่งอาหารสัตว์ สามารถย่อยสลายได้กับโคสและกาแลคโตส จะต้องเติมสารอาหารเช่น ยีสต์สกัด เปปโตน แป้งข้าว นมผง หรือน้ำแร่ข้าวโพด เป็นต้น สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ผลิตกรดแลกติกจากเวย์เช่น *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. helveticus* และ *L. casei*

กากน้ำตาล (molass) เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำตาล ใช้เป็นคาร์บอนในการผลิตเอทานอล เซลลิวโลส และกรดแลกติก น้ำตาลที่พบคือ ซูโครสที่มีความเข้มข้นสูง อาจทำให้สารละลายมีความหนืดสูง สายพันธุ์แบคทีเรียที่นิยมใช้ผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาลคือ

L. delbrueckii

แป้ง (starch) เป็นคาร์บอนที่นิยมใช้ผลิตกรดแลกติก ได้จากธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด มันฝรั่ง ข้าว ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เลย์ แบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ เช่น *L. fermentum*, *L. amylovorus* และ *L. amylophilus* บางครั้งอาจเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์อะไมเลสลงไปเพื่อย่อยแป้งก่อน จากนั้นจึงเกิดการหมักโดยแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติก แบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกที่สามารถใช้แป้งเป็นซับสเตรตได้เช่น *L. casei*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* และ *Lactococcus lactis* เป็นต้น

ลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic material) ตัวอย่างเช่น เศษกระดาษเหลือทิ้ง (waste paper) เศษไม้ (plant material) และไม้ ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆเช่น กลูโคส กาแลกโตส แมนโนส และน้ำตาลเพนโทสเช่น ไซโลส อะราบีโนส ซึ่งจำเป็นต้องย่อยสลายก่อนเพื่อให้เกิดการหมักได้ (Hofvendahl and Hagerdal. 1997)

Yun *et al.* (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตกรดแลกติก จากเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกาแลกโตส น้ำตาลแลกโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์และแป้ง พบว่าการใช้ ไซโลส กลีเซอรอล เวย์ และแป้งเป็นซับสเตรต ให้ปริมาณกรดแลกติกที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้กลูโคส ฟรุกโตส และมอลโตส เป็นซับสเตรต

Wee *et al.* (2004) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากก้าน้ำตาลในการผลิตกรดแลกติก โดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 95.7 กรัมต่อลิตร ผลได้ร้อยละ 94.9

Kadam *et al.* (2006) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 พบว่า มอลโทส ไซโลส และซูโครส ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างกรดแลกติก แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ กลูโคส ฟรุกโตส แลกโตส และกาแลกโตส

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกจะใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนแหล่งของไนโตรเจนมีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ โดยชนิดและความเข้มข้นของธาตุอาหารที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ซึ่งจะต้องปรับสภาวะให้เหมาะสมถึงจะได้ผลผลิตสูงขึ้น (สมใจ สิริโกภ. 2544)

Hofvendahl and Hagerdal (1997) ศึกษาผลของการเติมยีสต์สกัดในสารสกัดแป้งสาลี (wheat flour hydrolysate) เพื่อผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* และ *Lactobacillus bulgaricus* พบว่าการเติมยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตรทำให้การผลิตกรดแลกติกของเชื้อทั้งสองสูงกว่าเมื่อไม่มีการเติม

Nancib *et al.* (2001) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพดและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในน้ำอินทผลัม โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดี คือ ยีสต์สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pauli and Fitzpatrick (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยมีการเติมสารสกัดจากมอลต์และยีสต์สกัดลงไปเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าเมื่อเติมสารสกัดจากมอลต์และยีสต์สกัดลงไป ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงกว่าเมื่อไม่มีการเติม

Wee *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล โดยแปรผันปริมาณยีสต์สกัด 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าการเติมยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดถึง 5.3 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Altaf *et al.* (2005) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วเบงกอล ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และ baker's yeast เติมลงไปในแป้งซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV6 พบว่าประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกสูงถึงร้อยละ 92

Kadam *et al.* (2006) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน ประกอบด้วย ยีสต์สกัด ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) และ skim milk ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 236 พบว่า ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด

แร่ธาตุที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างกรดแลกติกได้แก่ เกลืออนินทรีย์ของธาตุโพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และแมงกานีส เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีโคบอลต์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีสและสังกะสี แต่โดยทั่วไปมักจะพบแร่ธาตุเหล่านี้เจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการเลี้ยงเชื้อ (สมใจ ศิริโชค. 2544)

Fitzpatrick *et al.* (2001) ศึกษาผลของแมงกานีสต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่า การเติม $MnSO_4 \cdot H_2O$ ปริมาณ 0.001-0.03 กรัมต่อลิตร ร่วมกับยีสต์ลงไป ในเวย์ มีผลดีต่อการลดระยะเวลาในการหมัก โดยใช้เวลา 24 ชั่วโมงจาก 120 ชั่วโมง

Kim *et al.* (2003) ศึกษาผลของแร่ธาตุที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกในเศษอาหารเหลือทิ้งจากโรงงาน พบว่าการเติม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $MnSO_4 \cdot H_2O$ ทำให้ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง

Ohkouchi and Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งและเศษอาหารที่เหลือทิ้งจากโรงอาหาร โดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011 พบว่าเมื่อเติมแมงกานีสลงไป ปริมาณกรดแลกติกจะสูงกว่าเมื่อเทียบกับการไม่เติมแมงกานีส

2.5.4 ฟีเอช

การควบคุมฟีเอชในการหมักให้เหมาะสม จะทำให้การสร้างกรดเกิดขึ้นได้ดี โดยทั่วไปฟีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกอยู่ในช่วง 5-6 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ การควบคุมฟีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อให้ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่ละลายน้ำถ้าฟีเอชลดลงคาร์บอเนตเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะสลายตัวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชคงที่ประมาณ 7 หรืออาจควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการเติมกรดหรือด่าง เช่น กรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์

Roukas and Kotzekidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactococcus lactis* ได้มีการปรับค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.7 – 6.3 พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้สูงถึงร้อยละ 48.4

Pauli and Fitzpatrick (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าการควบคุมให้ค่าพีเอชอยู่ที่ 5.4 เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

Wee et al. (2004) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าพีเอช 6 สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 96.1 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 96.3

Chauhan et al. (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus* sp. KCPO1 พบว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 45.59 กรัมต่อลิตร เทียบกับการไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งสามารถผลิตได้เพียง 16.5 กรัมต่อลิตร

Huang et al. (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่งโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 6 – 7

Kourkoutas et al. (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ด้วยวิธีการตรึงเซลล์กับแอปเปิล (apple) และควินซ์ (quince) พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกอยู่ในช่วง 5.5 – 6.0

Kadam et al. (2006) ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2361 สำหรับการผลิตกรดแลกติก พบว่าเชื้อเจริญได้ดีต้องมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปด้วย

2.5.5 การให้อากาศ

ออกซิเจนเป็นธาตุชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศ (aerobe) ปริมาณออกซิเจนในอาหารจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญและการผลิตสารเมแทบอลิท์ (สนใจ สิริโชค, 2544)

Roukas and Kotzekidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactococcus lactis* มีการกวนให้อากาศ 300 รอบต่อนาที พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

Fu and Mathew (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยมีการพ่นอากาศ 0.5-1.0 vvm. เปรียบเทียบกับการไม่พ่นอากาศ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่ไม่มีการพ่นอากาศมากกว่า 2.3 เท่า แต่พบว่าปริมาณเซลล์ที่ได้น้อยกว่าสภาวะที่มีการพ่นอากาศ

Nancib *et al.* (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำอีนทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ได้มีการให้อากาศโดยการกวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญอยู่ในช่วง stationary phase ภายในเวลา 20 ชั่วโมง

2.5.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิจะขึ้นกับชนิดของเชื้อที่ใช้และสภาวะอื่นๆของกระบวนการหมัก แต่โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 37-45 องศาเซลเซียส (สมาใจ สิริโรภค. 2544)

Wee *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาลโดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกคือ 38 องศาเซลเซียส

Oh *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูกโดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูง

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

John *et al.* (2006) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียสสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด

2.6 ความหมายของเอนไซม์และเซลล์ที่ถูกตรึง

การตรึงเอนไซม์เดิมมีการพัฒนาเพื่อวัตถุประสงค์ให้สามารถใช้เอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงขั้นตอนที่ยุ่งยากในการแยกสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์จุลินทรีย์หรือการใช้ระบบเอนไซม์รวม จึงได้มีการพัฒนาการตรึงเซลล์จุลินทรีย์และมีวิธีการคล้ายกับการตรึงเอนไซม์ โดยได้ให้คำนิยามในลักษณะเดียวกับการตรึงเอนไซม์ คือเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงจำกัดให้อยู่ต่อเนื่องในบริเวณใดบริเวณหนึ่งและมีคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างต่อเนื่อง (Laskin. 1985)

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยทั่วไปทำได้โดยการทำให้เซลล์จุลินทรีย์จับกับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ หรือของแข็งในลักษณะของ วิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ (Covalent bonding) วิธีห่อหุ้ม (Entrapment) วิธีดูดซับทางกายภาพ (Adsorption) หรือวิธีเชื่อมขวาง (Cross linking) การพัฒนาจุลินทรีย์ด้วยการตรึงเซลล์ไม่ให้เคลื่อนที่ก็เพื่อประโยชน์คือ ให้มีชุดของเอนไซม์จากเซลล์พร้อมสำหรับการใช้ ให้มีแหล่งของเซลล์จำนวนมากเพื่อใช้ในงานที่ต้องการปริมาณเซลล์มาก และให้มีที่เก็บเซลล์ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ต้องการให้เจริญต่อไปขณะอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ประโยชน์ต่างๆเหล่านี้มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของจุลินทรีย์ได้ (วิเชียร ตีลาวัชรมาศ. 2526)

2.7 วิธีการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์

แบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ดังนี้

2.7.1 การเชื่อมกับตัวพุง (carrier binding)

หมายถึงการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์หรือเซลล์กับตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำ (Laskin. 1985) แบ่งออกได้เป็น 3 วิธีดังนี้ (วิเชียร ตีลาวัชรมาศ. 2526)

2.7.1.1 การดูดซับ (Adsorption)

หมายถึง การดูดซับเอนไซม์หรือเซลล์เอาไว้บนสารพุงของแข็ง (solid support) ด้วยแรงอื่นที่ไม่ใช่แรงยึดร่วม (covalent linkages) เช่น แรงยึดระหว่างไอออน (ionic bonding) แรงยึดระหว่างไฮโดรเจน (hydrogen bonding) หรือแรงยึดระหว่างสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic bonding) แรงยึดที่เกิดขึ้นระหว่างเอนไซม์หรือเซลล์กับสารพุงจะอ่อนมาก ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น พีเอช ความแรงของไอออน และอุณหภูมิ การนำตัวพุงมาใช้ซ้ำทำได้ง่าย เหมาะกับตัวพุงราคาแพง วิธีนี้เหมาะกับเอนไซม์ที่ถูกกระทบได้ง่ายต่อวิธีการเชื่อมพันธะเคมี เช่น อินเวอร์เทส เนื่องจากกรรมวิธีไม่ซับซ้อน และไม่รุนแรง เป็นกรรมวิธีที่ใช้ได้กับเอนไซม์ทุกชนิด ตัวอย่างตัวพุงเช่น bentonite, calcium phosphate gel, activated carbon, porous glass, acid clay, kaolinite-aluminar และ โพลิเมอร์ธรรมชาติเช่น แป้ง กวูดิน คอลลาเจน

2.7.1.2 วิธีเชื่อมแบบพันธะไอออน (Ionic binding method)

หมายถึง การเชื่อมระหว่างโปรตีนของเอนไซม์หรือเซลล์กับตัวพุงที่ไม่ละลายในสารละลายปฏิกิริยา โดยใช้พันธะไอออน

ตัวอย่างตัวพุง ได้แก่ สารที่มีอนุภาคแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange residue) ได้แก่ พอลิแซคคาไรด์ พอลิเมอร์สังเคราะห์ และอนุภาคประจุในตัวพุง และเอนไซม์ต้องแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ที่มีอนุภาคประจุบวก (anionic enzyme) เช่น กลูโคสไมเลส และตัวพุงที่มีประจุลบ (cationic residue) เช่น DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex

ลักษณะสำคัญของการตรึงรูปวิธีเชื่อมพันธะไอออนคือ

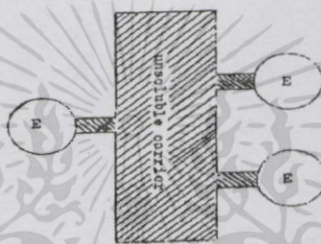
1. มีผลต่อกิจกรรมและโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์น้อย ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์อาจคงเดิม

2. แรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์หรือเซลล์กับตัวพุงอ่อน อาจหลุดง่ายที่ความเข้มข้นไอออนสูง (ionic strength) หรือแรงเกาะกันจะลดลงเมื่อเปลี่ยนพีเอช

3. กรรมวิธีไม่ซับซ้อน ใช้หลักการเชื่อมไอออนเหมือนการแลกเปลี่ยนไอออนของสารชีวภาพอื่นๆได้

2.7.1.3 วิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ (Covalent binding method)

หมายถึง การเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพวงด้วยพันธะโคเวเลนต์ พันธะโคเวเลนต์ เป็นพันธะที่เกิดจากอะตอมรวมกันโดยการถ่ายเทอิเล็กตรอนอย่างสมบูรณ์ และอะตอมใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน เนื่องจากพันธะโคเวเลนต์ต้องผ่านขั้นตอนของการสลายพันธะโคเวเลนต์เดิม ดังนั้นพลังงานการสลาย (dissociation energy) ยิ่งสูง โมเลกุลใหม่ที่ได้จะมีพันธะโคเวเลนต์ที่แข็งแรง และเสถียร รูปแสดงการเชื่อมเอนไซม์หรือเซลล์กับตัวพวง (carrier binding) แสดงในรูปที่ 2.4

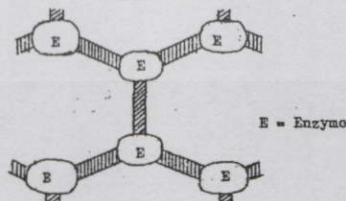


รูปที่ 2.4 แสดงการเชื่อมเอนไซม์หรือเซลล์กับตัวพวง (carrier binding)

ที่มา: วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2526)

2.7.2 วิธีเชื่อมขวาง (Cross-linking method)

การทำเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูปโดยวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะเคมีเหมือนกับการสร้างพันธะโคเวเลนต์ แต่ไม่ใช่ตัวพวง เอนไซม์หรือเซลล์จะถูกตรึงรูปอยู่ได้ด้วยวิธีการสร้างพันธะเชื่อมขวางระหว่างภายในโมเลกุลเอนไซม์หรือเซลล์ โดยอาศัยสารเชื่อมขวางซึ่งทำหน้าที่เชื่อมขวางระหว่างโมเลกุล 2 โมเลกุล หรือมากกว่า หรือเรียก cross-linkers ซึ่งมีผลให้เอนไซม์หรือเซลล์หลายโมเลกุลเกาะกลุ่มเป็นโมเลกุลใหญ่ ละลายน้ำได้น้อยลง รูปแสดงการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์โดยการเชื่อมขวาง (Cross-linking method) แสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์โดยการเชื่อมขวาง (Cross-linking method)

ที่มา : วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2526)

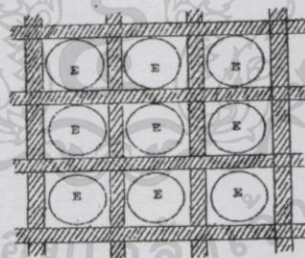
2.7.3 วิธีห่อหุ้ม (Entrapping method)

วิธีห่อหุ้มเป็นวิธีสร้างรูปแบบรวมเอนไซม์อิสระหรือเซลล์ไว้ในช่องว่างตาข่ายพอลิเมอร์ หรือห่อหุ้มเอนไซม์อิสระหรือเซลล์ไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้สารซึมผ่านได้บ้าง (semipermeable membrane) ดังนั้นจึงแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ ห่อหุ้มเอนไซม์หรือเซลล์ในช่องตาข่าย (lattice type) และห่อหุ้มเอนไซม์หรือเซลล์ในแคปซูลเล็ก (microcapsule type) การสร้างวิธีนี้แตกต่างจากวิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ และวิธีเชื่อมขวาง คือ เอนไซม์หรือเซลล์ไม่เชื่อมพันธะเคมีใดๆกับสารห่อหุ้ม ด้วยเหตุนี้วิธีนี้จึงนิยมใช้อย่างแพร่หลาย

2.7.3.1 วิธีห่อหุ้มเอนไซม์หรือเซลล์ในช่องตาข่าย (Lattice type)

การห่อหุ้มเอนไซม์หรือเซลล์ในช่องตาข่ายของพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้ในลักษณะที่ผสมเอนไซม์หรือเซลล์เข้ากับสารห่อหุ้มในขณะที่กำลังจะเกิดพอลิเมอร์ โมเลกุลของเอนไซม์หรือเซลล์จะถูกห่อหุ้มด้วยช่องตาข่ายอย่างสม่ำเสมอทุกช่องอย่างซ้ำๆ ตัวอย่างพอลิเมอร์และโมโนเมอร์และสารเชื่อมขวางที่ใช้ในการห่อหุ้มคือ

พอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ แป้ง ไคติน ไคโตซาน แอลจินेट และคาราจีแนน เป็นต้น พอลิเมอร์สังเคราะห์ (สร้างจากสารโมโนเมอร์และโคเมอร์) ได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinylalcohol) พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) สารเชื่อมขวางระหว่างสายพอลิเมอร์ ได้แก่ กลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และสารอื่นๆตามความเหมาะสมของชนิดพอลิเมอร์สังเคราะห์ และพันธะเคมีที่เกี่ยวข้อง (ปราณี อ่านเรื่อง. 2535) รูปแสดงการสร้างเอนไซม์หรือเซลล์โดยการห่อหุ้มในช่องตาข่าย (Lattice type) แสดงในรูปที่ 2.6

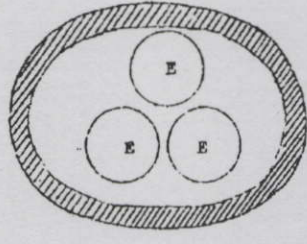


รูปที่ 2.6 แสดงการสร้างเอนไซม์หรือเซลล์โดยการห่อหุ้มในช่องตาข่าย(Lattice type)

ที่มา : วิเชียร สิวาธรรมาส (2526)

2.7.3.2 วิธีห่อหุ้มเอนไซม์หรือเซลล์ในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type)

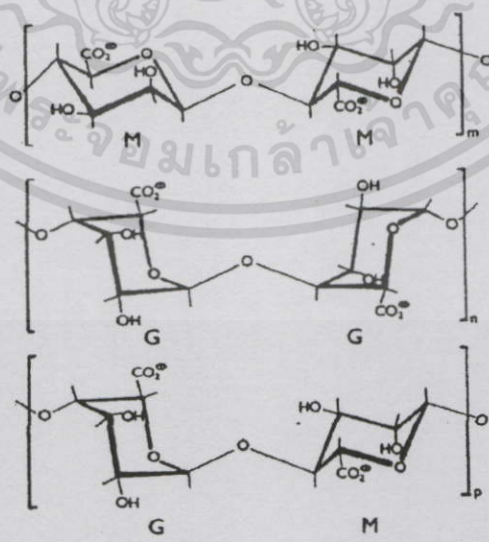
วิธีห่อหุ้มเอนไซม์หรือเซลล์ในแคปซูลเล็กทำได้โดยให้เอนไซม์หรือเซลล์ถูกห่อหุ้มไว้ใน semi-permeable membrane ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แสดงการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์โดยการห่อหุ้มในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type)
ที่มา : วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2526)

2.8 แอลจีเนต (alginate)

แอลจีเนตเป็นที่รู้จักกันดีในการนำมาเป็นอาหารและใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากกว่า 60 ปี เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีในด้านความคงตัว หนา ทำให้เกิดเจลได้ สามารถทำให้เป็นแผ่นฟิล์ม ปลอดภัยและไม่เป็นพิษ แอลจีเนตเป็นพอลิเมอร์ชนิดแรกที่ใช้ในอการตรึงเซลล์เนื่องจากมีความ ปลอดภัย ราคาถูก ใช้ได้กับตัวเร่งทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด ในขณะที่เดียวกันพบว่า มีข้อเสียคือ เม็ดเจลของแคลเซียมแอลจีเนตถูกทำลายได้ง่ายด้วยโพแทสเซียมไอออน แมกนีเซียมไอออน ฟอสเฟตไอออนในสารละลายที่มีความเข้มข้นมาก การตรึงเซลล์โดยใช้แอลจีเนตไม่สามารถใช้ได้ ดีกับเอนไซม์ เนื่องจากเม็ดเจลมีขนาดรูใหญ่ เอนไซม์สามารถรั่วไหลออกไปจากโครงสร้างเม็ดเจล ได้ แอลจีเนตเป็นเกลือของกรดแอลจินิก ซึ่งกรดแอลจินิกประกอบด้วยพอลิเมอร์ของ 1,4-linked α -D-mannuronic acid (M) และ 1,4-linked β -L-guluronic acid (G) กรดแอลจินิกและแอลจี เนตเป็นพอลิเมอร์ร่วมกันระหว่าง MM GM และGG ดังรูป 2.8



รูปที่ 2.8 แสดงโครงสร้างพอลิเมอร์ของแอลจีเนต

ที่มา : Gemeiner (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติของเจลที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแอลจินेटที่ใช้ แอลจินेटที่มี G residues สูงจะทำให้เจลมีความแข็งแรงสูงด้วย นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับชนิด ความเข้มข้นของ ไอออนโลหะและปริมาณเซลล์ที่ใช้ด้วย การใช้สตรอนเชียมหรือแบเรียมแทนแคลเซียม จะช่วยให้ เม็ดเจลมีความคงตัวมากขึ้น (Cheetham *et al.* 1979) สาเหตุเนื่องจากสตรอนเชียมและแบเรียมมี ขนาดอะตอมใหญ่กว่าอะตอมของแคลเซียมทำให้ช่องว่างภายในเม็ดเจลมีขนาดเล็ก และมีความ เสถียรมากขึ้น แต่มีข้อเสียคือทำให้สารอาหารและออกซิเจนซึมผ่านเข้าไปภายในเม็ดเจลได้ยาก (Yoo *et al.* 1996)

2.9 ข้อดีและข้อเสียของการใช้เอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึง

ข้อดีของการใช้เอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึง

1. ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการเอนไซม์ตัวเดียว
2. ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการเอนไซม์หลายตัว แต่ไม่ต้องการตัวร่วมที่มีความเฉพาะเจาะจง (specificity cofactor)
3. ใช้ในปฏิกิริยาเอนไซม์ตัวเดียวและหลายตัวที่ต้องการตัวร่วม
4. ใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องการให้ขบวนการเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในวิถีที่เผาผลาญอาหารใน ร่างกาย (metabolic pathway) ทั้งแบบสารปฏิกิริยาหรือทุติยภูมิ
5. ใช้กับเซลล์ของอวัยวะ (cell originals) เช่น คลอโรพลาสต์ (chloroplast) หรือเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเรียกว่าเซลล์ของอวัยวะที่ถูกตรึง (immobilized cell organells)
6. ใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่องได้

ข้อเสียของการใช้เอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึง

1. เกิดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น
2. การส่งผ่านออกซิเจนในถังปฏิกิริยา (reactor) ควบคุมลำบาก
3. เกิดปัญหาการส่งผ่านมวลจากภายนอกสู่ภายในและขบวนการเคลื่อนที่ (process kinetic) (วิเชียร ติลาวัชรมาศ. 2526)

การเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมี เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับตัวเร่งทางเคมี คือ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะปกติ และใช้พลังงานต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง ปัญหาการเกิดมลภาวะมีน้อย แต่เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียบางประการคือ ต้องการสารประกอบเชิงซ้อนเช่น โคแฟกเตอร์ต่างๆในการเกิดปฏิกิริยา และมีความคงทนน้อยกว่า ตัวเร่งทางเคมี

การเปรียบเทียบกับเซลล์หรือเอนไซม์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงได้เปรียบกว่าเซลล์หรือเอนไซม์อิสระคือ สามารถใช้เซลล์จำนวนมากๆ ศึกษาในถังปฏิกิริยาขนาดเล็กได้ ในการผลิต ควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย สามารถแยกผลผลิตออกได้สะดวก ไม่มีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อื่น เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้มาก แต่การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ และอาจสูญเสียความสามารถระหว่างการตรึงได้ (Cheetham, 1980)

การเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึง การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่กระบวนการผลิตนั้นต้องใช้ระบบเอนไซม์หลายชนิด โคแฟกเตอร์ และสารพลังงานสูงอื่นๆ นอกจากนี้การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงไม่ต้องใช้ขบวนการสกัดและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เป็นผลให้เอนไซม์ยังคงมีประสิทธิภาพสูง ทำให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น และเป็นการผลิตค่าใช้จ่ายด้วย แต่การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งสามารถผลิตสารที่ไม่ต้องการออกมาซึ่งยังผลผลิตได้ และเซลล์ที่ถูกตรึงยังถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของซับสเตรตและผลผลิต โดยสารที่ใช้ตรึงเซลล์ (Chibata *et al.* 1977) นอกจากนี้อาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตจากตัวเซลล์ หรือสารที่ขับออกจากเซลล์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองเนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานานหรือเซลล์รั่วไหลเนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงมีการเจริญเพิ่มจำนวน (Cheetham *et al.* 1979)

2.10 ข้อควรคำนึงเมื่อใช้เอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึงกับอาหาร

2.10.1 ด้านเศรษฐกิจ

ในการเตรียมเอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึงต้นทุนส่วนใหญ่อยู่กับการตรึงและการทำให้บริสุทธิ์ แต่เทคนิคในการตรึงก็สามารถลดขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ได้ เช่น การใช้ affinity chromatography เป็นต้น การตรึงเซลล์หรือเอนไซม์สำคัญอยู่ที่การเลือกใช้วัสดุติด ความคงตัว และความสามารถของเอนไซม์ที่ถูกตรึง ตลอดจนขณะการใช้เอนไซม์หรือเซลล์ติดต่อกันนั้นสามารถเปลี่ยนซับสเตรตให้เป็นผลผลิตได้น้อยเพียงใด

2.10.2 ความเหมาะสมของวัตถุที่ใช้ตรึง

ส่วนประกอบของเอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึงทุกชนิดต้องปลอดภัย และไม่ปนเปื้อนต่ออาหาร

2.10.3 ความสามารถในการเป็นตัวเร่ง

เอนไซม์หรือเซลล์เมื่อผ่านการตรึงแล้วความสามารถจะลดลง ขึ้นอยู่กับเทคนิคการตรึง คุณสมบัติของสารที่ใช้ เนื่องจากอาหารมีความแตกต่างทั้งส่วนประกอบและคุณลักษณะ ดังนั้นจึงไม่สามารถหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดมาใช้ในการตรึงเอนไซม์และเซลล์แต่ละชนิดได้

2.10.4 ความคงตัว

โดยทั่วไปความคงตัวของเอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึงจะเพิ่มขึ้นจากเดิม และอายุการเก็บรักษาตามปกติจะนานกว่าเอนไซม์ที่ละลายน้ำ

2.10.5 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

เมื่อใช้เอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึงกับอาหารติดต่อกันเป็นเวลานานๆ จะเกิดการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากซับสเตรตเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์จะเจริญได้ (วิเชียร ติลาวัชรมาศ. 2526)

มีรายงานการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเซลล์ดังนี้

Dembczynski and Jankowski (2002) ศึกษาการเจริญและการสร้างกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* โดยการตรึงเซลล์ในแอลจินเนต พบว่า จำนวนเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเจลมีปริมาณ 4.8×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าเซลล์อิสระที่มีปริมาณเซลล์เพียง 5.7×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เม็ดเจลยังคงเสถียร ไม่มีการรั่วไหล แม้ระยะเวลาการหมักจะผ่านไป 60 ชั่วโมง

Bergmaier *et al.* (2003) เปรียบเทียบการใช้เซลล์ตรึงและเซลล์อิสระโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M เพื่อผลิต exopolysaccharide พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ และสามารถผลิตได้ 1.7 กรัมต่อลิตร

Adinarayana *et al.* (2005) ศึกษาชนิดของสารที่ใช้ในการตรึงเซลล์ประกอบด้วย แคลเซียมแอลจินเนต พอลิอะคริลาไมด์ เจลาติน วุ้น และ k-Carrageenan ในการผลิต alkaline protease โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* PE-11 พบว่าแคลเซียมแอลจินเนตมีประสิทธิภาพดีที่สุด

Jones *et al.* (2005) ศึกษาการตรึงเซลล์ *Lactobacillus plantarum* 80 (pcBH1) เพื่อใช้ในการย่อย กรดของน้ำดี (bile acid) พบว่าการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงนี้สามารถลดปริมาณกรดของน้ำดี ได้ โดยการย่อยกรดของน้ำดีเป็น glycodeoxycholic acid และ taurodeoxycholic acid โดยเอนไซม์ bile salt hydrolase

Kourkoutas *et al.* (2005) ศึกษาการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* บนชั้นแอปเปิลและควินซ์ ในการผลิตกรดแลคติกโดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต พบว่าสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการหมักแบบกะได้ทั้งหมด 15 รอบ และเมื่อใช้นมเป็นซับสเตรตในการผลิตนมเปรี้ยวพบว่า ให้กลิ่นหอมของผลไม้ทั้งสอง และกลิ่นหอมนี้ยังคงอยู่แม้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 129 วัน

Kushal *et al.* (2006) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โพรไบโอติก 2 ชนิดคือ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* ในหนูทดลอง โดยการตรึงเซลล์ร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในการลด fecal coliforms

2.11 เวย์ (Whey)

เวย์เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการผลิตเนยแข็งหรือการแยกเคซีนจากนมสด (ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ, 2526) เวย์มีลักษณะเป็นของเหลวใสมีสีค่อนข้างเขียวอมเหลือง (Marshall, 1982) องค์ประกอบของเวย์โดยทั่วไปพบว่าประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตสร้อยละ 4-5 โปรตีนร้อยละ 1 และเกลือแร่ร้อยละ 1 (Roukas *et al.* 1998)

2.11.1 ประเภทของเวย์

เวย์แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามความเป็นกรด (Titable acidity) ได้แก่

1. สวีทเวย์ (Sweet whey) เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งชนิดแข็ง เช่น เชดดา (Cheddar cheese) เกาดา (Gouda cheese) สวิส (Swiss cheese) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.10-0.20 และมีค่าพีเอชระหว่าง 5.8-6.1

2. แอซิดเวย์ (Acid whey) เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการตกตะกอนนม โดยการเติมกรดหรือเกลือแร่ลงไปโดยตรงในการผลิตเนยแข็งชนิดอ่อน เช่น คอทเทจ (Cottage) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.40-0.60 และมีค่าพีเอชระหว่าง 4.0-5.0 (Kosikowski, 1977) องค์ประกอบของเวย์มีค่าไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของน้ำนมและกระบวนการผลิตเนยแข็ง เช่น เวย์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็งชนิดอ่อน จะมีปริมาณกรดแลคติกสูง เพราะน้ำตาลแลคโตสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกโดยแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก (Hossong *et al.* 1973)

องค์ประกอบที่แตกต่างของเวย์ทั้งสองชนิดแสดงดังตารางที่ 2.4 พบว่าสวีทเวย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างขององค์ประกอบเช่นเดียวกับแอซิดเวย์ โดยแลคติกแอซิดเวย์ (lactic acid whey) จะได้จากการผลิตคอทเทจชีส ส่วนไฮโดรคลอริก (hydrochloric) หรือซัลฟิวริกแอซิดเวย์ (sulphuric acid whey) ได้จากการผลิตเคซีน

2.11.2 องค์ประกอบหลักทางเคมีของเวย์

น้ำตาลแลคโตส

น้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลที่พบในน้ำนมเท่านั้น ในน้ำนมวัวมีน้ำตาลแลคโตสอยู่ประมาณร้อยละ 4.7 ต่ำกว่าในน้ำนมมนุษย์ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสอยู่ประมาณร้อยละ 6.3 น้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลชนิดรีดิวซิง (Reducing sugar) มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับน้ำตาลทราย คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ และเมื่อถูกไฮโดรไลส์แล้วจะได้น้ำตาล 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส ดังสมการที่ 2.7

ออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ เบตาแลคโตโกลบูลิน (Beta - lactoglobulin) และแอลฟาแลคทอลบูมิน (Alpha - lactalbumin) โดยเบตาแลคโตโกลบูลินจะมีอยู่ประมาณร้อยละ 50-60 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือเจือจาง สามารถตกตะกอนได้ด้วยเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) โพรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในแง่การให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลว (วรรณ ตังเจริญชัย, 2532) ส่วนแอลฟาแลคทอลบูมิน มีอยู่ประมาณร้อยละ 15-20 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนได้เมื่อถูกความร้อน ส่วนที่เหลือคือ ซีรัมอัลบูมิน อิมมูโนโกลบูลิน เอนไซม์ต่างๆ และโพรตีนอื่นๆ (Webb and Whitter, 1970) ความแตกต่างขององค์ประกอบและปริมาณโพรตีนในเวย์แสดงไว้ในตารางที่ 2.5 นักวิจัยของ FAO/WHO ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในโพรตีนเวย์มีมากกว่าในโพรตีนมาตรฐานที่ FAO กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 2.6 โพรตีนในไข่ถูกนำมาเปรียบเทียบกับโพรตีนอ้างอิงและโพรตีนในนมและเวย์ เนื่องจากว่าเป็นโพรตีนที่มีคุณค่าสูงสุด เมทาไทโอนีน และซิสทีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบถูกนำมาคิดรวมกัน เนื่องจากร่างกายสามารถนำมาใช้แทนกันได้ เช่นเดียวกับ ฟีนิลอะลานีน และไทโรซีนซึ่งนำมาคิดรวมกัน ในเวย์มีกรดอะมิโนที่จำเป็นสูงทำให้ไม่จำเป็นที่จะต้องเสริมปริมาณกรดอะมิโนจากแหล่งอื่น (Renner, 1983)

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบและปริมาณ โพรตีนในเวย์

ชนิดของโพรตีนในเวย์	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโพรตีน	ค่าพีเอช	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน $\times 10^3$)
แอลฟาแลคโตโกลบูลิน	3.0	50	5.3-5.5	18.3
เบตาแลคทอลบูลิน	0.7	12	4.2-4.5	14
โพรตีเอสเปปโตน	1.4	23	-	4.1-4.8
โบรวิน ซีรัม อัลบูมิน	0.3	5	5.1	69
อิมมูโนโกลบูลิน	0.6	10	5.5-8.3	15-1000
แลคโตเฟอร์ริน	0.05	0.8	9.0	81-84
แลคโตเพอร์ออกซิเดส	0.03	0.5	9.6	89

ที่มา : Marshall (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในโปรตีนอ้างอิงของ FAO จากไข่ นม และเวย์

กรดอะมิโนจำเป็น	ปริมาณ (กรัม/ 100 กรัมโปรตีน)			
	โปรตีนอ้างอิง	โปรตีนไข่	โปรตีนนม	โปรตีนเวย์
ทริโปรโตเฟน	1.0	1.5	1.4	2.3
ฟีนิลอะลานีน + ไทโรซีน	6.0	10.5	10.5	7.3
ลิวซีน	7.0	9.1	10.4	11.1
ไอโซลิวซีน	4.0	6.7	6.4	6.8
ทรีโอนีน	4.0	5.1	5.1	8.0
เมทไทโอนีน + ซีสทีน	3.5	5.9	3.5	4.8
ไลซีน	5.5	6.9	8.3	9.9
วาเลีน	5.0	7.5	6.8	6.8
รวม	36.0	53.2	52.5	56.8

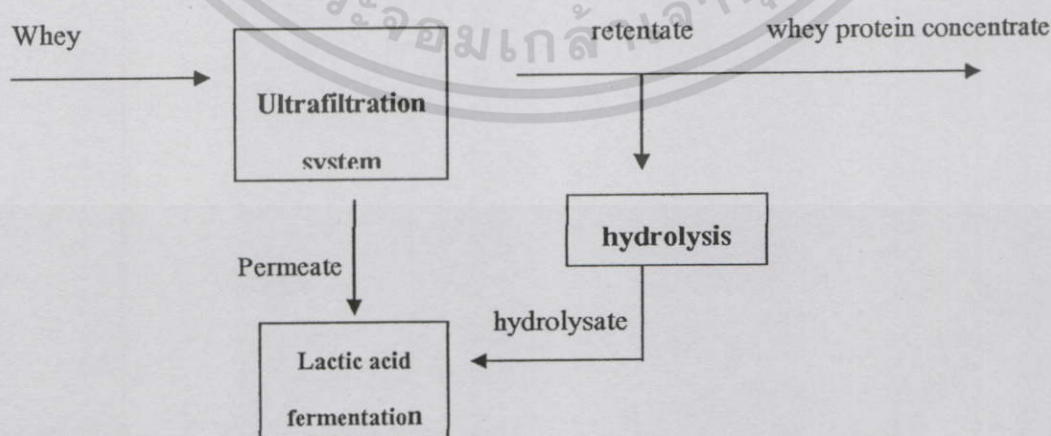
ที่มา : Renner (1983)

2.11.3 การใช้ประโยชน์จากเวย์

เนื่องจากเวย์ก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม นักวิจัยจึงได้ศึกษาหาหนทางนำเวย์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังมีรายงานการใช้ประโยชน์จากเวย์ดังนี้ (ชลัท สานติวงศานา. 2534)

Whey permeate

Whey permeate เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเวย์มาผลิตเป็นโปรตีนเวย์เข้มข้น มีน้ำตาลแลคโตสและไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้เป็นส่วนประกอบหลัก จึงมีความสนใจในการนำ Whey permeate มาใช้แทนแหล่งคาร์บอนอื่นที่มีราคาแพงในการผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีการทางชีวภาพ ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 Whey permeate

ที่มา : Fitzpatrick and O'Keeffe (2001)

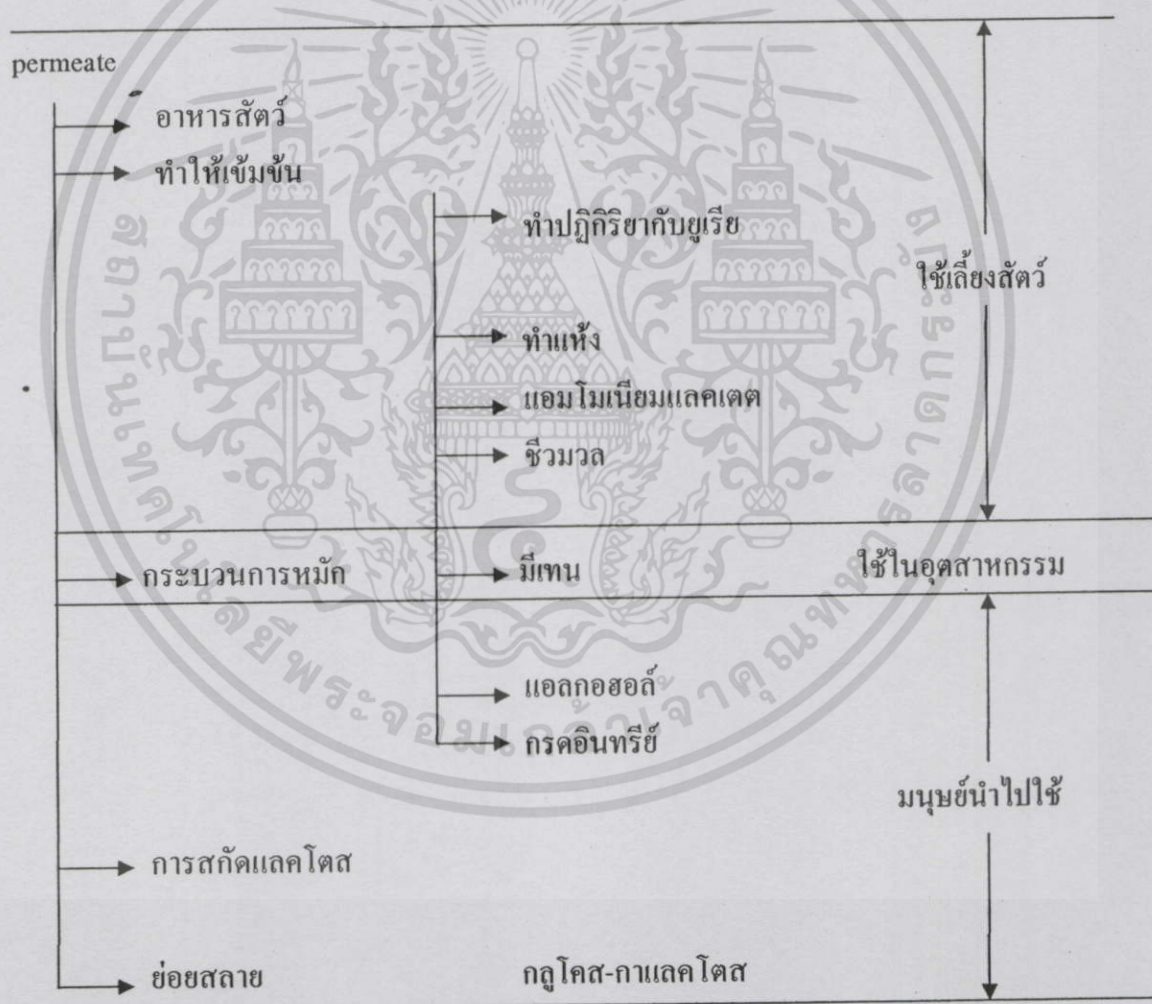
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Arasaratnam *et al.* (1996) ศึกษาการนำเวย์มาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* โดยเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 36 และยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร พบว่ากรดแลคติกที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างได้คือ 40 กรัมต่อลิตร ภายใน 84 ชั่วโมง

Erturk *et al.* (1998) ศึกษาการนำเวย์มาผลิตไรโบฟลาวินโดยเชื้อ *Ashgya gossypii* พบว่าสามารถผลิตไรโบฟลาวินได้ 30 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น ภายในเวลา 8 วัน

Fitzpatrick *et al.* (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* โดยเติมยีสต์สกัด มอลต์ และถั่ว เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

แผนผังแสดงความเป็นไปได้ในการนำเวย์มาใช้ประโยชน์แสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 ความเป็นไปได้ที่จะนำเวย์มาใช้ประโยชน์

ที่มา : Pedersen and Werner (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การวิจัย

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท PYREX^R

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX^R

คีมเวดแก้ว

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท

SHIMADZU รุ่น C-R7 Ae plus จากประเทศญี่ปุ่น

คอลัมน์ Inertsil C8-3 รุ่น SPD-10A VP จากประเทศญี่ปุ่น

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องเขย่าของ บริษัท Gallenkamp

เครื่องอบร้อนของ บริษัท Binder

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

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

ตู้เป่าเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

บีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท PYREX^R

ปิเปตต์ (pipette)

ลวดเย็บเชื้อ (loop)

ปั๊ม Peristaltic pump ของบริษัท Heidolph รุ่น PD 5201

สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 เซนติเมตร ของบริษัท Cole-Parmer

Instrument Company รุ่น Tygon tubing 2-stop

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^R

3.1.2 สารเคมี

แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3)

แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)

โซเดียมแอลจินेट

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

น้ำกลั่น

เปปโตน (peptone)

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

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

แลคโตส (lactose)

ยีสต์สกัด (yeast extract)

ไฮโดรคลอริก (HCl)

3.2 วัตถุดิบ

เวย์ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Minor Cheese Limited 9/1 หมู่ 6 ซอยทรัพย์จำปา ถนนมิตรภาพ ตำบลกลางดง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา 30320

3.2.1 การเก็บวัตถุดิบ

เวย์ที่ใช้ในงานวิจัยจะเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส โดยนำมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งานต่อไป

3.2.2 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ ประยุกต์จาก Kessler (1981)

นำเวย์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการแยกโปรตีนออกจากเวย์ ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกไขมันโดยกรองด้วยกระดาษกรอง Glass fiber (GC-50) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จะได้น้ำเวย์ที่พร้อมใช้ในการทดลอง

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 1341 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 1341 แล้วยาก (streak) ลงบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Youssef *et al.* 2000) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในอุณหภูมิต่ำแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์อิสระ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 1341 จำนวน 2 ลูกลงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Ha *et al.* 2003) เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Senthuran *et al.* 1999) (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) จะได้หัวเชื้อเริ่มต้นนำไปใช้ในการวิจัย

3.4 สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย

สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัยมีดังนี้

3.4.1 อาหารสังเคราะห์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

แลคโตส	50	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.10	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัมต่อลิตร

ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

(ประยุกต์จาก Youssef *et al.* 2000 ; Vasala *et al.* 2005)

3.4.2 อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

ซีตัสกัก	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.10	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัมต่อลิตร

ใช้เวย์เป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

(ประยุกต์จาก Mostafa, 1995 ; Youssef *et al.* 2000)

3.5 การเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารสังเคราะห์และอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

3.5.1 การเตรียมอาหารสังเคราะห์และอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

เตรียมอาหารสังเคราะห์และอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ปริมาตร 350 มิลลิลิตร (ร้อยละ 70) ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ $6.5 (\pm 0.1)$ (Nancib *et al.* 2000) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที

3.5.2 การเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารสังเคราะห์และอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์อิสระตามข้อ 3.3.2 และเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตตามข้อ 3.6 โดยใช้โซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 (Lee and Heo, 2000; Idris and Suzana, 2006) และใช้ระยะทางระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 15 เซนติเมตร ในการตรึงเซลล์ ปริมาตรที่ใส่เท่ากับ 17.5 มิลลิลิตร (ร้อยละ 5) (Fitzpatrick *et al.* 2000) นำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์และอาหารเวย์ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง (Dembczynski and Jankowski, 2002 ; Ha *et al.* 2003 : จงกมล. 2550) เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน วัดค่าพีเอชในน้ำหมักตลอดการทดลอง ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) ปริมาณน้ำตาลแลคโตสด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก

(ภาคผนวก) และศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีที่สุดใน วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ทั้งหมดด้วยวิธี Total plate count (A.O.A.C. 2000) (ภาคผนวก ข)

3.5.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง

การละลายเม็ดเจลเพื่อให้อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนตในแต่ละพลาสติกจำนวน 11 พลาสติกที่ทำการบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มาทำให้อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยโดยเมื่อถึงเวลา ณ ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ทำการเทอาหารเวโยในแต่ละพลาสติกออกจากนั้นนำเม็ดเจล ทั้งหมดมาละลายด้วยสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 110 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (น้ำหนักเม็ดเจลเท่ากับ 11 กรัม) เมื่อเม็ดเจล ละลายหมดจะได้ตัวอย่างเซลล์แขวนลอยที่ระดับความเจือจาง 10 เท่า จากนั้นนำไปวิเคราะห์ ปริมาณเซลล์โดยวิธี Total plate count

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างเซลล์แขวนลอยที่ได้จากเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงที่ผ่านการละลายเม็ด เจล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจาง
2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างแต่ละความเจือจางที่เหมาะสมใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อ แล้วจานละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้ 3 จานในแต่ละระดับความเจือจาง
3. นำอาหารแข็ง MRS ไปหลอมให้ละลายแล้วทิ้งให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร
4. เขย่าจานโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนวันแข็ง
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน
6. นับจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวน โคโลนีที่นับได้ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร โดยคูณค่าเฉลี่ยนั้นด้วยระดับความเจือจางที่ตรวจนับ หมายเหตุ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และทุกขั้นตอนใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

3.6 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนต

ขั้นตอนการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมแอลจินเนตมีดังนี้ (ประยุกต์จากสุรีย์ ทองวณิชนิม,

2543)

3.6.1 ทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็งเพื่อเก็บรักษาเชื้อภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 ถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 3.6.1 ลงในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตรในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

3.6.3 คูเซลล์แขวนลอยลงในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 8.75 มิลลิลิตร (ร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ผลิตกรดแลกติก)

3.6.4 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อออก ล้างตะกอนเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยล้างเซลล์ทั้งหมด 2 ครั้งจึงเทสารละลายน้ำเกลือทิ้งไป

3.6.5 เติมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีตะกอนเซลล์ เขย่าให้เข้ากันจนเกิดสารแขวนลอยเซลล์ แล้วเทส่วนผสมลงในสารละลายโซเดียมแอลจินेटที่ผันแปรความเข้มข้น (ข้อ 3.7.2) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer

3.6.6 นำสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตรที่ต่อกับ peristaltic pump จุ่มลงในสารละลายโซเดียมแอลจินेटที่ผสมเข้ากันดีแล้วกับสารแขวนลอยเซลล์ ปลายอีกข้างจุ่มลงในพลาสติกที่มีสารละลายแคลเซียมคลอไรด์โดยผันแปรระยะห่างระหว่างปลายสายยางกับผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (ข้อ 3.7.1) จากนั้นเปิดเครื่อง peristaltic pump ให้เครื่องทำงานพร้อมกับปรับอัตราการไหล 7 มิลลิลิตรต่อนาที กดปุ่ม start เพื่อคูสารละลายโซเดียมแอลจินेटที่ผสมกับสารแขวนลอยเซลล์ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยที่มีเม็ดเจลของแคลเซียมแอลจินेटจะเกิดขึ้นทันที

3.6.7 เก็บเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อก่อนนำไปใส่ในอาหารที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก จากข้อ 3.4

หมายเหตุ ทุกขั้นตอนของการตรึงเซลล์ในข้อ 3.6 ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

3.7.1 การศึกษาระยะทางระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการตรึงเซลล์

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินेटตามข้อ 3.6 โดยผันแปรระยะห่างระหว่างผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ถึงปลายสายยาง 2, 4, 6, 8, 10, 12,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14, 15, 16, 18 และ 20 เซนติเมตร ทำการหมักในอาหารเวย์ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ในสภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (ภาคผนวก ข)

3.7.2 การศึกษาความเข้มข้นของโฆเดียมแอลจิเนตที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตตามข้อ 3.6 โดยผันแปรความเข้มข้นของโฆเดียมแอลจิเนตร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 โดยเล็กระยะทางระหว่างปลายสายจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมตามผลการทดลองในข้อ 3.7.1 ทำการหมักในอาหารเวย์ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (ภาคผนวก ข)

3.8 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

3.8.1 การศึกษาปริมาณของเวย์ที่ใช้เป็นขั้วสเตรตในการผลิตกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาปริมาณของเวย์ที่ใช้เป็นขั้วสเตรตในการผลิตกรดแลกติกโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุดดังนี้

ชุดที่ 1 : ใช้เวย์เป็นตัวทำละลายร้อยละ 100

ชุดที่ 2 : ใช้เวย์เป็นตัวทำละลายร้อยละ 90 เจือจางด้วยน้ำร้อยละ 10

ชุดที่ 3 : ใช้เวย์เป็นตัวทำละลายร้อยละ 80 เจือจางด้วยน้ำร้อยละ 20

ชุดที่ 4 : ใช้เวย์เป็นตัวทำละลายร้อยละ 70 เจือจางด้วยน้ำร้อยละ 30

ชุดที่ 5 : ใช้เวย์เป็นตัวทำละลายร้อยละ 60 เจือจางด้วยน้ำร้อยละ 40

ชุดที่ 6 : ใช้เวย์เป็นตัวทำละลายร้อยละ 50 เจือจางด้วยน้ำร้อยละ 50

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตตามข้อ 3.6 และสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ตามผลการทดลองในข้อ 3.7 ทำการหมักในอาหารเวย์ตามชุดการทดลองทั้ง 6 ชุด ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตโดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ตามผลการทดลองข้อ 3.7 และปริมาณของเวย์ตามผลการทดลองข้อ 3.8.1 มาใช้ในการศึกษาผลของอุณหภูมิ โดยผันแปรอุณหภูมิ 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (ภาคผนวก ข)

3.9 การศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.9.1 เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตที่มีปริมาณโซเดียมแอลจิเนต ระยะทางระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกตามผลการทดลองข้อ 3.7

3.9.2 เลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์ที่มีปริมาณเวย์เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกตามผลการทดลองข้อ 3.8.1 ปริมาตร 1400 มิลลิลิตรในถังหมักขนาด 2 ลิตร ความคุมพีเอชเท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ (Roukas and Kotsekidon. 1998) อุณหภูมิตามผลการทดลองข้อ 3.8.2 โดยผันแปรอัตราการกวนเท่ากับ 0, 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ไม่ต้องพ่นอากาศ

3.9.3 เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน วัดปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (ภาคผนวก ข)

3.10 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักและฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตที่มีปริมาณโซเดียมแอลจิเนต และระยะทางระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกตามผลการทดลองข้อ 3.7 ความเข้มข้นของเวย์ที่เหมาะสมตามผลการทดลองข้อ 3.8.1 อุณหภูมิตามผลการทดลองข้อ 3.8.2 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด คือ

ชุดที่ 1: เลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1,400 มิลลิลิตร โดยมีอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกตามผลการทดลองข้อ 3.9 ความคุมพีเอชที่ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์

ชุดที่ 2 : เลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1,400 มิลลิลิตร โดยมีอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกตามผลการทดลองข้อ 3.9 ไม่มีการควบคุมพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุดที่ 3 : เกียงเซลล์ที่ถูกตรึงในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1,400 มิลลิลิตร สภาวะนิ่ง ไม่มีการควบคุมพีเอช

เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน วัดปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลกโตสโดยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (ภาคผนวก ข)

3.11 การศึกษาการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตกลับมาใช้ซ้ำเพื่อผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

3.11.1 เกียงเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์ที่มีปริมาณเวย์เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกตามผลการทดลองข้อ 3.8.1 ปริมาตร 1,400 มิลลิลิตรในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ อุณหภูมิตามผลการทดลองข้อ 3.8.2 อัตราการกวนด้วยใบพัดตามผลการทดลองข้อ 3.9 ไม่ต้องพ่นอากาศ เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน วัดปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลกโตสโดยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (ภาคผนวก ข)

3.11.2 เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักในรอบแรกแล้ว ถ่ายน้ำหมักออก ล้างเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตด้วยน้ำเกลือที่ปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยล้าง 2 ครั้ง ถ่ายน้ำเกลือออก จากนั้นนำอาหารเวย์ชุดใหม่ที่มีการฆ่าเชื้อแล้ว เติมนลงไปถังหมักในปริมาตรเท่าเดิม ควบคุมสภาวะการหมักตามข้อ 3.11.1 บันทึกจำนวนครั้งของการหมักแบบกะ ปริมาณกรดแลกติกที่เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตผลิตขึ้น และปริมาณน้ำตาลแลกโตสที่ถูกใช้ไปโดยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (ภาคผนวก ข)

3.12 การศึกษาการสะสมกรดแลกติกภายในเม็ดเจลแคลเซียมแอลจิเนต

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต โดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ตามผลการทดลองในข้อ 3.7 และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกตามผลการทดลองในข้อ 3.8 เกียงเซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารเวย์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแล้ว เก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อนำไปวัดปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตมาล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำมาละลายในสารละลายโพแทสเซียมไคโอโรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ± 0.2 ปริมาตร 15, 20 และ 25 มิลลิลิตร (Dembczynski and Jankowski, 2002) เมื่อเม็ดเจลละลายหมดแล้วนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ไปวัดปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข)

3.13 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncan New Multiple Range test โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลการเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารสังเคราะห์และอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์และอาหารสังเคราะห์ปริมาณ 350 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร (ปริมาณน้ำตาลแลคโตสเริ่มต้น 52 กรัมต่อลิตร) โดยใช้โซเดียมแอลจิเนตร้อยละ 2 (Lee and Heo, 2000; Idris and Suzana, 2006) และระยะทางระหว่างปลายสายจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 15 เซนติเมตรในการตรึงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Dembczynski and Jankowski, 2002 ; Ha et al, 2003 : จงกมล, 2550) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 รูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปในอาหารเวย์และอาหารสังเคราะห์ของเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง

สภาวะ	ชั่วโมง	ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปทั้งหมด (ร้อยละ)
เซลล์อิสระที่เลี้ยงในอาหารเวย์	60	5.04 ^b ± 0.693	0.142 ^a ± 0.142	0.084 ^a ± 0.001	68.25
เซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในอาหารเวย์	72	5.63 ^a ± 0.190	0.145 ^a ± 0.145	0.078 ^b ± 0.003	74.45
เซลล์อิสระที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์	60	4.51 ^c ± 0.177	0.137 ^a ± 0.005	0.075 ^b ± 0.003	61.05
เซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์	72	4.63 ^c ± 0.954	0.137 ^a ± 0.003	0.064 ^c ± 0.001	64.61

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง แยกต่างกันในทางสถิติ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติกสูงสุด ผลได้กรดแลกติกสูงสุด และอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุด \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลได้กรดแลกติก (กรัมต่อกรัม) หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร) ต่อปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)

อัตราการผลิตกรดแลกติก (กรัมต่อลิตรชั่วโมง) หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร) ในเวลา 1 ชั่วโมง

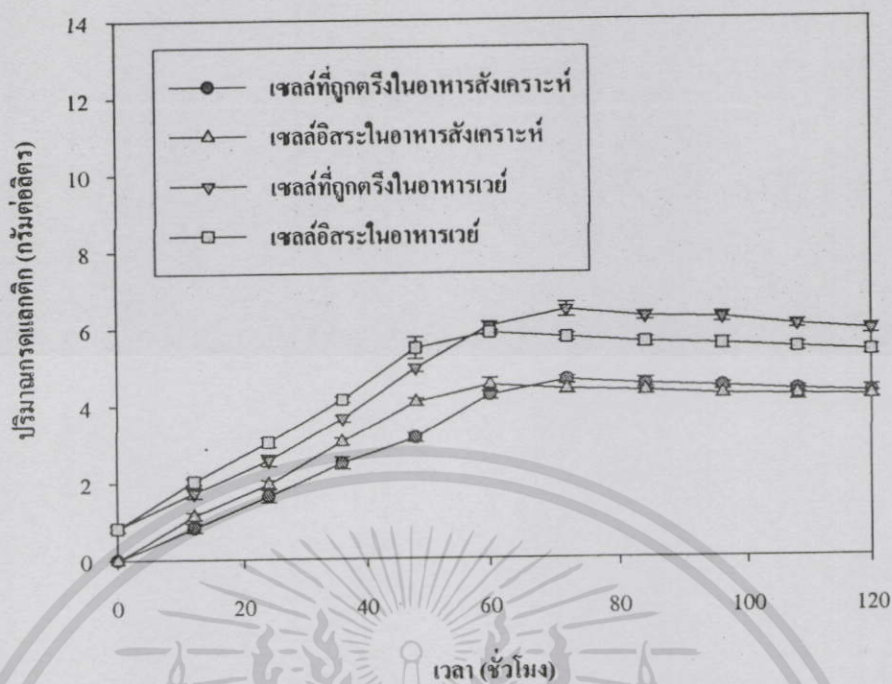
จากตารางที่ 4.1 พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารเวย์ รองลงมาคือ เซลล์อิสระที่เลี้ยงในอาหารเวย์ เซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ และเซลล์อิสระที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 5.63 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72, 5.04 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60, 4.63 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 และ 4.51 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 ผลได้ของกรดแลกติกสูงสุด 0.145, 0.142, 0.137 และ 0.137 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุด 0.078, 0.084, 0.075 และ 0.064 กรัมต่อลิตรชั่วโมง โดยมีการใช้น้ำตาลแลคโตสไปร้อยละ 74.45, 68.25, 64.61 และ 61.05 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากเซลล์อิสระที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ และเซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากเซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในอาหารเวย์ซึ่งผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากเซลล์อิสระที่เลี้ยงในอาหารเวย์ จากการวิเคราะห์ข้อมูลผลได้ของกรดแลกติกพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตกรดแลกติกพบว่า เซลล์อิสระที่เลี้ยงในอาหารเวย์มีอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอัตราการผลิตกรดแลกติกจากเซลล์ที่ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเวย์ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์อิสระสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าเซลล์ที่ถูกตรึง จึงสามารถผลิตกรดแลกติกได้รวดเร็วกว่าโดยสามารถผลิตกรดแลกติกสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 60 ในขณะที่เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนตมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าเซลล์อิสระโดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 72 จึงทำให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุดของเซลล์อิสระมีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกตรึง แม้ว่าเซลล์อิสระจะมีการเจริญเติบโตรวดเร็วกว่าเซลล์ที่ถูกตรึง แต่จำนวนเซลล์ของเซลล์อิสระมีการลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 60 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ทั้งนี้เนื่องจากกรดแลกติกที่เชื้อผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์อิสระได้ดีกว่าเซลล์ที่ถูกตรึง จึงทำให้ปริมาณเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วและทำให้ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้น้อยกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Dembczynski and Jankowski, 2002) สำหรับอัตราการผลิตกรดแลกติกที่น้อยที่สุดคือ เซลล์อิสระที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

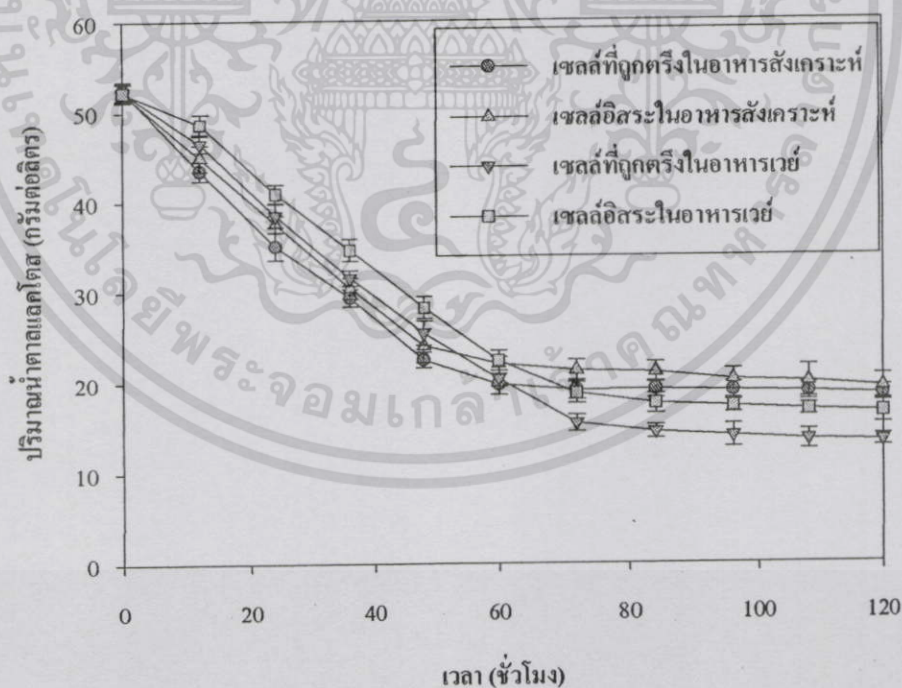
แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอัตราการผลิตกรดแลกติกจากเซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในอาหารเวย์

จากรูปที่ 4.1 พบว่าเซลล์อิสระที่เจริญในอาหารเวย์มีการผลิตกรดแลกติกอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 60 แม้ว่าเซลล์อิสระจะมีการผลิตกรดแลกติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 (5.04 กรัมต่อลิตร) แต่ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้น้อยกว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้สูงสุดจากเซลล์ที่ถูกตรึง (5.63 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าเซลล์อิสระทั้งในอาหารเวย์และในอาหารสังเคราะห์

การทดลองนี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mostafa (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยการตรึงเซลล์ *L. casei* ในวุ้น โดยเปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบพบว่าอาหารเวย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 2.205 และในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบสามารถผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 0.810 ภายในเวลา 1.5 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินेटในอาหารเวย์พบว่าการเจริญมีความสัมพันธ์กับการผลิตกรดแลกติกดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าเซลล์อิสระมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงโดยเพิ่มจำนวนจาก 4.6×10^7 โคลิनीต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 0 และสูงสุด 8.4×10^7 โคลิनीต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 จากนั้นเซลล์จะลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่ง ณ ชั่วโมงที่ 120 เหลือจำนวนเซลล์ 7.26×10^8 โคลิनीต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์ที่ถูกตรึงเพิ่มจำนวนจาก 5.0×10^7 โคลิनीต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 0 และสูงสุด 9.6×10^7 โคลิनीต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 จากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลงจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 120 โดยมีจำนวนเซลล์ 2.67×10^9 โคลิनीต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณเซลล์ของเซลล์อิสระสาเหตุเนื่องจากกรดแลกติกที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกของเซลล์อิสระได้ดีกว่าเซลล์ที่ถูกตรึง จึงทำให้กรดแลกติกที่ผลิตได้จากเซลล์อิสระมีปริมาณน้อยกว่า (Dembczynski and Jankowski, 2002) นอกจากนี้วิธีการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมแอลจินेटถือว่าเป็นวิธีการหนึ่งในการเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตได้ถึงร้อยละ 80-95 (Mandal et al. 2006) ผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Dembczynski and Jankowski (2002) ศึกษาการเจริญและการสร้างกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* โดยการตรึงเซลล์ในแอลจินेटพบว่าจำนวนเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเจลมีปริมาณ 4.8×10^{10} โคลิनीต่อมิลลิลิตรซึ่งมากกว่าเซลล์อิสระที่มีปริมาณเซลล์เพียง 5.7×10^9 โคลิनीต่อมิลลิลิตร

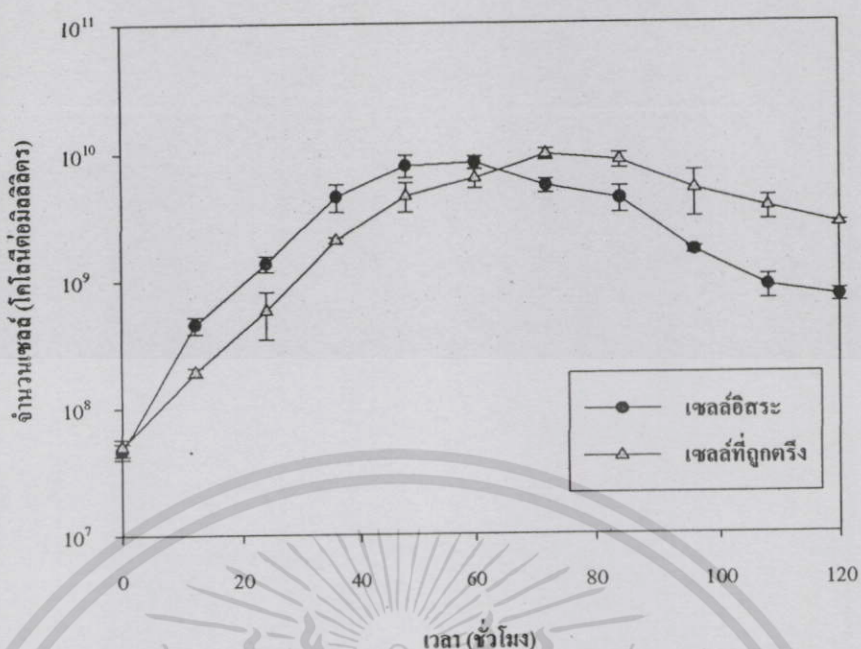


รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดแลคติกในอาหารเวย์และอาหารสังเคราะห์ของเชื้อ *L. casei* TISTR1341 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนต อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปในอาหารเวย์และอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนต อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงจำนวนเซลล์ของเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนต ในอาหารเวย์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

จากการทดลองพบว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุดคืออาหารเวย์ เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่สูงกว่าอาหารสังเคราะห์ และในอาหารเวย์ยังมีแหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลแลคโตส ซึ่งพอเพียงต่อการนำไปใช้ในการเจริญและการผลิตกรดแลกติก โดยที่ไม่ต้องเติมน้ำตาลแลคโตสสังเคราะห์เพิ่มเข้าไปในอาหารอีก นอกจากนี้ยังมี วิตามิน กรดอะมิโน และเกลือแร่ต่างๆ เป็นองค์ประกอบ (Roukas *et al.* 1998) อีกทั้งเป็นการนำผลิตผลพลอยได้มาใช้ให้เกิดประโยชน์ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าและลดต้นทุนการผลิตได้อีกด้วย ดังนั้นการทดลองในขั้นตอนต่อไปจึงเลือกอาหารเวย์และเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนตมาใช้ในการผลิตกรดแลกติกเพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ต่อไป

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

4.2.1 ผลการศึกษาระยะเวลาระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการตรึงเซลล์

ทำการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 โดยใช้โซเดียมแอลจีเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 (Lee and Heo. 2000; Idris and Suzana. 2006) ทำการค้นแปรระยะเวลาระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ดังนี้ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18 และ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซนติเมตร จากนั้นทำการเลี้ยงในอาหารเวย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Dembeczynski and Jankowski. 2002 : Ha *et al.* 2003 : จงกมล. 2550) ผลการทดลองพบว่าการใช้ระยะเวลาที่อยู่ในช่วง 12-16 เซนติเมตรมีความเหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ เนื่องจากเม็ดเจลที่ได้มีรูปร่างทรงกลมและมีขนาดใหญ่ (ภาคผนวก ง) สามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น สภาวะที่มีความเป็นกรดสูงได้ดีกว่าเม็ดเจลที่มีรูปร่างทรงกลมแต่มีขนาดเล็กหรือเม็ดเจลที่มีรูปร่างทรงรี ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกระยะเวลาที่อยู่ในช่วง 12 ถึง 16 เซนติเมตรมาใช้ในการตรึงเซลล์

จากงานวิจัยของ Lee and Heo (2000) ได้ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ *Bifidobacterium longum* ที่ถูกตรึงในแคลเซียมแอลจิเนตในสารละลายเกลือน้ำดี (bile salt solution) และในระบบน้ำย่อยจำลอง (simulated gastric juice) พบว่าเซลล์มีชีวิตรอดได้เป็นจำนวนมากในเม็ดเจลที่มีขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล 2.62 มิลลิเมตร) มากกว่าเม็ดเจลที่มีขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล 1.75 และ 1.03 มิลลิเมตร) เนื่องจากเม็ดเจลขนาดใหญ่สามารถปกป้องเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่ไม่เหมาะสมต่อเซลล์ได้ดีกว่าเม็ดเจลที่มีขนาดเล็ก

4.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนตที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์

เมื่อทำการตรึงเซลล์โดยใช้ระยะเวลาระหว่างปลายสายจนถึงผิวหน้าสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อยู่ในช่วง 12 ถึง 16 เซนติเมตร โดยผันแปรความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนตร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 โดยเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารเวย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Dembeczynski and Jankowski. 2002 : Ha *et al.* 2003 : จงกมล. 2550) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 รูปที่ 4.4 และรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนตที่มีต่อการตรึงเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป และค่าพีเอช จากการตรึงเซลล์ *L. casei* TISTR 1341 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง ณ ชั่วโมงที่ 72

ความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนต (ร้อยละ)	ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปทั้งหมด (ร้อยละ)	ค่าพีเอช
1	5.54 ^a ± 0.032	74.70	4.4
2	5.48 ^a ± 0.095	73.57	4.4
3	4.43 ^b ± 0.095	67.63	4.6
4	3.45 ^c ± 0.120	58.71	5.0

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

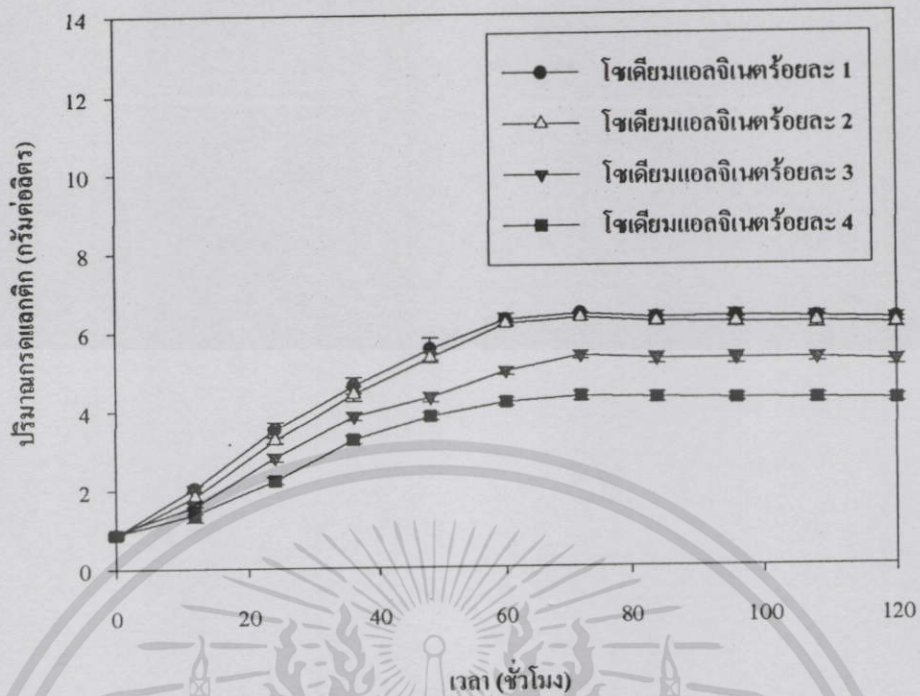
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง แยกต่างกันอย่างสถิติ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติกสูงสุด \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

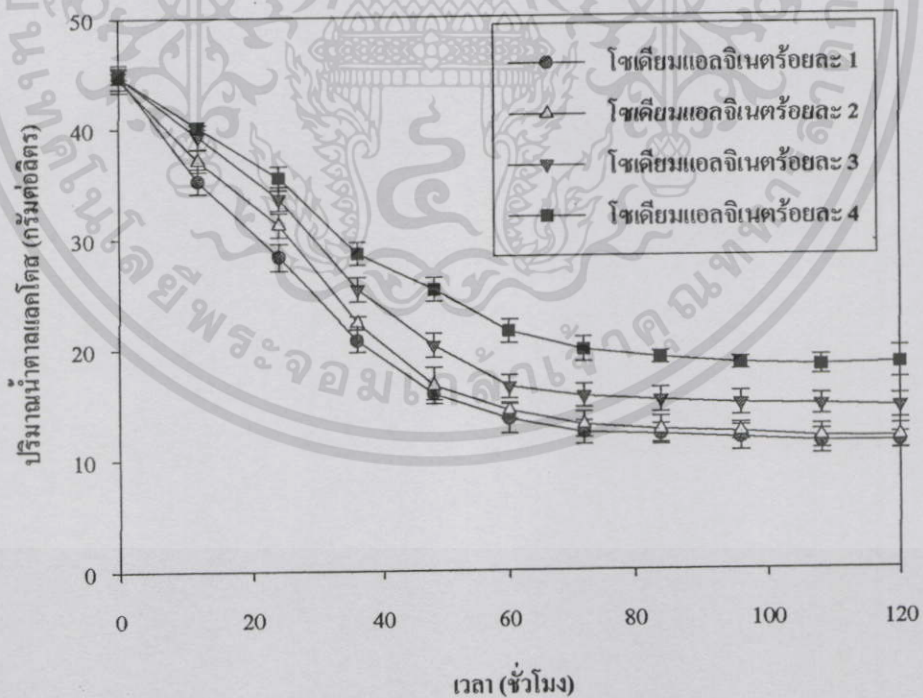
จากการทดลองพบว่า โขเทียมแอลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 1 เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์มากที่สุด รองลงมาคือร้อยละ 2, 3 และ 4 โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 5.54, 5.48, 4.43 และ 3.45 กรัมต่อลิตร พีเอชต่ำสุดเท่ากับ 4.4, 4.4, 4.6, 5.0 ตามลำดับ มีการใช้น้ำตาลแลคโตสไปร้อยละ 74.70, 73.57, 67.63 และ 58.71 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลปริมาณกรดแลกติกมาวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่า โขเทียมแอลจิเนตร้อยละ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ โขเทียมแอลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 1 ในการตรึงเซลล์ ทำให้เม็ดเจลมีความคงตัวน้อย สังกะสีได้จากเมื่อระยะเวลาการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้น เม็ดเจลมีการเปลี่ยนแปลงไปโดยไม่คงรูปร่างเดิม เนื่องจากความเข้มข้นของ โขเทียมแอลจิเนตน้อย ทำให้เม็ดเจลมีความบางและไม่เสถียร หากเม็ดเจลมีความบางจะทำให้สารอาหารซึมผ่านเข้าสู่ข้างในเม็ดเจลได้ง่าย จึงสามารถผลิตกรดแลกติกได้มาก ในขณะที่เดียวกันเซลล์ก็ถูกทำลายจากสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงได้ง่ายด้วยเช่นกัน ดังนั้น โขเทียมแอลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 1 จึงไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก เมื่อความเข้มข้นของ โขเทียมแอลจิเนตเพิ่มขึ้น (ร้อยละ 3 และ 4) พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ลดลง เนื่องจากเม็ดเจลมีความคงตัวมากเกินไปทำให้สารอาหารซึมผ่านเข้าไปภายในเม็ดเจลได้ยาก ปริมาณกรดแลกติกที่เชื้อผลิตได้จึงน้อย (Dembczynski and Jankowski, 2002) ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Yoo *et al.* (1996) พบว่าเมื่อใช้ โขเทียมแอลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นวัสดุในการตรึงเชื้อ *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus* เพื่อผลิตกรดแลกติก พบว่าเซลล์เริ่มมีการรั่วไหลออกจากเม็ดเจลที่ชั่วโมงที่ 60 จากการศึกษาของ Lee and Heo (2000) พบว่า โขเทียมแอลจิเนตความเข้มข้นสูงทำให้จำนวนช่องว่างของเม็ดเจลลดลง ส่งผลให้การแพร่ของสารอาหารเกิดขึ้นได้ช้าและยังพบว่าจำนวนช่องว่างภายในเม็ดเจลมีอิทธิพลต่อการแพร่ของสารอาหารมากกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของช่องว่างภายในเม็ดเจล หากความเข้มข้นของ โขเทียมแอลจิเนตต่ำกว่าร้อยละ 2 จะทำให้เม็ดเจลไม่เกิดรูปร่างทรงกลม (spherically shaped beads) เนื่องจาก โขเทียมแอลจิเนตมีความหนืดต่ำทำให้มีความสามารถในการคงรูปร่างทรงกลมได้ไม่ดี เนื่องจากสามารถต้านทานแรงที่เกิดจากการหยดลงบนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ได้น้อย นอกจากนี้การศึกษาของ Idris and Suzana (2006) พบว่าการใช้ โขเทียมแอลจิเนตร้อยละ 2 เป็นวัสดุในการตรึงเซลล์มีความเหมาะสมมากกว่า โขเทียมแอลจิเนตร้อยละ 1, 4, 6 และ 8 โดยสามารถผลิตกรดแลกติกสูงสุด 29.39 กรัมต่อลิตร หาก โขเทียมแอลจิเนตมากกว่าร้อยละ 2 การผลิตกรดแลกติกจะลดลง เนื่องจากเกิดปัญหาการแพร่ของสารอาหารผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ยาก หากใช้ โขเทียมแอลจิเนตร้อยละ 1 ทำให้เม็ดเจลมีความบางและเกิดการรั่วไหลของเซลล์ออกจากเม็ดเจลได้ง่าย ดังนั้น โขเทียมแอลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 จึงเหมาะสมต่อการตรึงเซลล์เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากเม็ดเจลมีความคงตัวตลอดระยะเวลาการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงผลของความเข้มข้นของโกลดิยมแอลจิเนตที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก ในอาหารเวย์จากการตรึงเซลล์ *L. casei* TISTR 1341 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง



รูปที่ 4.5 แสดงผลของความเข้มข้นของโกลดิยมแอลจิเนตที่มีต่อการใช้น้ำตาลแลกโตสในอาหารเวย์จากการตรึงเซลล์ *L. casei* TISTR 1341 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

4.3.1 ผลการศึกษาปริมาณของเวย์ที่ใช้เป็นซับสเตรตในการผลิตกรดแลกติก

จากการทดลองใช้เวย์ความเข้มข้นร้อยละ 100 พบว่า หลังจากสิ้นสุดการทดลองยังคงเหลือน้ำตาลแลคโตสอยู่ในอาหารเวย์ จึงค้นแปรปริมาณเวย์ร้อยละ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 (มีปริมาณน้ำตาลแลคโตสเริ่มต้น 22.30, 26.71, 30.58, 35.84, 40.37 และ 44.95 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) เพื่อหาปริมาณเวย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเซลล์ที่ถูกตรึง โดยใช้ระยะทางในการตรึงเซลล์ที่อยู่ในช่วง 12 ถึง 16 เซนติเมตร โขเคียมแอลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 ในการตรึงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3 รูปที่ 4.6 และรูปที่ 4.7

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของความเข้มข้นของเวย์ที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป และค่าพีเอชจากการตรึงเซลล์ *L. casei* TISTR 1341 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง ณ ชั่วโมงที่ 72

ความเข้มข้นของเวย์ (ร้อยละ)	ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปทั้งหมด (ร้อยละ)	ค่าพีเอช
100	5.51 ^c ± 0.154	72.92	4.4
90	6.77 ^a ± 0.066	77.80	4.2
80	6.46 ^b ± 0.142	94.72	4.2
70	4.83 ^d ± 0.087	99.05	4.5
60	4.36 ^e ± 0.231	99.81	4.6
50	2.44 ^f ± 0.201	99.84	5.4

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

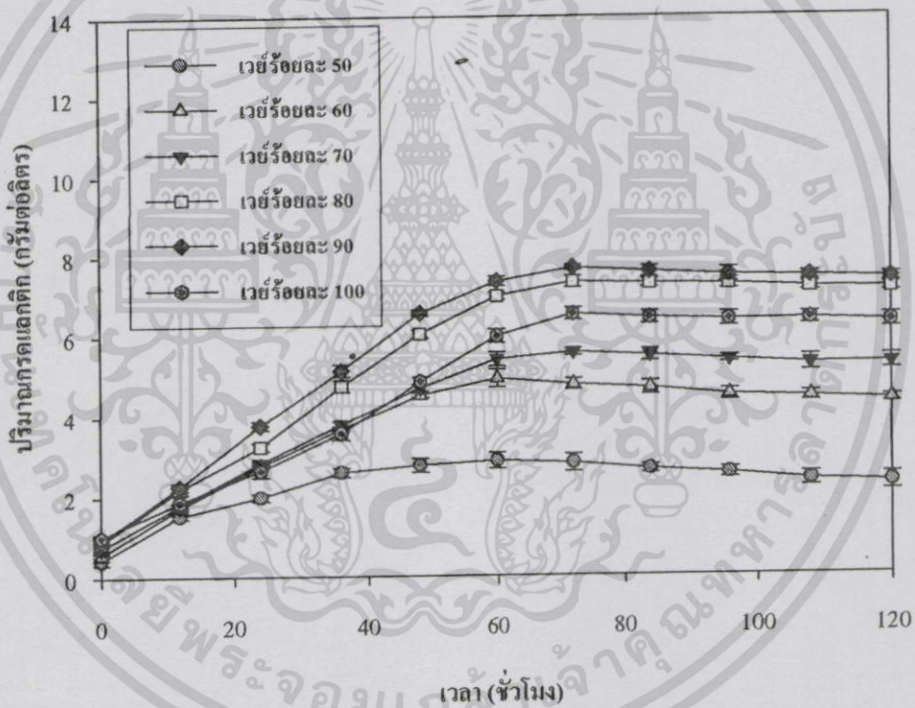
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติกสูงสุด ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

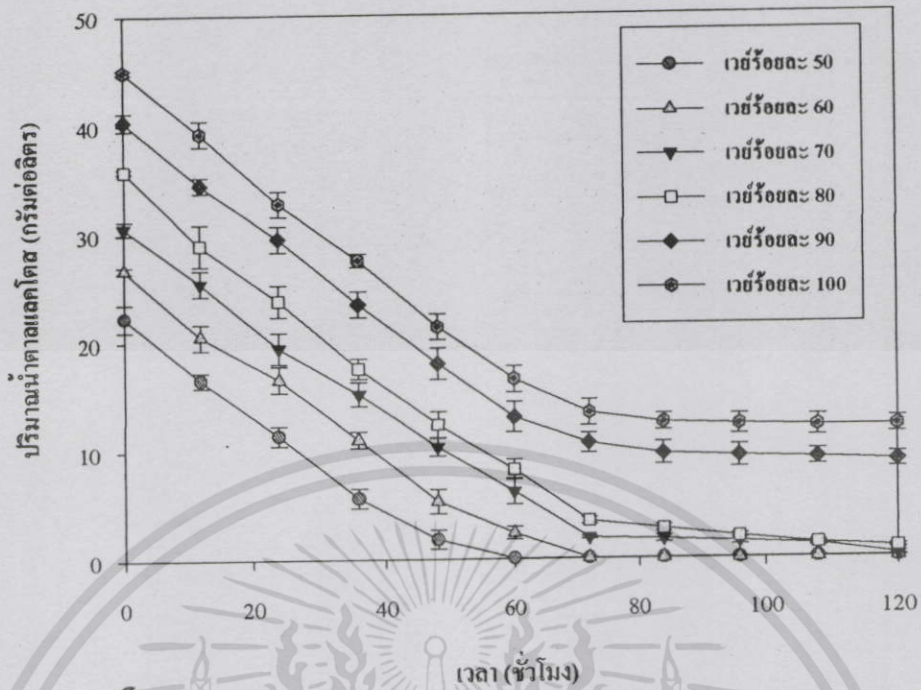
จากตารางที่ 4.3 พบว่า ความเข้มข้นของเวย์ร้อยละ 90 สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด รองลงมาคือ เวย์ความเข้มข้นร้อยละ 80, 100, 70, 60 และ 50 สามารถผลิตกรดแลกติกได้

6.77, 6.46, 5.51, 4.83, 4.36 และ 2.44 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลแลคโตสไปร้อยละ 77.80, 94.72, 72.92, 99.05, 99.81 และ 99.84 พี่เอชต่ำสุดเท่ากับ 4.2, 4.2, 4.4, 4.5, 4.6 และ 5.4 ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.6 และรูปที่ 4.7 พบว่าหากใช้เวย์ที่มีความเข้มข้นน้อยหรือมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสน้อย (ร้อยละ 50, 60, 70 และ 80) ทำให้ไม่เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของเชื้อปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จึงน้อย หากใช้เวย์ความเข้มข้นร้อยละ 100 พบว่าผลิตกรดแลคติกได้น้อยกว่าเวย์ความเข้มข้นร้อยละ 80 และ 90 เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสมากทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดแลคติกซึ่งเกิดจากซับสเตรตที่มีความเข้มข้นสูง (substrate inhibition) (Kadam *et al.* 2006) สำหรับเวย์ความเข้มข้นร้อยละ 90 สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากที่สุด เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติกมากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกเวย์ความเข้มข้นร้อยละ 90 มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.6 แสดงผลของความเข้มข้นของเวย์ที่มีต่อการผลิตกรดแลคติก จากการตรึงเซลล์ *L. casei* TISTR 1341 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง



รูปที่ 4.7 แสดงผลของความเข้มข้นของเว็ร็อยดะที่มีต่อการใช้น้ำตาลแลคโตสของเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

จากการวิจัยของ Fu and Mathews (1999) พบว่าหากความเข้มข้นของขั้วสเตรตสูงจะยับยั้งการเจริญของเซลล์โดยศึกษาปริมาณน้ำตาลแลคโตสเริ่มต้น 20 ถึง 60 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสน้อย (20 กรัมต่อลิตร) จะทำให้การเจริญของเซลล์ในช่วง lag phase ต่ำ แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสสูงถึง 60 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญในช่วง lag phase เพิ่มขึ้น 5 ชั่วโมง

จากการศึกษาของ Kadam *et al.* (2006) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 จากน้ำตาลซูโครส โดยผันแปรปริมาณน้ำตาลซูโครส 50, 80, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 44.5, 66, 63, 78 และ 33.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อน้ำตาลซูโครสมีความเข้มข้นสูง (200 กรัมต่อลิตร) จะเกิดการยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดแลกติก ทำให้ปริมาณกรดแลกติกที่เชื้อผลิตได้ลดลง

4.3.2 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก

ทำการตรึงเซลล์โดยใช้ระยะเวลาทางระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลาย แคลเซียมคลอไรด์ในช่วง 12 ถึง 16 เซนติเมตร ความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนตร้อยละ 2 ความเข้มข้นของเวย์ร้อยละ 90 โดยผันแปรอุณหภูมิ 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่ง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.8

ตารางที่ 4.4 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป และค่าพีเอชในอาหารเวย์ จากการตรึงเซลล์ *L. casei* TISTR 1341 ที่สภาวะนิ่ง ณ ชั่วโมงที่ 72

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณกรดแลกติก สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตส ที่ถูกใช้ไปทั้งหมด (ร้อยละ)	ค่าพีเอช
35	6.25 ^b ± 0.150	73.53	4.2
37	6.69 ^a ± 0.150	76.12	4.2
40	4.93 ^c ± 0.140	70.65	4.5

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

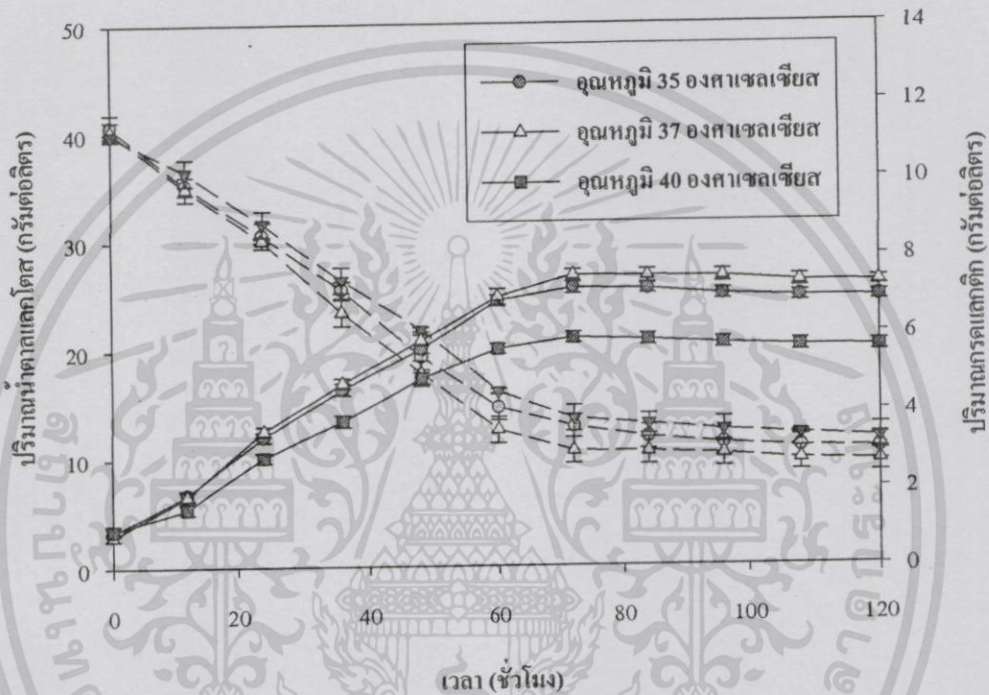
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติกสูงสุด ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.4 พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากเซลล์ที่ถูกตรึงโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด รองลงมาคือ อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 6.69, 6.25 และ 4.39 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลแลคโตสไปร้อยละ 76.12, 73.53 และ 70.65 พีเอชค่าสุด 4.2, 4.2 และ 4.5 ตามลำดับ ดังนั้นอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยพบว่าหากอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติกจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาการหมักลดลง (Mostafa, 1996) หากใช้อุณหภูมิสูงในการเพาะเลี้ยงจะทำให้เกิดความร้อนต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic heat generation) และเกิดผลเสียต่อการเจริญของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ (John *et al.* 2006) การทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Idris and Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสัประรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาที่อุณหภูมิ 27, 30, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีที่สุด รองลงมาคือ อุณหภูมิ 40, 30, 45, 50 และ 27 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ John *et al.* (2006) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด



รูปที่ 4.8 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลกติกจากการตรึงเซลล์ *L. casei* TISTR 1341 ที่สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.4 ผลการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ทำการตรึงเซลล์โดยใช้ระยะทางระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อยู่ในช่วง 12 ถึง 16 เซนติเมตร โซเดียมแอลจิเนตร้อยละ 2 ความเข้มข้นของเวย์ร้อยละ 90 เป็นตัวทำละลาย เพราะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมพีเอชที่ 6.5 ตลอดจนการทดลองด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยผันแปรอัตราการกวน 0, 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 รูปที่ 4.9 และรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงผลของอัตราการกวนในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป ของเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนต ชั่วโมงที่ 48

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	ปริมาณกรดแลกติก สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตส ที่ถูกใช้ไปทั้งหมด (ร้อยละ)
0	6.45 ^{cd} ± 0.161	75.68
50	6.61 ^c ± 0.140	76.60
100	8.16 ^a ± 0.132	88.98
150	7.62 ^b ± 0.130	83.45
200	6.23 ^d ± 0.100	73.61

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

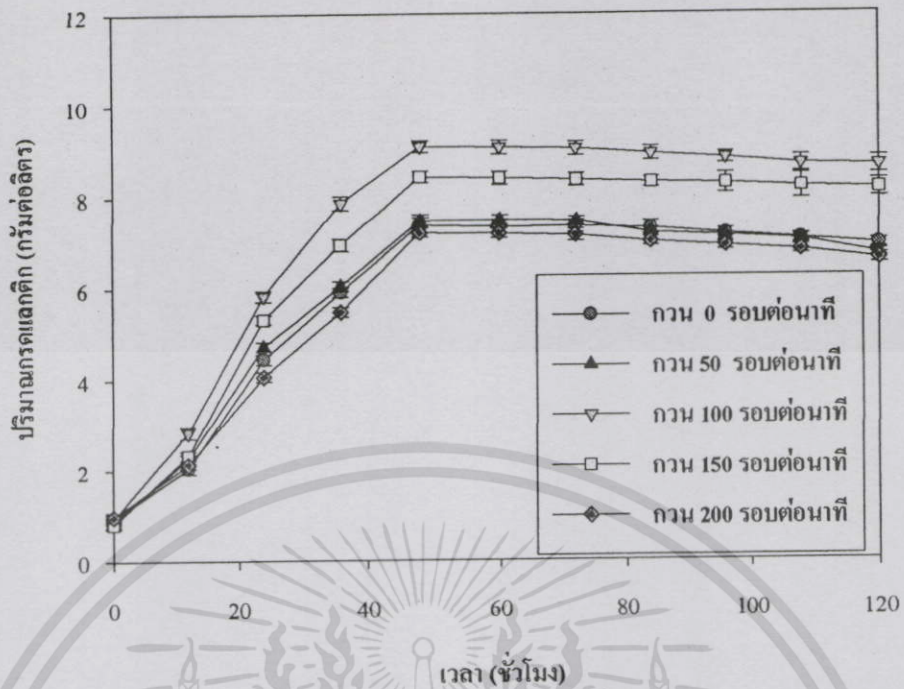
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติกสูงสุด ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

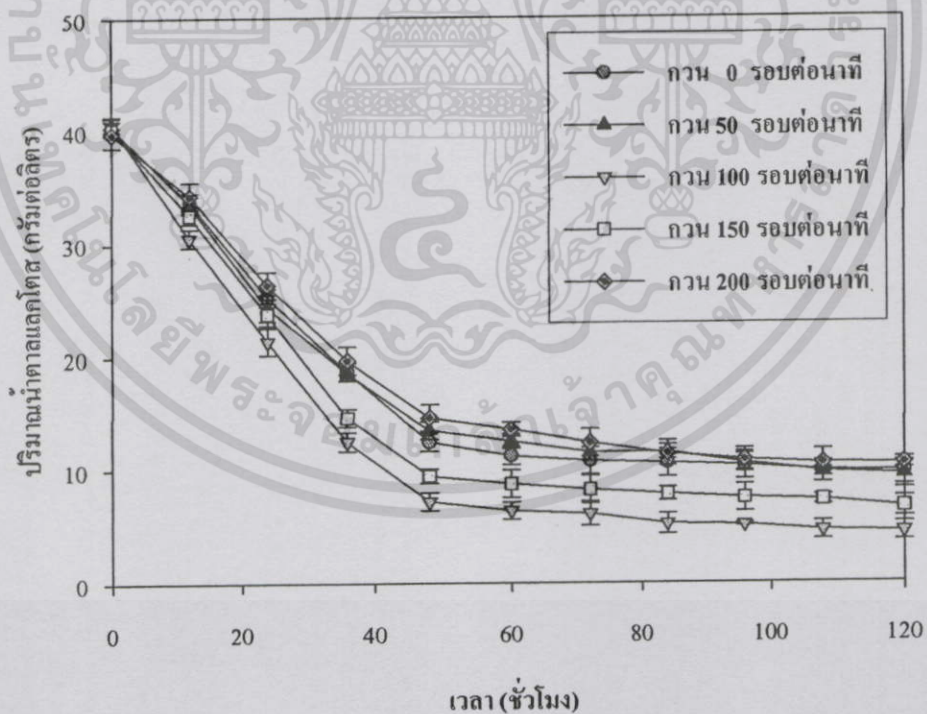
จากการทดลองพบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากการกวนด้วยอัตราเร็ว 100, 150 และ 50 รอบต่อนาที แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับอัตราการกวน 0 รอบต่อนาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับอัตราการกวน 50 และ 200 รอบต่อนาที โดยที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาทีสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด รองลงมาคือกวนด้วยอัตราเร็ว 150, 50, 0 และ 200 รอบต่อนาที โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 8.16, 7.62, 6.61, 6.45 และ 6.23 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลแลคโตสไปร้อยละ 88.98, 83.45, 76.60, 75.68 และ 73.61 ตามลำดับ

จากการค้นแปรอัตราการกวนพบว่าเมื่อไม่มีการกวน (0 รอบต่อนาที) หรือกวนด้วยอัตราเร็ว 50 รอบต่อนาที ทำให้สารอาหาร สารควบคุมพีเอช และเซลล์ที่ถูกตรึงไม่เกิดการกวนผสมกันอย่างต่อเนื่อง ทำให้เซลล์ที่ถูกตรึงสัมผัสกับสารอาหารได้น้อย และการผสมกันของสารอาหารและสารควบคุมพีเอชเกิดขึ้นช้า จึงทำให้กรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณน้อย เมื่ออัตราการกวนเพิ่มขึ้น 150 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้น้อย เนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงได้รับผลกระทบจากแรงเฉือน (shear force) อันเนื่องมาจากความเร็วในการกวนของใบพัดที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เซลล์ที่ถูกตรึงได้รับความเสียหายได้ง่าย (Stanbury and Whitaker, 1984) ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จึงลดลง ดังนั้นจึงเลือกอัตราการกวนในถังหมัก 100 รอบต่อนาที มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงผลของอัตราการกวนในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนต อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง



รูปที่ 4.10 แสดงผลของอัตราการกวนในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีต่อการใช้น้ำตาลแลคโตส ของเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนต อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักและพลาสติกขนาด 2 ลิตร

ทำการตรึงเซลล์โดยใช้ระยะเวลาระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลาย แคลเซียมคลอไรด์ที่อยู่ในช่วง 12 ถึง 16 เซนติเมตร โซเดียมแอลจินเนตร้อยละ 2 ความเข้มข้นของเวย์ร้อยละ 90 เป็นตัวทำละลาย เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด คือ

ชุดที่ 1: เลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาณอาหารเท่ากับ 1,400 มิลลิลิตร โดยมีการกวน 100 รอบต่อนาที ควบคุมพีเอชที่ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.0 โมลาร์

ชุดที่ 2 : เลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาณอาหารเท่ากับ 1,400 มิลลิลิตร โดยมีการกวน 100 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมพีเอช

ชุดที่ 3 : เลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ปริมาณอาหารเท่ากับ 1,400 มิลลิลิตร สภาวะนิ่ง ไม่มีการควบคุมพีเอช

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 รูปที่ 4.11 และรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดแลกติก ผลได้ อัตราการผลิตกรดแลกติกและปริมาณน้ำตาลแลคโตส ที่ถูกใช้ไปโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนตในถังหมัก และพลาสติกขนาด 2 ลิตร

การทดลอง	ชั่วโมง	ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ผลได้กรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปทั้งหมด (ร้อยละ)
ชุดที่ 1	48	$8.16^a \pm 0.132$	$0.226^a \pm 0.004$	$0.170^a \pm 0.003$	88.98
ชุดที่ 2	60	$7.14^b \pm 0.156$	$0.212^b \pm 0.005$	$0.119^b \pm 0.003$	83.48
ชุดที่ 3	72	$6.51^c \pm 0.130$	$0.210^b \pm 0.004$	$0.090^c \pm 0.002$	76.89

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

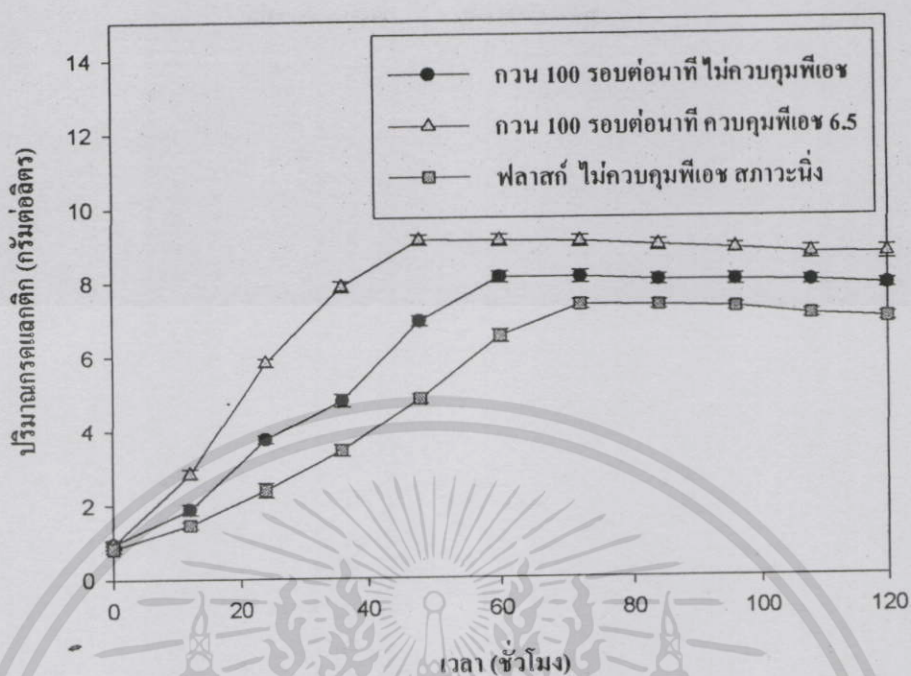
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติกสูงสุด ผลได้กรดแลกติกสูงสุด และอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุด \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

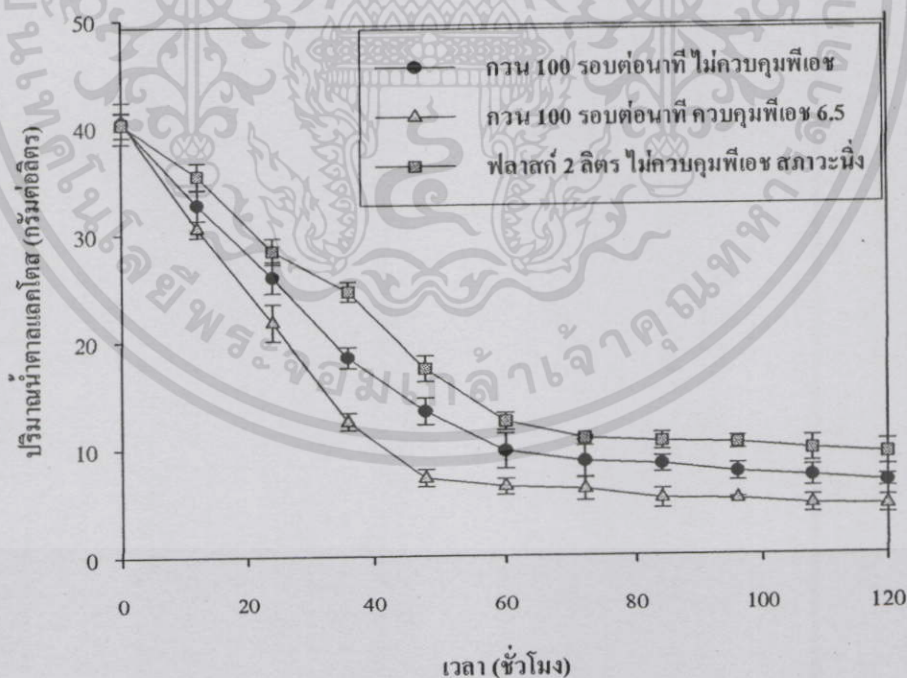
จากผลการทดลองเมื่อนำข้อมูลปริมาณกรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติกมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า การทดลองทั้ง 3 ชุด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอช 6.5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 2 โดยเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที แต่ไม่มีการควบคุมพีเอช และชุดการทดลองที่ 3 โดยเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในพลาสติกที่ไม่มีการควบคุมพีเอช สภาวะนี้ โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 8.16 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48, 7.14 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60, 6.51 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 0.170, 0.119 และ 0.090 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าผลได้ของกรดแลกติกจากการเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที ควบคุมพีเอชที่ 6.5 มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.226 กรัมต่อกรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเลี้ยงในถังหมักที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมพีเอช และการเลี้ยงในพลาสติก สภาวะนี้ ไม่มีการควบคุมพีเอช โดยมีผลได้ของการผลิตกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 0.212 และ 0.210 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกในถังหมักน้อยกว่าในพลาสติก โดยใช้เวลา 60 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าการผลิตกรดแลกติกในถังหมักที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชที่ 6.5 มีประสิทธิภาพดีที่สุด เนื่องจากมีการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยมีการควบคุมพีเอชและมีการกวนผสมทำให้สารอาหาร เซลล์ที่ถูกตรึง และสารควบคุมพีเอชมีการกวนผสมกันอย่างทั่วถึงจึงทำให้ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณมากที่สุด สำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมพีเอช มีข้อดีคือมีการกวนผสม แต่ไม่มีการควบคุมพีเอชส่งผลให้พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากเชื้อมีการสร้างกรดแลกติก ทำให้สภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตกรดแลกติก สำหรับการผลิตกรดแลกติกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะนี้ ไม่มีการควบคุมพีเอช ทำให้ไม่เกิดการกวนผสมและพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้กรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยที่สุด

จากผลการวิจัยของ Ohkouchi and Inouc (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอาหารและแป้งจากเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* LMG 10811 ทำการทดลองโดยมีการควบคุมพีเอชและไม่มีการควบคุมพีเอช โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่าหากไม่มีการควบคุมพีเอชสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 16.80 กรัมต่อลิตร พีเอชลดลงเท่ากับ 3.5 แต่เมื่อควบคุมพีเอชให้คงที่เท่ากับ 5.0 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 40.79 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลา 84 ชั่วโมง ดังนั้นจึงใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และมีการควบคุมพีเอช 6.5 มาใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต ในถังหมักและพลาสติกขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต ในถังหมักและพลาสติกขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการศึกษาการนำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเตทกลับมาใช้ซ้ำเพื่อผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

จากการตรึงเซลล์โดยใช้ระยะทางระหว่างปลายสายยางถึงสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อยู่ในช่วง 12 ถึง 16 เซนติเมตร โยเคียมแอลจินเตทร้อยละ 2 เวช้ความเข้มข้นร้อยละ 90 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเตทในถังหมักขนาด 2 ลิตร อัตราเร็วการกวน 100 รอบต่อนาที ควบคุมพีเอชที่ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.0 โมลาร์ เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักในรอบแรก ทำการถ่ายน้ำหมักออก ถ้างเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเตทด้วยน้ำเกลือที่ปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยล้าง 2 ครั้ง ถ้างน้ำเกลือออก จากนั้นนำอาหารเวย์ชุดใหม่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำตาลแลคโตสในปริมาณเท่าเดิม ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.13 และรูปที่ 4.14

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป ผลได้และอัตราการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเตทโดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ

จำนวนรอบ	ชั่วโมง	ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ผลได้กรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปทั้งหมด (ร้อยละ)
รอบที่ 1	48	8.47± 0.185	0.235± 0.005	0.176± 0.0039	89.42
รอบที่ 2	60	3.61± 0.144	0.225± 0.009	0.060± 0.0024	39.75
รอบที่ 3	120	0.04± 0.048	0.286± 0.338	0.0003± 0.0004	00.35

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติกสูงสุด ผลได้กรดแลกติกสูงสุด และอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุด ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการทดลองพบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีการผลิตกรดแลกติกอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 48 จากนั้นปริมาณกรดแลกติกจะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 48 จากนั้นปริมาณน้ำตาลแลคโตสจะลดลงเพียงเล็กน้อย จนกระทั่งเหลือน้ำตาลแลคโตสในถังหมักน้อยที่สุดซึ่งเป็นการสิ้นสุดกระบวนการหมักในรอบที่ 1 โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 8.47 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 มีการใช้น้ำตาล

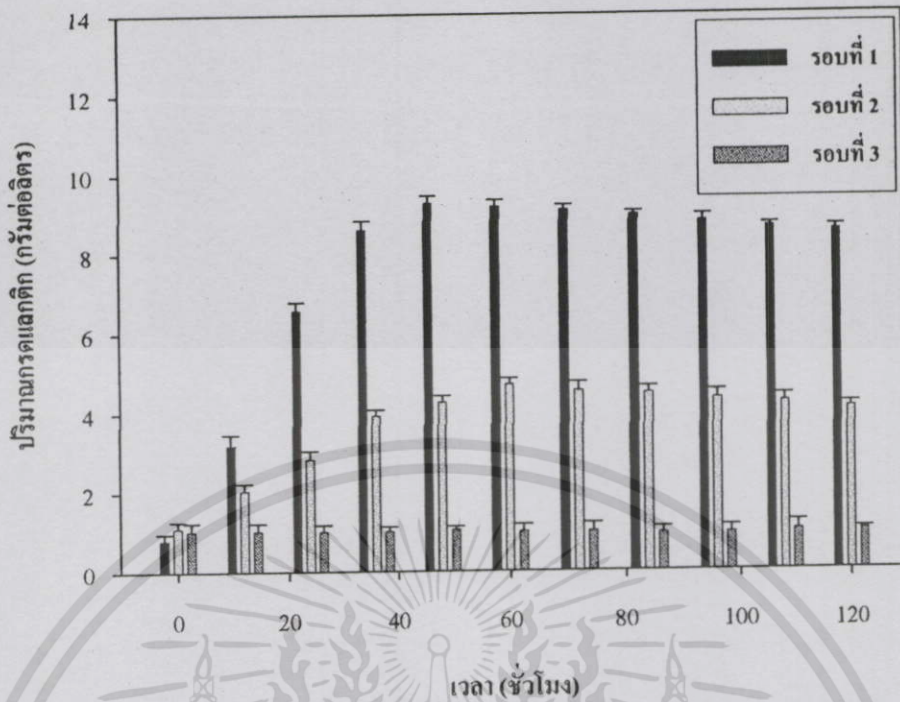
แลกโตสไปร้อยละ 89.42 ในการผลิตกรดแลกติกในรอบที่ 2 พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 3.61 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 60 จากนั้นปริมาณน้ำตาลแลกโตสจะเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการทดลอง

ในการนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่น้อยกว่าในรอบที่ 1 เนื่องจากปริมาณสารอาหารในรอบที่ 1 ใกล้เคียง ทำให้เซลล์ที่ถูกตรึงเจริญอยู่ในระยะคงที่ (steady state) ปริมาณสารอาหารจึงมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เมื่อได้รับสารอาหารที่เติมเข้าไปใหม่ในรอบที่ 2 เซลล์ที่ถูกตรึงจะใช้ระยะเวลาในการปรับตัวให้เข้ากับความเข้มข้นของสารอาหารที่เติมเข้าไป ทำให้ใช้ระยะเวลาในการผลิตกรดแลกติกที่ให้ปริมาณกรดสูงสุด (ชั่วโมงที่ 60) มากกว่าในรอบที่ 1 (ชั่วโมงที่ 48) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mostafa (1996) พบว่าการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยการตรึงเซลล์ *L. casei* ใน วัน เมื่อมีการนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำ (recycle) สามารถผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นร้อยละ 30 แต่ใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในการเริ่มต้นกระบวนการหมักรอบใหม่

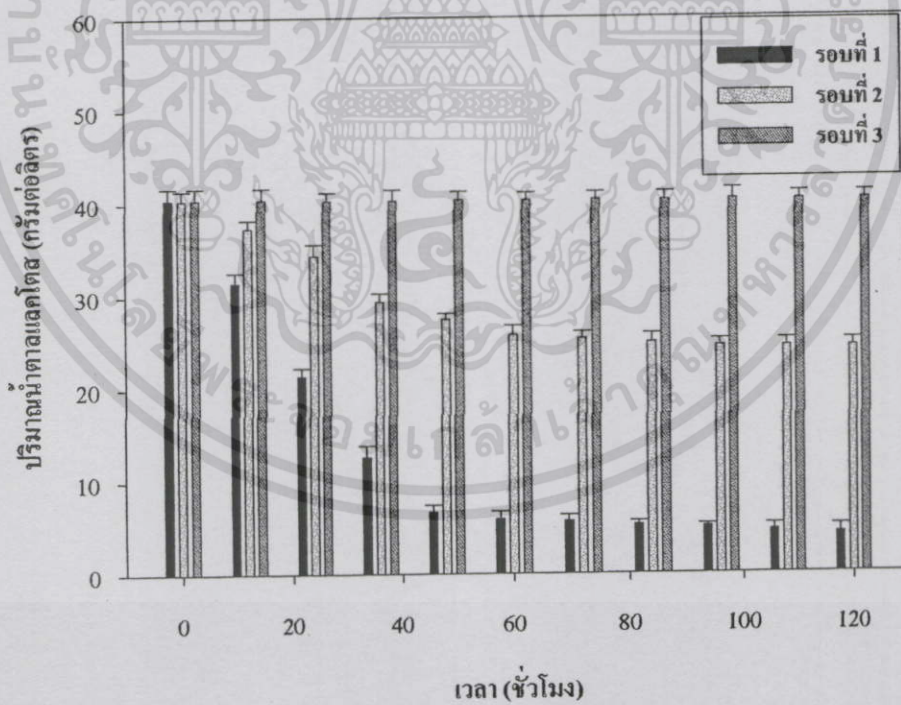
เมื่อนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำรอบที่ 3 พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้เพียง 0.04 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลแลกโตสมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย จึงกล่าวได้ว่าเซลล์ที่ถูกตรึงส่วนมากอยู่ในระยะ death phase ซึ่งเป็นสาเหตุให้การผลิตกรดแลกติกในรอบที่ 3 มีปริมาณน้อย และเป็นสาเหตุที่ทำให้การผลิตกรดแลกติกในรอบที่ 2 มีปริมาณน้อยกว่าในรอบที่ 1 เนื่องจากมีเซลล์บางส่วนเริ่มเข้าสู่ระยะ death phase ดังนั้นเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถผลิตกรดแลกติกได้ทั้งหมดจำนวน 2 รอบ สามารถผลิตกรดแลกติกได้รวม 12.08 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาของ Yoo *et al.* (1996) พบว่าสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ทั้งหมด 4 รอบ โดยที่น้ำหนักเซลล์แห้งในรอบที่ 3 ลดลงเมื่อเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้งในรอบที่ 2 และปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ลดลง เนื่องจากเซลล์รั่วไหลออกจากเม็ดยัด เพราะเกิดการสูญเสียแคลเซียมในเม็ดยัดเนื่องจากกรดแลกติก

จากผลการวิจัยของ จงกมล (2550) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ซึ่งเป็นเซลล์อิสระในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการวน 100 รอบ ต่อนาที ควบคุมพีเอชที่ 6.5 พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 7.26 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติก 0.061 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ดังนั้นในงานวิจัยการเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนตนี้สามารถเพิ่มปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตจากเซลล์อิสระได้โดยใช้วิธีการตรึงเซลล์ และการนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำ



รูปที่ 4.13 แสดงปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตโดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ

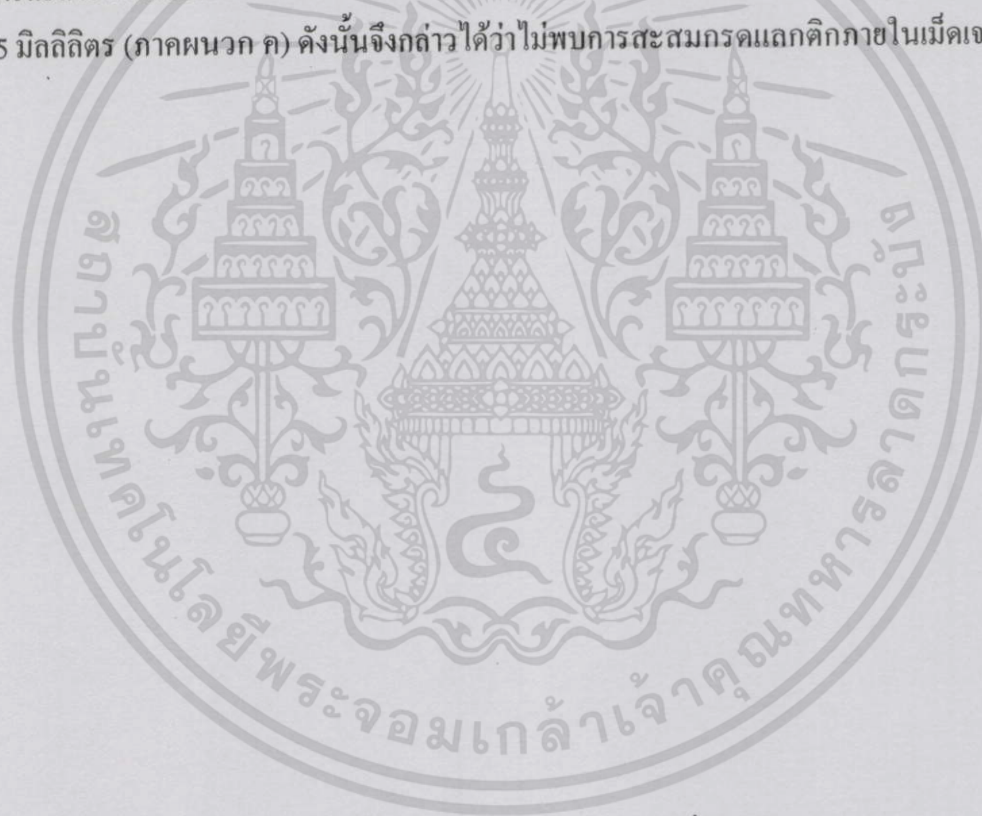


รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปโดยเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตโดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลการศึกษาการสะสมกรดแลกติกภายในเม็ดเจลแคลเซียมแอลจิเนต

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ประกอบด้วย ระยะทางระหว่างปลายสายยาง ถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อยู่ในช่วง 12 ถึง 16 เซนติเมตร โขะเคียมแอลจิเนตร้อยละ 2 และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกประกอบด้วย เว็ความเข้มข้นร้อยละ 90 และ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มาใช้ในการศึกษาการสะสมกรดแลกติกภายในเม็ดเจลโดยการละลาย ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 15, 20 และ 25 มิลลิลิตร พบว่าปริมาตรที่น้อยที่สุดที่สามารถละลายเม็ดเจลได้คือ 15 มิลลิลิตร เมื่อเม็ด เจลละลายหมดนำส่วนในสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปวัดปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC โดยไม่ พบปริมาณกรดแลกติก (เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหมัก) และให้ผลเช่นเดียวกับการละลายเม็ดเจลด้วย สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 20 และ 25 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าไม่พบการสะสมกรดแลกติกภายในเม็ดเจล



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเปรียบเทียบเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์และอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์พบว่าระยะทางระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 12 ถึง 16 เซนติเมตร โซเดียมแอลจิเนตร้อยละ 2 และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกประกอบด้วย เวชความเข้มข้นร้อยละ 90 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 พบว่า อัตราการกวน 100 รอบต่อนาทีสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดโดยใช้เวลาเพียง 48 ชั่วโมง เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกในระดับถึงหมักที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที โดยที่มีการควบคุมพีเอชและ ไม่มีการควบคุมพีเอช และในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรที่ไม่มีการควบคุมพีเอช สภาวะนี้ พบว่าถึงหมักที่มีการกวน 100 รอบต่อนาทีและมีการควบคุมพีเอชมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด สำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยการนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำพบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถผลิตกรดแลกติกได้ทั้งหมด 2 รอบ (รอบละ 120 ชั่วโมง) สามารถผลิตกรดแลกติกได้รวม 12.08 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้เมื่อศึกษาการสะสมกรดแลกติกภายในเม็ดเจลยังพบว่าไม่พบปริมาณกรดแลกติกสะสมภายในเม็ดเจล

บรรณานุกรม

- ชลัท สานตีวรางคณา. 2534. “การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเครื่องดื่มจากเวย์”. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาอุตสาหกรรม คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่1. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิเชียร ตีลาวัชรมาศ. 2535. การใช้เอนไซม์ไม่ละลายน้ำและเซลล์ที่ถูกตรึงในอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิเชียร ตีลาวัชรมาศ. 2526. การผลิตและการใช้immobilized enzymes. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วรรณ ตั้งเจริญชัย. 2532. เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการนมและผลิตภัณฑ์นม ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- ศิวาพร ศิวาวช. 2546. วัตถุดิบอาหาร เล่ม 1. นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ.
- ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ. 2526. การผลิตผลิตภัณฑ์นมและการจัดการ. เอกสารการฝึกอบรมเกี่ยวกับเทคโนโลยีอาหารนม ชุดที่3. สถาบันบำรุงพันธุ์สัตว์. เชียงใหม่.
- สมใจ ศิริโชค. 2544. จุลชีวอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพ.
- สุรีย์ ทองวณิชนิม. 2543. “การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล เพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินेट”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพบัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Adinarayana, K., Jyothi, B. and Ellaiah, P. 2005. “Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique.” **Pharmaceutical Biotechnology**. 06 : E391-E397.
- Alfa – Laval. 1987. **Dairy Handbook**. Food Engineering AB. Sweden.
- Altaf, M., Naveena, B.J. and Reddy, G. 2005. “Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L(+) lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation.” **Food technology and Biotechnology**. 43 (3) : 235 – 239.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรรมใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- A.O.A.C. 2000. **Official Method of Analysis of A.O.A.C. International**. 17th ed. A.O.A.C. International. The United States of America.
- Arasaratnam, V. Senthuran, A. and Balasubramaniam, K. 1996. "Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*". **Enzyme and Microbial Technology**. 19: 482-486.
- Bamforth, C.W. 2005. **Food, Fermentation and Micro-organisms**. Oxford : Blackwell Science.
- Bergmaier, D., Champagne, C.P. and Lacroix, C. 2003. "Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M." **Applied Microbiology**. 95 : 1049-1057.
- Bogdanova, G.J. 1974. **New whole products of improve quality (in Russian)**. Moscow : Pishceva Promishlenost.
- Chauhan, K., Trivedi, Ujjval. and Patel, K.C. 2005. "Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice." **Bioresource Tchnology**. 98 : 98-103.
- Cheetham, P.S.J., Blunt, K.W. and Bucke, C. 1979. "Physical studies in cell immobilization using calcium alginate gels." **Biotechnology and Bioengineering**. 21 : 2155-2168.
- Cheetham, P.S.J. 1980. "Developments in the immobilization of microbial cells and their application." **Topics in Enzyme and fermentation Biotechnology**. 4 : 189-242.
- Chibata, I. and Tosa, T. 1977. "Transformation of organic compounds by immobilized microbial cells." **Advance Applied Microbiology**. 22 : 1-25.
- Dailey, O.D., Dowd, M.K. and Mayorga, J.C.. 2000. "Influences of lactic acid on the solubilization of protein during steeping". **Agri. Food Chem**. 48: 1352-1357.
- Dembczynski, R and Jankowski, T. 2002. "Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules." **Enzyme and Microbial Technology**. 31 : 111-115.
- Dubois, M., Gijjes, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substrate." **Analitical Chemistry**. 28 : 350-356.

- Ertrk, E., Erkman, O., Oner, M.D. 1998. "Effects of various supplements on riboflavin production by *Ashbya gossypii* in whey." **Engineering and Environmental Science**. 22 : 371 – 376.
- 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 considerations for nutrient supplementation of whey permeate fermentations to produce lactic acid for biodegradable plastics." **International Dairy Journal**. 13 : 575 – 580.
- Food and Drug Administration. 1998. "Code of Federal Regulations, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. Title 21.
- Fu, W. and Mathews, A.P. 1999. "Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum* : kinetic model and effects of pH, substrate and oxygen." **Biochemical Engineering Journal**. 3 : 163-170.
- Gemeiner, P. 1992. **Enzyme engineering**. New York : Ellis Horwood.
- Godfrey, T. and West, S. 1996. **Enzymology**. 2nd ed. New York : Macmillan Press.
- Hofvendahl, K. and Hagerdal, H. 1997. "L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*." **Enzyme and microbial technology**. 20 : 301-307.
- Hofvendahl, K. and Hagerdal, B.H. 1999. "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources." **Enzyme and microbial technology**. 26 : 87-107.
- Huang, L.P., Jin, B., Lant, P., Zhou, J. 2005. "Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*." **Biochemical Engineering Journal**. 23 : 265 – 276.
- Hussong, R.V., Morth, E.H. and Vahaleris, D.G. 1973. Cottage cheese, In M.E. Schwartz. **Cheese marking technology**. New Jersey : Noyes Data corporation, Park Ridge..
- 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.

- Inglet, B.S., Song, M., Hansen, C.L. and Hwang, S. 2006. "Cultivation of *Lentinus edodes* Mycelia using Whey permeate as an Alternative Growth Substrate." **Dairy Science.** 89 : 1113-1115.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2006. "Solid state fermentation for L-Lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*." **Process Biochemistry.** 41 : 759-763.
- Jones, M.L., Martoni, C., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T. and Prakash, S. 2005. "Deconjugation of bile acids with immobilized genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80(pCBH11)." **Applied Bionics and Biomechanics.** 2 : 31-38.
- Kadam, S.R., Patil, S.S., Bastawde, K.B., Khire, J. M. and Gokhale, D.V. 2006. "Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production." **Process Biochemistry.** 41 : 120 - 126.
- Kessler, H.G. 1981. **Food Engineering and Dairy Technology.** Verlag A. Kessien, Germany.
- Kim, K.I., Kin, W.K., Seo, D.K., Yoo, I.S., Kim, E.K. and Yoon, H.K. 2003. "Production of lactic acid from food waste". **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 105 : 637-647.
- Ko, Y.T. and Chipley, J.R. 1983. "Microbial Production of Lysine and Threonine from whey permeate." **Applied Environment Micrpbiology.** 45 : 610-615.
- Kosikowski, F.V. 1977. **Cheeses and fermented milk foods.** Michigan : Enwards Erothers, Inc.
- Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E. and Kanellaki, M. 2005. "*Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production." **Process Biochemistry.** 40 : 411 - 416.
- Kushal, R., and, S.K. and Chander, H. 2006. "In vivo demonstration of enhanced probiotic effect of co-immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*." **Dairy Technology.** 59 : 265-271.
- Laskin, I.A. 1985. **Enzyme and Immobilized Cells in Biotechnology.** Canada : The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Lee, K.Y. and Heo, T.R. 1999. "Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution." **Applied and Environmental Microbiology.** 66: 869-873.

- Maldal, S., Puniya, A.K. Singh, K. 2006. "Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298". **International Dairy Journal**. 16: 1190-1195.
- Marshall, K.R. 1982. **Industrial isolation in developments in Dairy Chemistry**. New York : Applied Science Publish.
- Mostafa, N.A. 1996. "Production of lactic acid from whey with agar immobilized cells in a continuous packed tubular reactor." **Energy Convers.** 37 : 253-260.
- Muller, V. 2001.. "Bacterial Fermentation." **Encyclopedia of life Science**.
- Nakazawa, Y. and Hosono, A. 1992. **Functions of fermented milk**. Great Britain: University Press.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F. and Boudrant, J. 2001. "The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid a from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*." **Bioresource Technology**. 78 : 149 – 153.
- Narayanan, N. Roychoudhury, P.K. Srivastava, A. 2004. "L(+) Lactic acid fermentation and its product polymerization." **Electronic Journal of Biotechnology**. 7 : 167 – 179.
- Nielsen, E.W. and Ullum, J.A. 1989. **Dairy Technology**. New York : Danish Turnkey Dairies LTD.
- 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 wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011." **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 .
- Pederson, A.H. and Warner, H. 1978. **IDF Bull**.
- Renner, E. 1983. **Milk and Dairy Productions in Human Nutrition**. Volles. Verl. Munchen.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Roukas, T and Kotzekidou, P. 1998. "Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture." **Enzyme and Microbial Technology**. 22 : 199 – 204.
- Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A. 1998. **Lactic acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects**. 2 nd ed. New York : Marcel Dekker.
- Salminen, S., Wright, A. and Ouwehand, A. 2004. **Lactic acid bacteria**. 3 rd ed. New York : Marcel Dekker.
- Scott, R. 1986. **Cheese making practise**. London : Elsevier Applied Science Publishers.
- Senthuran, A., Senthuran, V., Kaul, R.H. and Mattiasson, B. 1999. "Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization". **Journal of Biotechnology**. 73 : 61-70.
- Stanbury, P. and Whitaker, A. 1984. **Principles of fermentation technology**. Great Britain: BPC Wheatons Ltd.
- Vasala, A., Panula, J. and Neubauer, P. 2005. "Efficient lactic acid production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* spp. *salicinus* with pre-treatment by proteolytic microorganisms." **Journal of Biotechnology**. 117 : 421-431.
- Webb, B.H. and Whitter, E.O. 1970. **By products from milk**. Westport Connecticut : The AVI Publishing Company, Inc.
- 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.
- Yoo, I.K., Seong, G.H., Chang, H.N. and Park, J.K. 1996. "Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production." **Enzyme and Microbial Technology**. 19 : 428-433.
- Youssef, C.B., Guillou, V. and Dichara, A.O. 2000. "Modelling and adaptive control strategy in lactic acid fermentation process." **Control Engineering Practice**. 8 : 1297-1307.
- Yun, J.S., Wee, Y.J. and Ryu, H.W. 2003. "Production of optically pure L(+) lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1." **Enzyme and Microbial Technology**. 33 : 416-423.

Available : www.bioline.org.br/.../ej0402/ej04016e4.jpg

Available : bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Available : <http://www.indiana.edu/~ensiweb/lessons/tp.2.gif>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว MRS

เนื้อสกัด (meat extract)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม
โครเมียมโมเนียมซัลเฟต (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 ปรับพีเอช ให้ได้ 6.5 (± 1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารแข็ง MRS

เนื้อสกัด (meat extract)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

วิธีการ

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ให้ได้ 6.5 (± 1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหารสังเคราะห์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

แลคโตส	50	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
โคโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.10	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัมต่อลิตร

วิธีการ

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ให้ได้ 6.5 (± 1) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

1.4. อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

ยีสต์สกัด	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
โคโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.10	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในเวย์ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ $6.5 (\pm 1)$ ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมี

2.1 สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 3 เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ปรับพีเอชเท่ากับ 3

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

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

2.2 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ± 0.2

ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.4 ± 0.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์ทั้งหมดโดยวิธี Total plate count (A.O.A.C. 2000)

วิธีการเตรียมน้ำเกลือร้อยละ 0.85

ซังโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม ละลายในน้ำ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การละลายเม็ดเจลเพื่อให้อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนตในแต่ละพลาสติกจำนวน 11 พลาสติกที่ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มาทำให้อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยโดยเมื่อถึงเวลา ณ ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 เทอาหารเวทย์ในแต่ละพลาสติกออก จากนั้นนำเม็ดเจลทั้งหมดมาละลายด้วยสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์พีเอช 7.4 ปริมาตร 110 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (น้ำหนักเม็ดเจลเท่ากับ 11 กรัม) เมื่อเม็ดเจลละลายหมดจะได้ตัวอย่างเซลล์แขวนลอยที่ระดับความเจือจาง 10 เท่า จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยวิธี Total plate count

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างเซลล์แขวนลอยที่ได้จากเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงที่ผ่านการละลายเม็ดเจล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจาง
2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างแต่ละความเจือจางที่เหมาะสมใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 1 มิลลิลิตร โดยใช้ 3 จานในแต่ละระดับความเจือจาง
3. นำอาหารแข็ง MRS ไปหลอมให้ละลายแล้วทิ้งให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร
4. เขย่าจานโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนวันแข็ง
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน
6. นับจำนวนโคโลนีในอาหารแข็งเชื้อ โดยเลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร โดยคูณค่าเฉลี่ยนั้นด้วยระดับความเจือจางที่ตรวจนับหมายเหตุ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และทุกขั้นตอนใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

2. การวิเคราะห์น้ำตาลแลคโตสวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois, 1956)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

2. คิวเวตแก้ว

3. ปิเปต

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)

2. ฟีนอล 5% โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม

3. สารละลายแลคโตสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งแลคโตสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแลคโตสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

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

วิธีการ

1. ปิเปตใส่สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายแลคโตสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1 มิลลิลิตร

2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด

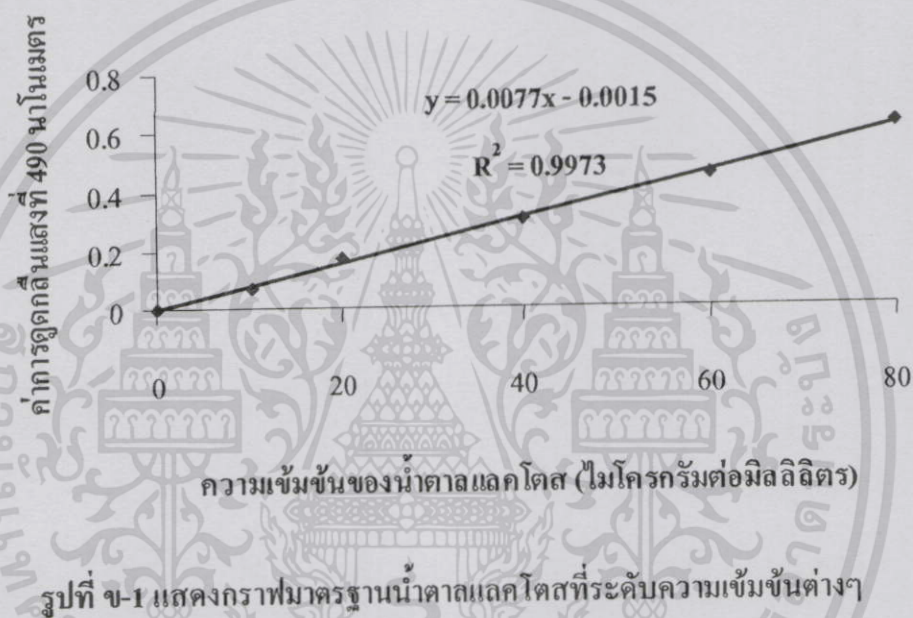
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของแลคโตสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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



3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วย HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ Inertsil C8-3 โดยมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.1 การเตรียมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (Stock solution)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

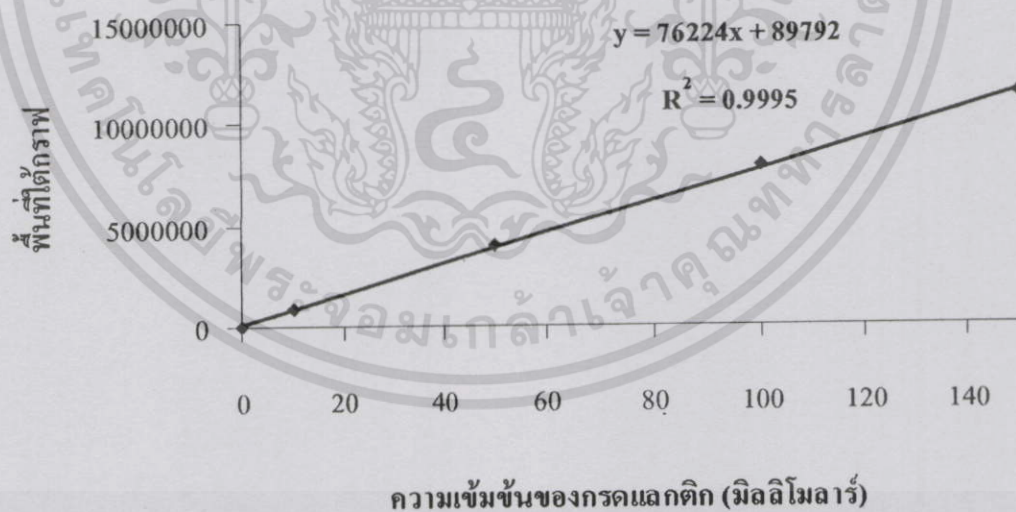
เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.7 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (Deionize water) และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเปิดกรดฟอสฟอริกเข้มข้นปริมาตร 3.4 มิลลิลิตร ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2. นำสารละลายมาตรฐานเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 3 ด้วยสารละลายมาตรฐานเข้มข้นกรดฟอสฟอริก

3.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลกติก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลกติกความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลกติกด้วยเครื่อง HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดแกลกติกโดยคำนวณความเข้มข้นของกรดแกลกติกมาตรฐานที่มีหน่วยมิลลิโมลาร์เป็นหน่วยกรัมต่อลิตร



รูปที่ ข-2 แสดงกราฟมาตรฐานกรดแกลกติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

3.3 ขั้นตอนการใช้เครื่อง HPLC

3.3.1 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

1. เปิดเครื่องทุกชนิดของ HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ยก Sinkers ใต้ในขวดของเฟสเคลื่อนที่
3. เปิด Drain ของปั๊มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั๊ม
4. ให้สังเกตว่าในสายยางของ Sinkers มีฟองอากาศอยู่หรือไม่ ถ้ายังมีให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
5. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinkers ไม่มีแล้วให้รอนปั๊มหยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ปั๊มหยุดทำงาน

6. ปิด Drain valve ที่ปั๊ม
7. ตั้งค่าอัตราการไหล, ค่าความดันสูงสุด และค่าความดันต่ำสุดที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับปั๊ม (ค่าความดันสูงสุดคือความดันที่คอลัมน์สามารถรับได้สูงสุด)

8. ตั้งพารามิเตอร์ให้กับเครื่องตรวจสอบ
9. สั่งให้ปั๊มทำงานตามสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.3.2 ขั้นตอนการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

1. ปิดปั๊ม HPLC
2. เทเฟสเคลื่อนที่ใหม่ลงในบีกเกอร์
3. เปิด Drain ของปั๊มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั๊ม
4. ยก Sinkers ออกจากเฟสเคลื่อนที่เก่า แล้วจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มีเฟสเคลื่อนที่ใหม่อยู่
5. รอนปั๊มดูดเฟสเคลื่อนที่ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20-30 มิลลิลิตร
6. ยก Sinkers ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็คสายของ Sinkers ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาดแล้วนำ Sinkers จุ่มลงในขวดของเฟสเคลื่อนที่ใหม่
7. ในระหว่างขั้นตอนที่ 1-6 ถ้าปั๊มหยุดทำงาน ให้กดปุ่ม Purge อีกครั้ง
8. ให้สังเกตว่าสายของ Sinkers มีฟองอากาศอยู่หรือไม่ ถ้ายังมีให้กด Purge ให้ปั๊มทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
9. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinkers ไม่มีแล้วให้รอนปั๊มหยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ปั๊มหยุดทำงาน

10. ปิด Drain valve ที่ปั๊มแล้วสั่งให้ปั๊มทำงานตามสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

หมายเหตุ : การเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ ต้องคำนึงถึงด้วยว่าเฟสเคลื่อนที่เก่าและใหม่เข้ากันหรือไม่ ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันได้ต้องใช้สารชนิดอื่นเป็นตัวเชื่อมกลาง โดย run เฟสเคลื่อนที่ตัวเชื่อมกลางอย่างน้อย 20 นาที

ตัวอย่าง 1) Buffer Solution → น้ำกลั่น HPLC → Polar Organic Solvent

2) Non Polar Solvent → Iso-propanol Polar → Organic Solvent

3.3.3 ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ตรวจสอบสถานะของเครื่องแสดงผลให้อยู่ในสถานะ Ready
2. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าเครื่องตรวจสอบอยู่ในสถานะ Ready
3. รอกน baseline ก่อนข้างนี้
4. ถ้า base line นี้สูงกว่าศูนย์เล็กน้อยสามารถตั้งศูนย์อัตโนมัติโดยกด Z

ทำการฉีดตัวอย่าง

ตัวอย่างการฉีด HPLC

ล้างเข็มฉีดตัวอย่างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง

ล้างเข็มตัวอย่างด้วยตัวอย่างที่ต้องการจะฉีด 3 ครั้ง
ดูดตัวอย่างโดยไม่มีฟองอากาศในเข็มฉีดตัวอย่างแล้ว
ปรับปริมาตรให้ได้ตามที่ฉีดเข้าระบบ HPLC

แทงเข็มเข้าไปใน injector ให้สุด โดย injector ต้องอยู่ในตำแหน่ง LOAD

ฉีด sample เข้าไปใน sample loop ของ injector

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

เมื่อ HPLC system พร้อม ให้บิด injector มาตำแหน่ง INJECT

(กรณีที่ไม่มี AUTO-START ให้กดปุ่ม START ที่ C-R7)

รอประมาณ 5-10 วินาทีแล้วดึงเข็มฉีดตัวอย่างออกจาก injector

ล้าง injector ด้วยน้ำกลั่น 5-10 ml แล้วล้างด้วยอากาศ 10-20 ml โดยใช้เข็มฉีดตัวอย่างพลาสติก
เตรียมพร้อมฉีดตัวอย่างต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 ขั้นตอนการปิดเครื่อง

1. หลังจากฉีดตัวอย่างสูงสุดสุดท้ายเสร็จแล้ว ให้ run เฟสเคลื่อนที่ต่ออีกประมาณ 30 นาที
2. ตั้งปิดปั๊ม
3. ปิดเครื่อง HPLC แล้วยก sinker ให้พื้นเฟสเคลื่อนที่

หมายเหตุ : กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

3.3.5 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

1. RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที
2. RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เก็บคอลัมน์ 30 นาที
3. ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

หมายเหตุ

การเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งานมาเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คอลัมน์ ต้องระวังการผสมกันระหว่างเฟสเคลื่อนที่ทั้ง 2 ว่าสามารถผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันได้ดีต้องมีเฟสเคลื่อนที่ชั้นกลางอย่างละ 30 นาที

1. การล้างใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที หรือน้อยกว่าขึ้นอยู่กับชนิดของคอลัมน์

ตัวอย่าง การล้างเครื่อง โดยมีเฟสการเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารละลายบัฟเฟอร์และเฟสการเคลื่อนที่ที่คอลัมน์เป็นเมทานอลร้อยละ 70

สารละลายบัฟเฟอร์ 30 นาที



น้ำกลั่น(เฟสการเคลื่อนที่ชั้นกลาง) 30 นาที



เมทานอลร้อยละ 70 นาน 30 นาที



ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่ต้องหยุดมากกว่า 1 เดือน)

1. RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที
2. RUN เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เก็บคอลัมน์ 1 ชั่วโมง
3. หยุดปั๊มแล้วถอดคอลัมน์ออกจากระบบแล้วต่อ pipe เปล่าแทนที่จะปิด

คอลัมน์ด้วย plug ให้แน่น

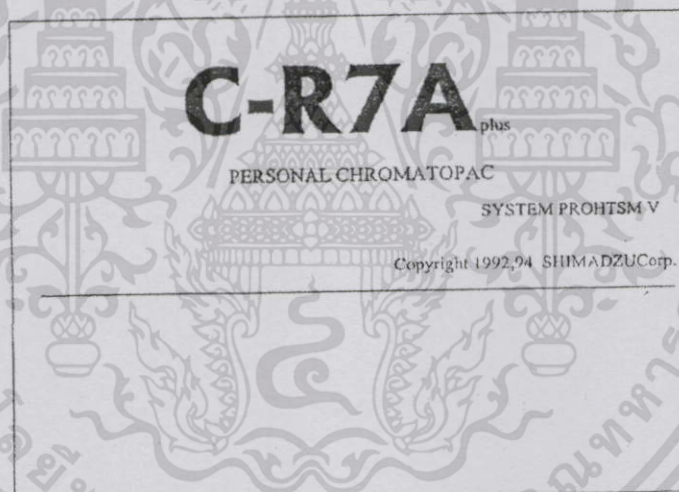
4. เปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 70 MeOH แล้ว RUN เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาที
ถึง 1 ชั่วโมง

5. ปิดปั๊มและเปิดเครื่อง HPLC ทุกยูนิต
6. ยก sinker ออกจากขวด เฟสเคลื่อนที่ แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกัน

ฝุ่น

3.3.7 ขั้นตอนการใช้งาน C-R7A

1. กดปุ่ม C-R7A ในกรณีที่มี 2 drive ให้ใส่แผ่น system disk ใน drive 1 และ
บันทึกข้อมูลลงใน drive 2 จะปรากฏหน้าจอ



2. กด win 1 จะปรากฏหน้าจอ MENU ของ WIN1 เลือกข้อ 2 ตามด้วย ENTER
จะปรากฏ g เลือก L เพื่อเรียก Analysis File ที่เคยสร้าง File เก็บไว้

E ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูก Load ขึ้นมาใช้

งาน

R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่า ใน Analysis File ที่ Load ขึ้นมาใช้งานอยู่

A ในกรณีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File กับทุกๆ ครั้งของการฉีด

วิธีการสร้าง Analysis File ใหม่

- เลือก E เพื่อปรากฏหน้าจอ Analysis File
- แก้ไขพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ WIDTH 5
DRIFT (uV/min) 0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ T.DBL (min) 1000

- กด EXIT เพื่อออกจากหน้าจอ จะปรากฏคำถาม จะปรากฏ

SAVE FILE? YES · NO

กด Y

Part	1:
File Name	2:

กำหนด Drive และชื่อ Analysis File ตามที่ต้องการตรงตำแหน่ง File Name ตามด้วย Enter เช่น

Part	1:
File Name	2: ALCOHOL

3. หลังจากการ Save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN1 ตั้งชื่อ File สำหรับ Save ข้อมูลของ Chromatogram เลือกตามข้อ 3 ตามด้วย ENTER จะปรากฏ

Chromatogram Storage Mode [s: set R: reset C : Chanal latest A: auto]

เลือก S เมื่อต้องการที่จะตั้งชื่อ file สำหรับ save จะปรากฏ

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

กำหนด Drive และชื่อ File ตามด้วย “.C00” และ ENTER จำนวนโครมาโตแกรมที่ต้องการ Save ในชื่อเดียวกันนี้ (สูงสุดที่ 99) และ ENTER เช่น

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

- เลือก R เมื่อต้องการยกเลิกการตั้งชื่อข้างต้น
- C ยกเลิกการ Save ของ โครมาโตแกรมสุดท้าย
- A เมื่อต้องการให้เครื่อง Save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เลือกข้อ 1 จากหน้าจอ MENU ของ WIN1 จากนั้นรอรจนตั้งเกตุเห็นเส้น BASE LINE ค่อนข้างเรียบจากนั้นทำการ Zero สัญญาณจาก Detector โดยกดปุ่ม ZERO สัญญาณจาก Detector จนกว่าจะสามารถ set 0 ที่ Detector ได้

5. ทำการ test slope ของสัญญาณที่ส่งมาโดยกด S ที่เครื่อง C-R7A เครื่องจะใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 10 เท่าของค่า Width ที่ตั้งไว้ใน Analysis File หลังจากการทดสอบสิ้นสุดค่า slope ที่ได้จะถูก save ใน Analysis File อัตโนมัตถ้าต้องการแก้ไขให้กลับเข้าสู่หน้า MENU ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ใน Analysis File

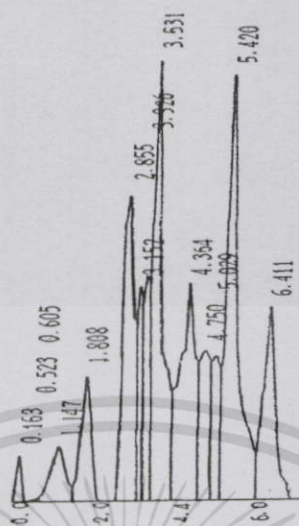
6. เมื่อ Base line นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณ และให้ทำการฉีดสารหรือมกด START

ในกรณีที่เครื่อง C-R7A สามารถเชื่อมต่อและควบคุมการทำงานของ HPLC จะสามารถขอค่าต่างๆของเครื่อง HPLC ผ่านเครื่อง C-R7A ได้จากหน้า MENU ของ WIN1 โดยเลือกข้อ 7:LC Monitor ตามด้วย ENTER

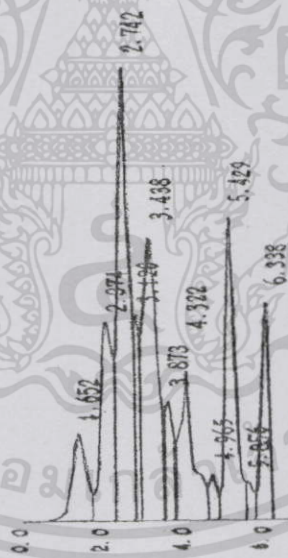
4. ตัวอย่างโครมาโตแกรมของกรดแลกติก



รูปที่ ข-3 แสดงโครมาโตแกรมของกรดแลกติกมาตรฐาน

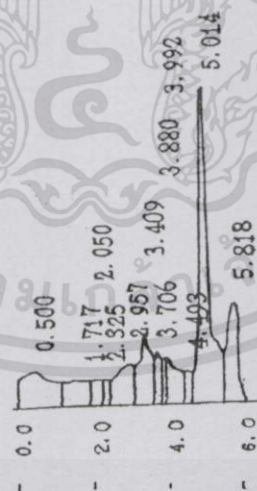
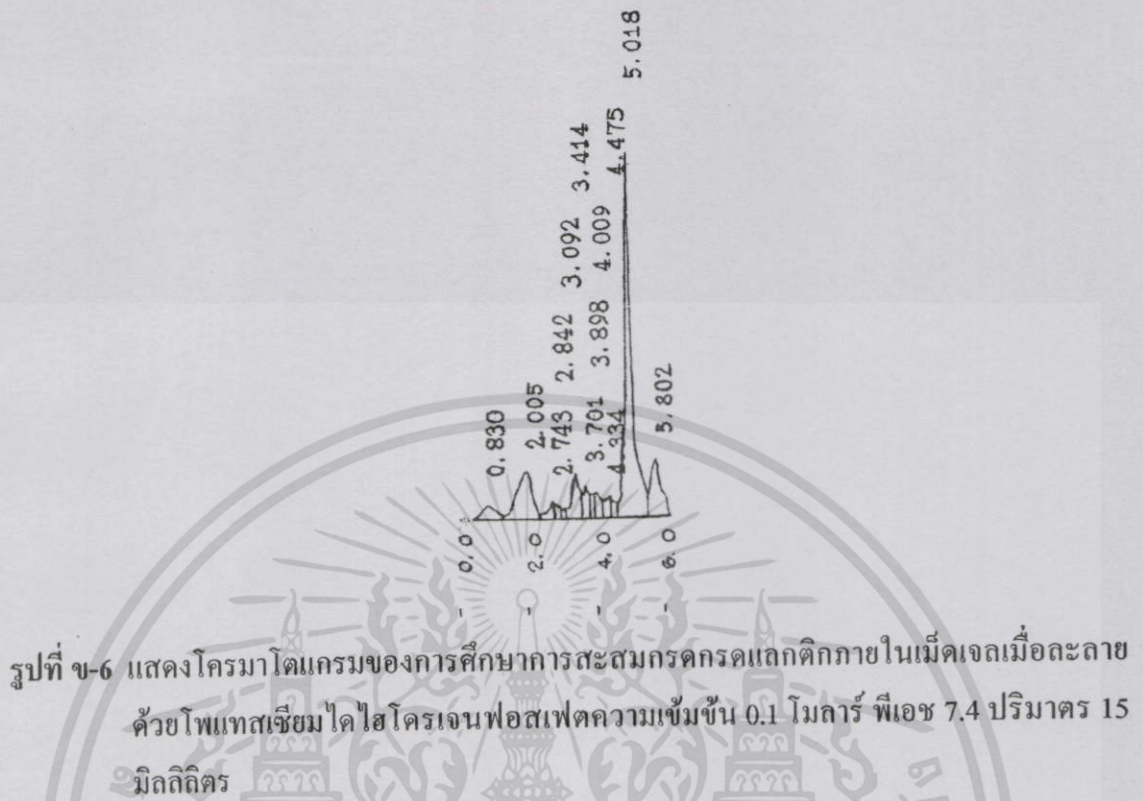


รูปที่ ข-4 แสดงโครมาโตแกรมของกรดแลคติกที่ผลิตจากเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วย แคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์ ณ ชั่วโมงที่ 72



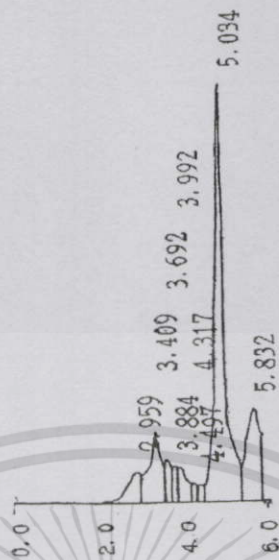
รูปที่ ข-5 แสดงโครมาโตแกรมของกรดแลคติกที่ผลิตจากเชื้อ *L. casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วย แคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์ ในการศึกษาการสะสมกรดแลคติกในเม็ดเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-7 แสดงโครมาโตแกรมของการศึกษาการสะสมกรดแลกติกภายในเม็ดเจลเมื่อละลายด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-8 แสดงโครมาโตแกรมของการศึกษาการสะสมกรดแลกติกภายในเนื้อเจลเมื่อละลายด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ผลของการเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยใช้
เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารสังเคราะห์และเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อย
ละ 2

ปริมาณกรดแลกติก

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.299	3	.766	37.711	.000
Within Groups	.163	8	.020		
Total	2.462	11			

DATA

Duncan

ปริมาณกรดแลกติก	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
เซลล์อิสระในอาหารสังเคราะห์	3	4.5100		
เซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารสังเคราะห์	3	4.6300		
เซลล์อิสระในอาหารเวย์	3		5.0400	
เซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารเวย์	3			5.6300
Sig.		.333	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ผลได้ของกรดแลกติก

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	2.616	.123
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.000	11			

DATA

Duncan

ผลได้ของกรดแลกติก	Subset for alpha = .05	
	N	F
เซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารสังเคราะห์	3	.1368
เซลล์อิสระในอาหารสังเคราะห์	3	.1373
เซลล์อิสระในอาหารเวย์	3	.1416
เซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารเวย์	3	.1447
Sig.		.053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการผลิตกรดแลกติก

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	3	.000	44.648	.000
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.001	11			

DATA

Duncan

ผลได้ของกรดแลกติก	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
เซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารสังเคราะห์	3	.0643		
เซลล์อิสระในอาหารสังเคราะห์	3		.0751	
เซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารเวย์	3		.0782	
เซลล์อิสระในอาหารเวย์	3			.0840
Sig.		1.000	.117	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

2.1 ผลการศึกษาระยะทางระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

ปริมาณกรดแลกติก

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.018	10	.202	7.543	.000
Within Groups	.589	22	.027		
Total	2.607	32			

DATA

Duncan

ระยะทาง	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
20.00	3	4.5900		
2.00	3	4.6167	4.6167	
18.00	3	4.6367	4.6367	
4.00	3	4.6733	4.6733	
6.00	3	4.6833	4.6833	
8.00	3	4.7100	4.7100	
10.00	3		4.9233	4.9233
12.00	3			5.1533
16.00	3			5.1567
15.00	3			5.1867
14.00	3			5.2033
Sig.		.436	.053	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมแอลจินेटที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

ปริมาณกรดแลกติก

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.851	3	2.950	351.584	.000
Within Groups	.067	8	.008		
Total	8.918	11			

DATA

Duncan

ความเข้มข้นของโซเดียมแอลจินेट	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
โซเดียมแอลจินेटร้อยละ 4	3	3.4500		
โซเดียมแอลจินेटร้อยละ 3	3		4.4333	
โซเดียมแอลจินेटร้อยละ 2	3			5.4800
โซเดียมแอลจินेटร้อยละ 1	3			5.5433
Sig.		1.000	1.000	.422

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

3. ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

3.1 ผลการศึกษาปริมาณของเวย์ที่ใช้เป็นขั้วสเตรตในการผลิตกรดแลกติก

ปริมาณกรดแลกติก

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37.482	5	7.496	301.461	.000
Within Groups	.298	12	.025		
Total	37.780	17			

DATA

Duncan

ปริมาณเวย์ (ร้อยละ)	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
50.00	3	2.4400					
60.00	3		4.3600				
70.00	3			4.8300			
100.00	3				5.5100		
80.00	3					6.4600	
90.00	3						6.7700
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก

ปริมาณกรดแลกติก

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.034	2	2.517	116.879	.000
Within Groups	.129	6	.022		
Total	5.163	8			

DATA

Duncan

อุณหภูมิ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
40 องศาเซลเซียส	3	4.9300		
35 องศาเซลเซียส	3		6.2500	
37 องศาเซลเซียส	3			6.6900
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ผลการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนตในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ปริมาณกรดแลกติก

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.330	4	2.082	115.817	.000
Within Groups	.180	10	.018		
Total	8.509	14			

DATA

Duncan

อัตราการกวน	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
200 รอบต่อนาที	3	6.2300			
0 รอบต่อนาที	3	6.4500	6.4500		
50 รอบต่อนาที	3		6.6100		
150 รอบต่อนาที	3			7.6200	
100 รอบต่อนาที	3				8.1600
Sig.		.072	.175	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5. ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับถึงหมักและพลาสติกขนาด 2 ลิตร

ปริมาณกรดแลกติก

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.157	2	2.079	106.353	.000
Within Groups	.117	6	.020		
Total	4.274	8			

DATA

Duncan

สถานะ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
พลาสติก สภาวะนิ่ง	3	6.5100		
ไม่ควบคุมพีเอช				
ถึงหมักกวน 100 รอบต่อนาที	3		7.1433	
ไม่ควบคุมพีเอช				
ถึงหมักกวน 100 รอบต่อนาที	3			8.1600
ควบคุมพีเอช 6.5				
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ผลได้กรรคแผลกตัก

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	2	.000	14.115	.005
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.001	8			

DATA

Duncan

สภาวะ	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
พลาสติก สภาวะนี้้ง ไม่ควบคุมพีเอช	3	.2100	
ถึงหมักกวน 100 รอบต่อนาที ไม่ควบคุมพีเอช	3	.2117	
ถึงหมักกวน 100 รอบต่อนาที ควบคุมพีเอช 6.5	3		.2260
Sig.		.633	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการผลิตกรดแลกติก

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.010	2	.005	797.658	.000
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.010	8			

DATA

Duncan

สภาวะ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
พลาสติก สภาวะนี้ ไม่ควบคุมพีเอช ถึงหมักกวน 100 รอบต่อนาที	3	.0903		
ไม่ควบคุมพีเอช ถึงหมักกวน 100 รอบต่อนาที	3		.1191	
ควบคุมพีเอช 6.5	3			.1700
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

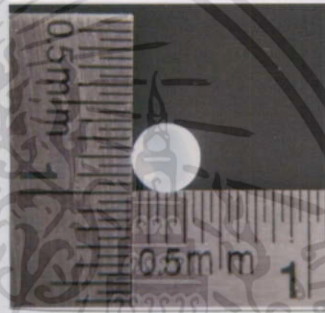
รูปเม็ดเจด

1. รูปแสดงระยะทางที่ใช้ในการตรึงเซลล์ระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

ระยะทาง 2 เซนติเมตร



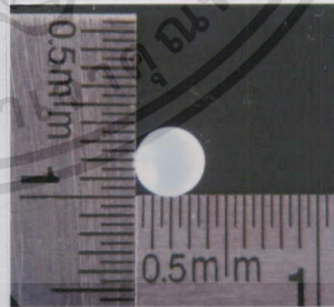
ระยะทาง 4 เซนติเมตร



ระยะทาง 6 เซนติเมตร



ระยะทาง 8 เซนติเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะทาง 10 เซนติเมตร



ระยะทาง 12 เซนติเมตร



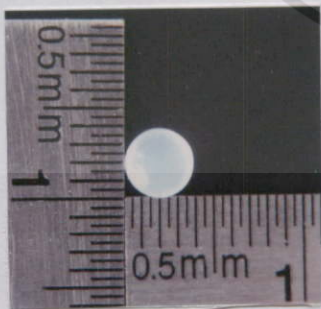
ระยะทาง 14 เซนติเมตร



ระยะทาง 15 เซนติเมตร



ระยะทาง 16 เซนติเมตร



ระยะทาง 18 เซนติเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะทาง 20 เซนติเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ — นามสกุล

นางสาวศิริประภา มั่นตรง

วันเดือนปีเกิด

22 มีนาคม 2527

ภูมิลำเนา

จ. ลำปาง

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชา
ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปีการศึกษา 2549



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้