การผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

LACTIC ACID PRODUCTION FROM WHEY BY *Lactobacillus casei* TISTR 1341

จงกมล จริยกุล
JONGKAMON JARIYAKUL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2550

KMITL-2007-SC-M-020-002

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

LACTIC ACID PRODUCTION FROM WHEY BY *Lactobacillus casei* TISTR 1341

จงกมล จริยกุล

JONGKAMON JARIYAKUL

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 74889
วัน,เดือน,ปี..... 15 ต.ค. 2550

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

KMITL – 2007 – SC – M – 020 - 002

LACTIC ACID PRODUCTION FROM WHEY BY *Lactobacillus casei* TISTR 1341

JONGKAMON JARIYAKUL

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

2007

KMITL – 2007 – SC – M – 020 - 002

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341
นักศึกษา	นางสาวจงกมล จริยกุล
รหัสประจำตัว	47063903
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกประกอบด้วยเวย์เติมสารสกัดยีสต์ ร้อยละ 0.5 เปปโตน ร้อยละ 1 แคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 2 และแหล่งแร่ธาตุ ซึ่งประกอบด้วย ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตรและแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.1 กรัมต่อลิตร สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกคือสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เมื่อทำการหมักในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 5.49 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 โดยมีผลผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.145 กรัมผลผลิตต่อกรัมสับสเตรทและอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.046 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและเมื่อทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดอัตรา 100 รอบต่อนาทีและควบคุมพีเอชที่ 6.5 พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด คือ 7.26 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 โดยมีผลผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.187 กรัมผลผลิตต่อกรัมสับสเตรทและอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.061 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Thesis Title	Lactic Acid Production From Whey by *Lactobacillus casei* TISTR 1341
Student	Miss Jongkamon Jariyakul
Student ID.	47063903
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2007
Thesis Advisor	Associate Professor Sukjai Choojun

ABSTRACT

Lactic cid production from whey by *Lactobacillus casei* TISTR 1341 was studied. It was found that whey supplemented with 0.5% yeast extract, 1% peptone, 2% $CaCO_3$ and mineral salt which contained 0.25 g/l K_2HPO_4, 0.03 g/l $MnSO_4$ and 0.1 g/l $MgSO_4$, was the optimum medium for lactic acid production. The condition was optimum for lactic acid production at stationary, 37 ^{o}C and pH 6.5. When lactic acid production in a flasks in 2 liters at stationary, 37 ^{o}C and pH 6.5. It was found that in the flask, the maximum lactic acid concentration was 5.49 g/l at 48 hours, Yield 0.145 $\Delta P/\Delta S$ and the lactic acid productivity was 0.046 g/l.h. Batch fermentation was conducted in 2 liters fermentor at 37 ^{o}C the controlled agitation of 100 rpm and pH 6.5, which was able to produce maximum lactic acid concentration was 7.26 g/l at 48 hours, Yield 0.187 $\Delta P/\Delta S$ and the lactic acid productivity was 0.061 g/l.h.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ ประธานคณะกรรมการ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายในภาควิชา รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาควิชาและรศ. สุขใจ ชูจันทร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ บริษัท Minor Cheese Limited สำหรับความอนุเคราะห์เวย์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำสั่งสอนตลอดจนเป็นที่ปรึกษาที่ดีมาโดยตลอดและขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณมารดาที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมการศึกษาของข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมาและขอขอบคุณพี่น้องและเพื่อนๆ ที่ได้ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดจนผู้ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ที่ได้มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

จงกมล จริยกุล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญรูป.....X

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ความสำคัญของกรดแลกติก.....4

2.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของกรดแลกติก.....5

2.1.2 กระบวนการผลิตกรดแลกติก.....7

2.1.3 การนำกรดแลกติกมาประยุกต์ใช้.....10

2.2 เวย์(Whey).....11

2.2.1 ประเภทของเวย์.....11

2.2.2 องค์ประกอบหลักทางเคมีของเวย์.....12

2.2.3 การใช้ประโยชน์จากเวย์..... 13

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก.....17

2.3.1. โฮโมแลกติกเฟอเมนเตทีฟ (Homolactic fermentative).....18

2.3.2. เฮทเทอโรแลกติกเฟอร์เมนเตทีฟ (Heterolactic fermentative).....20

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก.....28

2.4.1 แหล่งคาร์บอน.....28

2.4.2 แหล่งไนโตรเจน.....30

2.4.3 แหล่งแร่ธาตุ.....31

2.4.4 อุณหภูมิ..... 32

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.5 ค่าความเป็นกรดด่าง (พีเอช).....32
2.4.6 การให้อากาศ.....33
2.4.7 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนต.....35

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....36
3.1 อุปกรณ์.....36
3.2 สารเคมี.....37
3.3 วัตถุดิบ.....37
3.3.1 การเก็บวัตถุดิบ.....37
3.3.2 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ.....37
3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย.....37
3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย.....37
3.4.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น.....38
3.5 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ.....38
3.6 การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก.....39
3.6.1 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม.....39
3.6.2 การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม.....40
3.6.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม.....41
3.6.4 การศึกษาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม.....41
3.7 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ
Lactobacillus casei TISTR 1341.....42
3.7.1 การผลิตกรดแลกติกระดับฟลาสก์.....42
3.7.2 การผลิตกรดโดยใช้ถังหมัก 2 ลิตร.....43

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์.....44
4.1 ผลการวิเคราะห์การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ.....44
4.2 ผลการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก.....47
4.2.1 ผลการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม.....47

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.2 ผลการศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม....50
4.2.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม....53
4.2.4 ผลการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)ที่เหมาะสม....55
4.3 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร
และการผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตร....58

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ....60

บรรณานุกรม....61

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี....67
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์....69
ภาคผนวก ค วิธีคำนวณค่าจลนพลศาสตร์....73
ภาคผนวก ง ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ....74

ประวัติผู้เขียน....97

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก.....5

2.2 องค์ประกอบโดยประมาณของสวีทเวย์และแอซิดเวย์.....11

2.3 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในนม เคซีน และเวย์.....13

2.4 องค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์.....13

2.5 แสดงลักษณะความแตกต่างของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย.....22

2.6 ลักษณะและความแตกต่างของ *Lactobacillus* sp.ทั้ง 3 กลุ่ม.....23

4.1 ผลของปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอช
ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR TISTR 1341
ที่เลี้ยงในอาหาร 9 สูตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 45

4.2 ผลของปริมาณกรดแลกติกน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)
และค่าพีเอชของชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน.....48

4.3 ผลของปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)
และค่าพีเอชที่สภาวะนิ่งและที่ความเร็วรอบต่างๆ.....51

4.4 ผลของปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)
และค่าพีเอชที่อุณหภูมิต่างๆ.....53

4.5 ผลของปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)
และค่าพีเอชของปริมาณความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนต($CaCO_3$) 55

4.6 ผลของปริมาณกรดแลกติก ผลผลิต อัตราการผลิต
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปในการศึกษาการผลิตกรดแลกติก
โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและถังหมัก
ขนาด 2 ลิตร.....58

ง - 1ผลปริมาณกรดแลกติกในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 9 สูตร
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341.....74

ง-2 ผลน้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 9 สูตร
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341.....75

ง-3 ผลปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)ในการศึกษาเปรียบเทียบ
องค์ประกอบของอาหาร 9 สูตร โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341.....76

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ง-4 ผลพีเอชในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 9 สูตร
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 77

ง-5 ผลปริมาณกรดแลกติกในการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและ
ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 78

ง-6 ผลน้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและ
ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 79

ง-7 ผลปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)ในการศึกษาเปรียบเทียบ
ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 80

ง-8 ผลพีเอชในการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 81

ง-9 ผลปริมาณกรดแลกติกในการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะนิ่งและความเร็วรอบ
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 82

ง-10 ผลน้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะนิ่งและความเร็วรอบ
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 83

ง-11 ผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)ในการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะนิ่งและความเร็วรอบ
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 84

ง-12 ผลพีเอชในการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะนิ่งและความเร็วรอบ
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 85

ง-13 ผลปริมาณกรดแลกติกในการศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิ
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่สภาวะนิ่ง 86

ง-14 ผลน้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิ
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่สภาวะนิ่ง 87

ง-15 ผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)ในการศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิ
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่สภาวะนิ่ง 88

ง-16 ผลพีเอชในการศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิ
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่สภาวะนิ่ง 89

ง-17 ผลปริมาณกรดแลกติกในการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง 90

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ง -18 ผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)ในการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง 91

ง-19 ผลพีเอชในการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต
โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง 92

ง-20 ผล p-value การเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักและ
ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T- test..... 93

ง- 21 ผล p-value การเปรียบเทียบผลผลิต (กรัมผลผลิตต่อกรัมสับสเตรท)โดยใช้ถังหมัก
และฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T- test.....94

ง- 22 ผล p-value การเปรียบเทียบอัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)โดยใช้ถังหมัก
และฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T- test.....95

ง-23 ผล p-value การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) โดยใช้ถังหมัก
และฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T- test.....96

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของ L (+) lactic acid และ D (-) lactic acid 5

2.2 พอลิแลกติกแอซิด....6

2.3 ไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลกติก....6

2.4 เทคโนโลยีการผลิตกรดแลกติกและการนำมาประยุกต์ใช้....10

2.5 สูตรโครงสร้างแสดงน้ำตาลแลคโตสที่ถูกไฮโดรไลส์ 12

2.6 Whey permeate....14

2.7 ความเป็นไปได้ที่จะนำเวย์มาใช้ประโยชน์....16

2.8 กลไกการเกิดกรดแลกติกด้วยวิถีไกลโคไลซิสโดยแลกติกแอซิด
กลุ่มโฮโมแลกติกเฟอเมนเตชั่น (Homolactic fermentation)....19

2.9 กลไกการเกิดกรดแลกติกโดยแลกติกแอซิดกลุ่ม heterolactic fermentative....20

2.10 วิถี Embden – Meyerhof- Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของ
กลุ่มobligately homofermentative lactobacilli....24

2.11 วิถี Embden – Meyerhof- Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของ
กลุ่ม facultatively heterofermentative lactobacilli....25

2.12 วิถีฟอสโฟกลูโคเนตในการผลิตกรดแลกติกของ
กลุ่ม obligately heterofermentative lactobacilli....26

2.13 *Lactobacillus casei* ขนาด 2 ไมครอน โดยกล้องจุลทรรศน์ส่องผ่าน....27

4.1 ผลของอาหาร 9 สูตร ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก
(ก) ปริมาณกรดแลกติก (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง
(ค)ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (ง) และค่าพีเอช
ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ชั่วโมง ที่
6, 12, 24, 48, 54, 72, 96 และ 120 ตามลำดับ....46

4.2 ผลของชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก
(ก) ปริมาณกรดแลกติก (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)
(ง) และค่าพีเอช ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341
ชั่วโมง ที่ 6, 12, 24, 48, 54, 72, 96 และ 120 ตามลำดับ....49

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.3 ผลของสภาวะนิ่งและความเร็ว 50, 70, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ที่เหมาะสม ต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก (ก) ปริมาณกรดแลกติก (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (ง) และค่าพีเอช ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ชั่วโมง ที่ 6, 12, 24, 48, 54, 72, 96 และ 120 ตามลำดับ.....52

4.4 ผลของอุณหภูมิห้อง 35, 37, 40 และ 42 ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก (ก) ปริมาณกรดแลกติก (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (ง) และค่าพีเอช ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ชั่วโมง ที่ 6, 12, 24, 48, 54, 72, 96 และ 120 ตามลำดับ.....54

4.5 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก (ก) ปริมาณกรดแลกติก (ข) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (ค) และค่าพีเอชของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ชั่วโมง ที่ 6, 12, 24, 48, 54, 72, 96 และ 120 ตามลำดับ..... 57

4.6 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและการผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตร ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341.....59

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดแลกติกหรือกรดนมเป็นกรดอินทรีย์ที่พบตามธรรมชาติในนมเปรี้ยว ผักดองชนิดต่างๆ และเนยแข็ง เป็นต้น (Gardner. 1972) นิยมใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารที่มีความจำเป็นต่อวงการอุตสาหกรรมอาหารมากเพราะกรดแลกติกที่เติมลงไปในอาหารนั้นจะเป็นตัวที่ช่วยเพิ่มกลิ่นและรสของอาหาร ช่วยควบคุมความเป็นกรดด่าง ยืดอายุการเก็บของอาหาร ช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์และการงอกของสปอร์ ช่วยเสริมประสิทธิภาพของสารป้องกันการหืนและช่วยปรับปรุงลักษณะเนื้อของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เป็นต้น (ศิวาพร.2546) กรดแลกติกยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องหนัง เวชภัณฑ์ โลชั่น อุตสาหกรรมการทำพลาสติกในรูปของพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics) (Fitzpatrick. 2003)

กรดแลกติกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการทางเคมีเป็นวิธีที่ใช้ค่าใช้จ่ายสูงและมีความยุ่งยากในช่วงการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากผลผลิตที่ได้จากกระบวนการทางเคมีจะเป็นกรดแลกติกผสม (DL – Lactic) ส่วนการผลิตกรดแลกติกทางชีวภาพเป็นการนำจุลินทรีย์มาหมักกับสารตั้งต้นซึ่งผลผลิตที่ได้จะอยู่ในรูป D – Lactic หรือ L – Lactic ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ (Kadam *et al.*. 2006) นอกจากนี้สารตั้งต้นที่จุลินทรีย์ใช้นั้นสามารถนำวัสดุเหลือทิ้งหรือผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โมลาส เวย์ มาใช้แทนได้ จึงได้มีการศึกษาหาวิธีที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณมากและเสียค่าใช้จ่ายในการลงทุนที่ต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะและองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม (Senthuran *et al.*.1999)

การนำผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมมาเพิ่มมูลค่าเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นการลดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมและลดต้นทุนการผลิตเพราะมีราคาถูกหรือไม่มีมูลค่า เช่น เวย์ โมลาส เป็นต้น ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาลซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติก พบว่าโรงงานอุตสาหกรรมเนยแข็งได้ผลิตผลพลอยได้ออกมา คือ เวย์ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมแต่เวย์มีประโยชน์เพราะในเวย์ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส น้ำ โปรตีนที่ละลายได้ วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ (Roukas.1997) เหมาะแก่การนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติก จึงได้มีการศึกษาการนำเวย์มาใช้ในการผลิตกรดแลกติก เช่น

การนำเวย์มาผลิตกรดแลกติกโดยวิธีเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Roukas and Kotzckidou.1998) การนำมาผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการเลี้ยงแบบกะ (Fitzpatrick *et al*..2001)

ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการนำเวย์ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้มาใช้ให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าเพิ่มโดยการผลิตกรดแลกติกอาจช่วยลดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมได้ รวมถึงการศึกษาเพื่อปรับปรุงส่วนประกอบของอาหารและกระบวนการผลิตกรดแลกติกให้ได้ผลผลิตกรดแลกติกสูงขึ้นอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเวย์ในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

1.2.2.1 ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

1.2.2.2 ศึกษาความเร็วรอบและอุณหภูมิที่เหมาะสม

1.2.2.3 ศึกษาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

1.2.3 ศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในระดับ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก ได้แก่ ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ความเร็วรอบ อุณหภูมิและปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรเปรียบเทียบกับการผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตรและวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลแลกโตสในเวย์ก่อนและหลังทำการหมัก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตกรดแลกติกจากเวย์ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็ง

1.4.2 ทราบถึงสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341

1.4.3 เป็นการนำเวย์ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็งมาใช้ประโยชน์รวมทั้งเพิ่มมูลค่าและลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม

1.4.4 เป็นการนำเวย์มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติกเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.4.5 ทำให้ทราบถึงศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ทำการศึกษา

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของกรดแลกติก (lactic acid)

กรดแลกติก หรือกรดนมได้มีการค้นพบครั้งแรกโดย Scheele นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดน ในปี ค.ศ. 1780 ในนมเปรี้ยว และได้ตั้งชื่อว่า Mjolksyra เป็นกรดชนิดแรกๆ ที่มีการนำมาใช้ในอาหารพบตามธรรมชาติในนมเปรี้ยว กะหล่ำปลี ผักดองชนิดต่างๆ เบียร์และเนยแข็ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในเลือดและกล้ามเนื้อของสัตว์ด้วย (Gardner.1972)

กรดแลกติกมีคุณสมบัติดูดความชื้นได้ง่ายอาจอยู่ในรูปเป็นผลึกหรือของเหลวข้น ไม่มีสี มีกลิ่นครีมอ่อนๆ ละลายน้ำได้ดี ให้รสเปรี้ยวปานกลาง ในอุตสาหกรรมอาหารจะมีการใช้กรดแลกติกเป็นสารที่ช่วยเพิ่มความเป็นกรด เป็นวัตถุกันเสีย เป็นส่วนผสมของสารที่ใช้ในการหมักเนื้อ เป็นสารให้กลิ่นรส เป็นสารช่วยเน้นกลิ่นรส ช่วยควบคุมความเป็นกรด – ด่าง และเป็นตัวทำละลาย เป็นต้น (FDA.1988) ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้กรดแลกติก ได้แก่ แยม เยลลี เชอร์เบต ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน และเครื่องดื่มชนิดต่างๆ ซอส และผักดอง เป็นต้น โดยอาจจะใช้กรดแลกติกเพียงชนิดเดียวหรือรวมกับกรดชนิดอื่นๆ (ศิวาพร.2546)

สำหรับแคลเซียมแลกเตต มีการใช้ในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพ็กติน ทำให้ผักและผลไม้มีความคงตัวมากขึ้น ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสีและกลิ่นรสของผักและผลไม้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป โดยการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะที่ปนเปื้อนมา ช่วยทำให้เกิดเจลดีขึ้นในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ช่วยปรับปรุงคุณภาพของนมผงนมข้น (Hansen.1951) และสำหรับแคลเซียมแลกเตตนี้ นอกจากจะใช้เพื่อวัตถุประสงค์ที่กล่าวข้างต้นแล้ว ยังใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมสำหรับผู้ป่วยที่ขาดแคลเซียมด้วย โดยอาจจะเสริมในนมหรือน้ำผลไม้ หรืออาหารอื่น หรือจะบริโภคในรูปแคลเซียมแลกเตตเลย ส่วนผู้ขาดเหล็ก สังกะสี และแมกนีเซียม ก็สามารถบริโภคอาหารที่มีการเสริมด้วยเฟอรัสแลกเตต (ferrous lactate) ซิงค์แลกเตต(zinc lactate) และแมกนีเซียมแลกเตต (magnesium lactate) สำหรับในผลิตภัณฑ์ปลา เนื้อและสัตว์ปีก มีการใช้แลกติกหรือเกลือแลกเตตช่วยในการยืดอายุการเก็บด้วย (Dailey *et al*..2000)

อนุพันธ์ของกรดแลกติก เช่น แลกทีเลตเตตโมโนและไดกลีเซอร์ไรด์ของกรดไขมัน (lactylated mono – and diglycerides of fatty acids) มีการนิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ โดยเฉพาะในแป้งเค้กสำเร็จรูปและเนยขาว เป็นต้น ส่วนแคลเซียมสเตียริล –2 – แลกทีเลต (calcium stearyl – 2 – lactylate) นิยมใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์ขนมปัง (FDA.1988)

2.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของกรดแลกติก

คุณสมบัติทางกายภาพ

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

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

ที่มา :Narayanan *et. al.* (2004)

คุณสมบัติทางเคมี

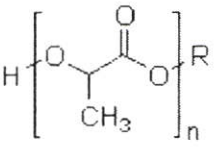
กรดแลกติกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid สูตรโมเลกุล $C_3H_6O_3$ กรดแลกติกมี 2 ไอโซเมอร์ ดังรูปที่ 2.1

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

ที่มา : Narayanan *et. al.* (2004)

การเปลี่ยนรูปของ L(+) lactic acid และ D(-) lactic acid เกิดจากการหมุนของเอทิลีนออกไซด์บริจด์ (ethylene oxide bridge) ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่หนึ่งและอะตอมที่สองโดยเกิด tautomeric shift ของไฮดรอกซิลกรุ๊ป (hydroxy group) บนคาร์บอนอะตอมที่สองไปเป็นคาร์บอนนิลกรุ๊ป (carbonyl group) ของคาร์บอกซิล (carboxyl) กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสี กรดแลกติกสามารถละลายน้ำ เอทานอล อะซีโตน อีเทอร์ และไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์ และคาร์บอนซัลไฟด์ (Narayanan *et. al*..2004)

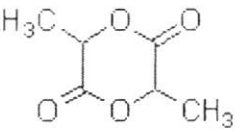
กรดแลกติกมารวมกันหลาย ๆ โมเลกุล ทำให้เกิดพอลิแลกติกแอซิด ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 พอลิแลกติกแอซิด

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

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



รูปที่ 2.3 ไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลกติก

ที่มา : Sodergard and Stolt. (2002)

กรดแลกติกที่สิ่งมีชีวิตผลิตได้จะมีปริมาณความเข้มข้นต่ำ โดยกรดแลกติกความเข้มข้นสูงเป็นอันตรายต่อร่างกายทั้งภายนอกและภายใน เมื่อกรดสัมผัสกับผิวหนังจะเหมือนถูกไฟลวก เมื่อกรดถูกดวงตาสามารถทำให้ตาบอดได้ ในกรณีที่กรดถูกดวงตาหรือผิวหนังควรล้างออกด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง

2.1.2 กระบวนการผลิตกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี แบ่งได้ 4 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 นำ hydrogen cyanide ทำปฏิกิริยากับ acetaldehyde ได้ lactonitrile ทำปฏิกิริยาที่ความดันบรรยากาศ ดังสมการที่ 2.1

$$\underset{\text{acetaldehyde}}{CH_3CHO} + \underset{\text{hydrogen cyanide}}{HCN} \xrightarrow{\text{catalyst}} \underset{\text{lactonitrile}}{CH_3CHOHCN} \qquad (2.1)$$

ขั้นตอนที่2 นำ lactonitrile มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟิวริกจะได้กรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียมซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง ดังสมการที่ 2.2

$$\underset{\text{Lactonitrile}}{CH_3CHOHCN} + H_2O + \underset{\text{sulphuric acid}}{1/2H_2SO_4} \longrightarrow \underset{\text{lactic acid}}{CH_3CHOHCOOH} + \underset{\text{ammonium salt}}{1/2(NH_4)_2SO_4} \qquad (2.2)$$

ขั้นตอนที่3 นำกรดแลกติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ คือ เมทิลแลกเตต นำเมทิลแลกเตตมากลั่นและย่อยจะได้กรดแลกติก ส่วนเมทานอล hydrogen cyanide และสารปนเปื้อนอื่นๆ จะถูกกำจัดออกโดยนำมาผ่านถ่านกัมมันต์ และการทำ ion exchange ดังสมการที่ 2.3 และ 2.4

$$\underset{\text{Lactic acid}}{CH_3CHOHCOOH} + \underset{\text{methanol}}{CH_3OH} \longrightarrow \underset{\text{methyl lactate}}{CH_3CHOHCOOCH_3} + H_2O \qquad (2.3)$$

$$\underset{\text{Methyl lactate}}{CH_3CHOHCOOCH_3} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{lactic acid}}{CH_3CHOHCOOH} + \underset{\text{methanol}}{CH_3OH} \qquad (2.4)$$

ที่มา : Narayanan *et. al.* (2004)

การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกมี 2 ชนิด คือ โฮโมแลกติกแบคทีเรียและเฮทเทอโรแลกติกแบคทีเรีย ซึ่งขั้นตอนในการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงดังสมการที่ 2.5 และ 2.6 (Muller. 2001)

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

Glucose lactic acid

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + C_2H_5OH + CO_2$ (2.6)

Glucose lactic acid ethanol carbon dioxide

ที่มา : Muller (2001)

นอกจากนี้กรดแลกติกยังสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นและฟังไจ ซึ่งสามารถหมักได้แบบกะ กึ่งกะและแบบต่อเนื่อง ปัจจัยที่สำคัญในการผลิตคือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ พีเอช อุณหภูมิ การให้อากาศ (Anders and Mikael . 2002)

ปนัดดาและคณะ(2545)ศึกษาการหมักกรดแลกติกด้วย *Pediococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. ในอาหาร MRS น้ำสับปะรดและนมพร่องมันเนย พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติกในอาหาร MRS สูงกว่าการเจริญในอาหารน้ำสับปะรดและนมพร่องมันเนย โดยปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus* sp. ในอาหาร MRS มีปริมาณสูงสุด 9.2 กรัมต่อลิตร ในอาหารน้ำสับปะรดและในนมพร่องมันเนยมีปริมาณ 7.6 และ 7.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับกรดแลกติกที่ผลิตได้จากเชื้อ *Pediococcus* sp.ในอาหารทั้ง 3 ชนิด พบว่าอาหาร MRS อาหารน้ำสับปะรด อาหารนมพร่องมันเนยมีปริมาณกรดแลกติก 11.8 11.1 และ 11.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Roukas and Kotzckidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactococcus lactis* พบว่าการหมักแบบกะโดยเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ *Lactobacillus casei* ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 30 กรัมต่อลิตร *Lactococcus lactis* ให้ปริมาณกรด 25 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงแบบเซลล์ผสมปริมาณกรดแลกติกจะสูงถึง 45 กรัมต่อลิตร

Pauli and Fitzpatrick (2002) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมและมีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งไนโตรเจนสังเคราะห์ที่มีราคาแพง โดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดยีสต์และสารสกัดจากมอลต์ลงไป แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตมอลต์เปรียบเทียบกับสารสกัดยีสต์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้ให้ผลผลิตเทียบเท่ากับสารสกัดยีสต์แต่มีข้อเสียคือเมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิต ผลผลิตที่ได้จะไม่มีความบริสุทธิ์และต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการที่ทำให้ผลผลิตมีความบริสุทธิ์

Yun *et al.* (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส กาแลกโตส แลคโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์และแป้ง โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงเมื่อใช้กลูโคส ฟรุกโตสและมอลโตส เป็นสารตั้งต้น

Bulet *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ได้แก่ ซูโครส กลูโคส โมลาส ฝักถั่วและรำข้าวสาลี โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น

Wee *et al.* (2004) ได้นำโมลาสซึ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 95.7 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 94.9

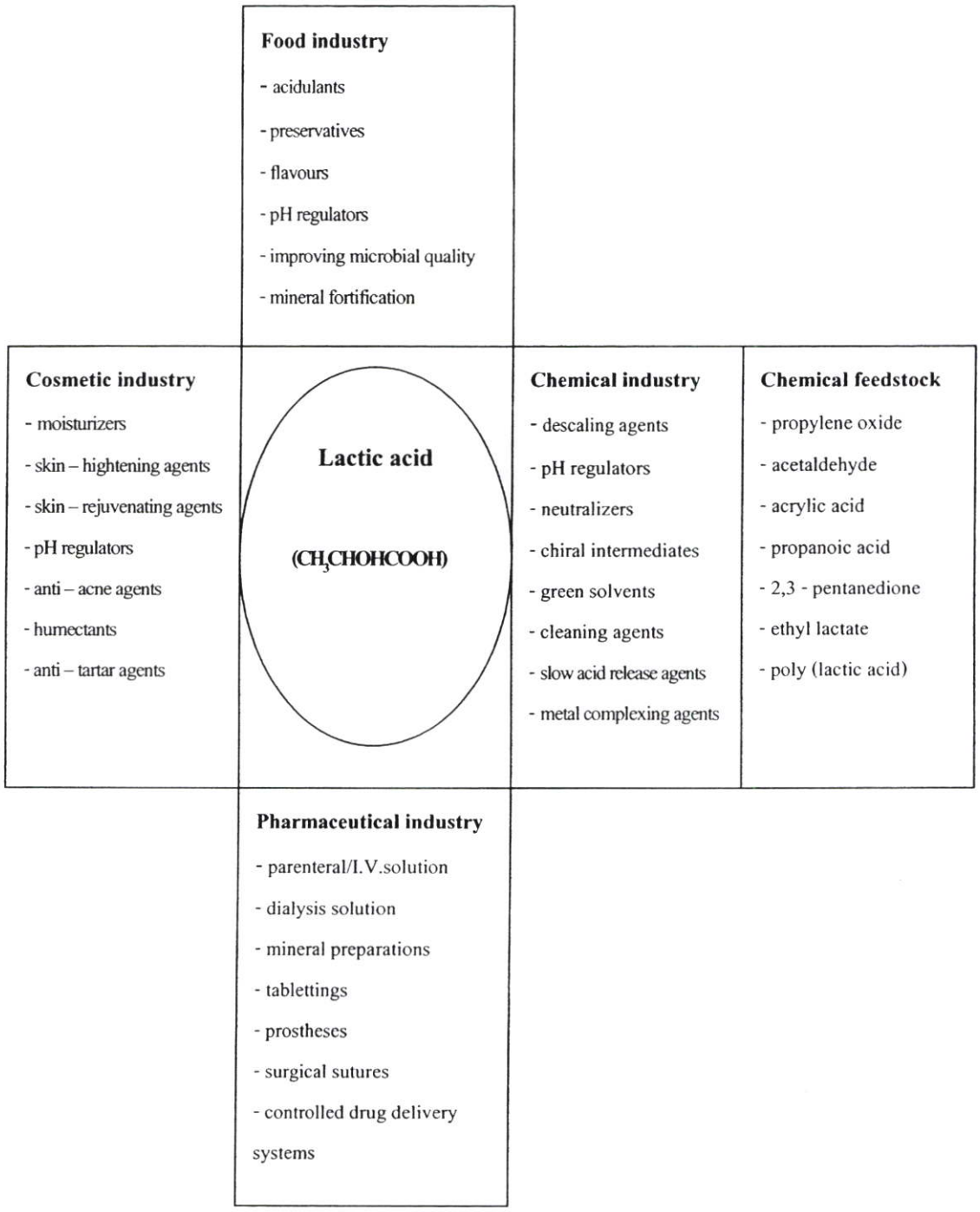
Huang *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่สูงประมาณ 0.85 – 0.92 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น

Oh *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลีและข้าวโพด โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY1 พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงเท่ากัน

Wee *et al.* (2006) ทดลองศึกษาผลิตกรดแลกติกระดับนำร่อง (Pilot – scale) โดยเชื้อ *Lactobacillus* sp. RKY2 ด้วยถังหมักขนาด 2.5 30 และ 300 ลิตร พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะให้ปริมาณสูงเท่าๆ กัน

Xu *et al.* (2006) ทดลองศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก soybean stalk hydrolysate โดยเชื้อ *Lactobacillus sake* และ *Lactobacillus casei* พบว่าการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus sake* สามารถผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 48 สำหรับ *Lactobacillus casei* สามารถผลิตกรดแลกติกได้ถึงร้อยละ 56

2.1.3 การนำกรดแลกติกมาประยุกต์ใช้



รูปที่ 2.4 เทคโนโลยีการผลิตกรดแลกติกและการนำมาประยุกต์ใช้

ที่มา : Wee *et al.*(2006)

2.2 เวย์ (Whey)

เวย์เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็งหรือการแยกเคซีนจากนมสด (ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ. 2526) มีลักษณะเป็นของเหลวใสมีสีค่อนข้างเขียวอมเหลือง (Marshall. 1982) องค์ประกอบของเวย์โดยทั่วไปพบว่า มีปริมาณน้ำตาลแลคโตสอยู่ในปริมาณมากกว่าสารอาหารอื่น (Westerguard. 1983) คือ ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตสร้อยละ 4 - 5 โปรตีนร้อยละ 1 และเกลือแร่ร้อยละ 1 (Roukas and Kotzckidou. 1998)

2.2.1 ประเภทของเวย์

แบ่งเวย์ออกได้เป็น 2 ประเภท ตามความเป็นกรด (Titable acidity) ได้แก่

1. สวีทเวย์ (Sweet whey) เป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งชนิดแข็ง 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) เป็นผลิตผลพลอยได้จากการตกตะกอนนม โดยการเติมกรดหรือเกลือแร่ลงไปโดยตรงในการผลิตเนยแข็งชนิดอ่อน เช่น คอทเทจ (Cottage) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.40 – 0.60 และมีค่าพีเอชระหว่าง 4.0 – 5.0 (Kosikowski. 1977)

องค์ประกอบที่แตกต่างของเวย์ทั้งสองชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2 ซึ่งพบว่าสวีทเวย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างขององค์ประกอบเช่นเดียวกับแอซิดเวย์ โดยแลคติกแอซิดเวย์ (lactic acid whey) จะได้จากการผลิตคอทเทจชีส ส่วนไฮโดรคลอริก (hydrochloric) หรือซัลฟิวริกแอซิดเวย์ (sulphuric acid whey) ได้จากการผลิตเคซีน

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบโดยประมาณของสวีทเวย์และแอซิดเวย์

องค์ประกอบ (ร้อยละ)	สวีทเวย์		แอซิดเวย์	
	เชดดา	เกาดา	แลคติกแอซิดเวย์ (คอจเทจชีส)	ไฮโดรคลอริก/ซัลฟิวริก แอซิดเวย์(เคซีน)
ปริมาณของแข็ง	6.00	5.50	6.00	6.30
น้ำ	94.00	94.50	94.00	93.70
ไขมัน	0.06	0.05	0.05	0.05
โปรตีน	0.80	0.68	0.80	0.80
เถ้า(เกลือแร่)	0.50	0.45	0.67	0.80
น้ำตาลแลคโตส	4.49	4.18	3.63	4.50
กรดแลกติก	0.15	0.14	0.85	0.15

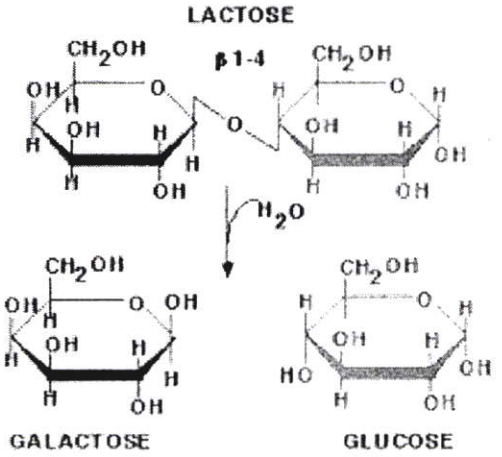
ที่มา : Nielsen and Ullum (1989)

2.2.2 องค์ประกอบหลักทางเคมีของเวย์

1.น้ำตาลแลคโตส

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

$$\underset{\text{แลคโตส}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + \underset{\text{น้ำ}}{H_2O} \longrightarrow \underset{\text{กลูโคส}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{กาแลคโตส}}{C_6H_{12}O_6} \qquad (2.7)$$



รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างแสดงน้ำตาลแลคโตสที่ถูกไฮโดรไลส์

ที่มา : www.ratjes.nl/ lactose.html

2.โปรตีน

โปรตีนในเวย์เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนในน้ำนมซึ่งเป็นโปรตีนตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางอาหารและมีกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง ดังแสดงในตารางที่ 2.3 โปรตีนในเวย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ เบตาแลคโตโกลบูลิน (Beta – lactoglobulin) และแอลฟาแลคทอลบูมิน (Alpha – lactalbumin) โดยเบตาแลคโตโกลบูลินจะมีอยู่ประมาณร้อยละ 50 – 60 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือเจือจาง สามารถตกตะกอนได้ด้วยเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) โปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในแง่การให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลว (วรรณา. 2532) ส่วนแอลฟาแลคทอลบูมินมีอยู่ประมาณร้อยละ 15 – 20 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนได้เมื่อถูกความร้อน ส่วนที่เหลือคือ ซีรัมอัลบูมิน อิมมูโนโกลบูลิน เอนไซม์ต่างๆ และโปรตีนอื่นๆ (Webb and Whitter . 1970) ความแตกต่างขององค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์แสดงไว้ในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.3 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในนม เคซีน และเวย์

กรดอะมิโน	องค์ประกอบ (กรัม/100 กรัมโปรตีน)		
	นม	เคซีน	เวย์
ทริปโตเฟน	1.4	1.4	2.1
ฟีนิลอะลานีน	5.2	5.1	3.8
ลิวซีน	10.4	10.4	11.1
ไอโซลิวซีน	6.4	5.7	6.8
ทรีโอนีน	5.1	4.6	8.0
เมทไทโอนีน	2.7	2.8	2.4
ไลซีน	8.3	8.3	9.9
วาลีน	6.8	6.8	6.8

ที่มา : Renner (1983)

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์

ชนิดของโปรตีนในเวย์	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโปรตีน	ค่าพีเอช	น้ำหนักโมเลกุลดาลตัน $x10^3$
แอลฟาแลคโตโกลบูลิน	3.0	50	5.3 – 5.5	18.3
เบตาแลคทอลบูลิน				
โปรติเอส เปปโตน	0.7	12	4.2 – 4.5	14
โบรวิน ซีรัม อัลบูมิน	1.4	23	-	4.1 – 4.8
อิมมูโนโกลบูลิน	0.3	5	5.1	69
แลคโตเฟอร์ริน	0.6	10	5.5 – 8.3	15 – 1000
แลคโตเพอร์ออกซิเดส	0.05	0.8	9.0	81 -84
	0.03	0.5	9.6	89

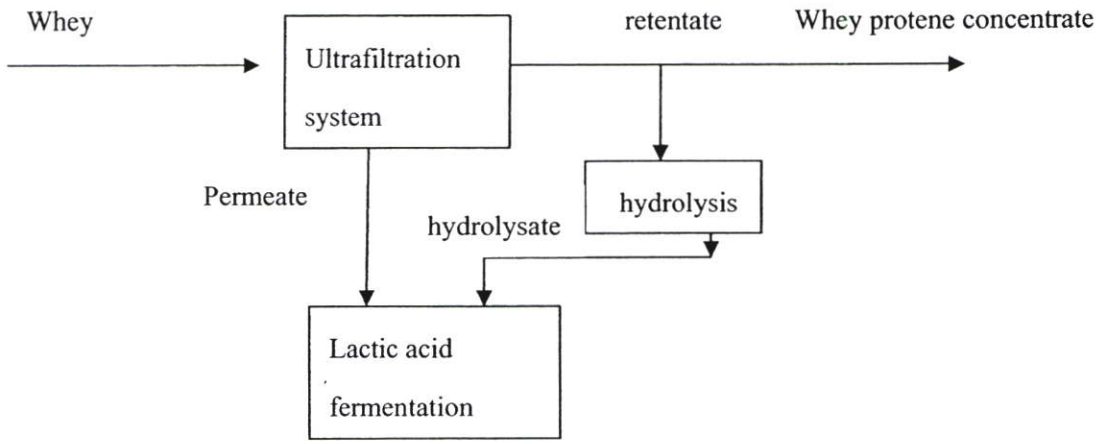
ที่มา : Marshall (1982)

2.2.3 การใช้ประโยชน์จากเวย์

เนื่องจากเวย์ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม นักวิจัยจึงได้ศึกษาหาทางนำเวย์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังมีรายงานการใช้ประโยชน์จากเวย์ดังนี้ (ชลัท.2534)

2.2.3.1 Whey permeate

Whey permeate เป็นผลิตผลพลอยได้จากการนำเวย์มาผลิตเป็นโปรตีนเวย์เข้มข้น มีแลคโตสและไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้เป็นส่วนประกอบหลัก จึงมีความสนใจในการนำ Whey permeate มาใช้แทนแหล่งคาร์บอนอื่นที่มีราคาแพงในการผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการทางชีวภาพ ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 Whey permeate

ที่มา : Fitzpatrick *et al.* (2001)

2.2.3.2 โปรตีนเวย์เข้มข้น

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่ละลายได้และโปรตีนที่ตกตะกอน มีวิธีการทำ คือ นำเวย์มาทำให้มีสภาพเป็นกลาง จากนั้นนำไประเหยจนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับร้อยละ 62 ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นแยกเพื่อเอาแลคโตสและเกลือแร่ออกมาให้เหลือแต่โปรตีนจากนั้นนำไปกรองจะได้เป็นโปรตีนเวย์เข้มข้นสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 5 เดือน นำไปใช้ในการผลิตอาหารเด็ก ผลิตภัณฑ์ขนมอบและไอศครีม (ชลัท. 2534)

2.2.3.3 ผลึกแลคโตส

เวย์ที่สามารถนำมาผลิตเป็นผลึกแลคโตสได้นั้นสามารถใช้ได้ทั้งเวย์สดและเวย์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกแล้ว ผลึกแลคโตสสามารถนำมาผลิตเป็นลูกกวาด ใช้เป็นสารขัดฟันในยาสีฟัน ใช้เป็นสารป้องกันการจับตัวเป็นก้อน(ชลัท. 2534)

2.2.3.4 การผลิตเนยแข็งจากเวย์

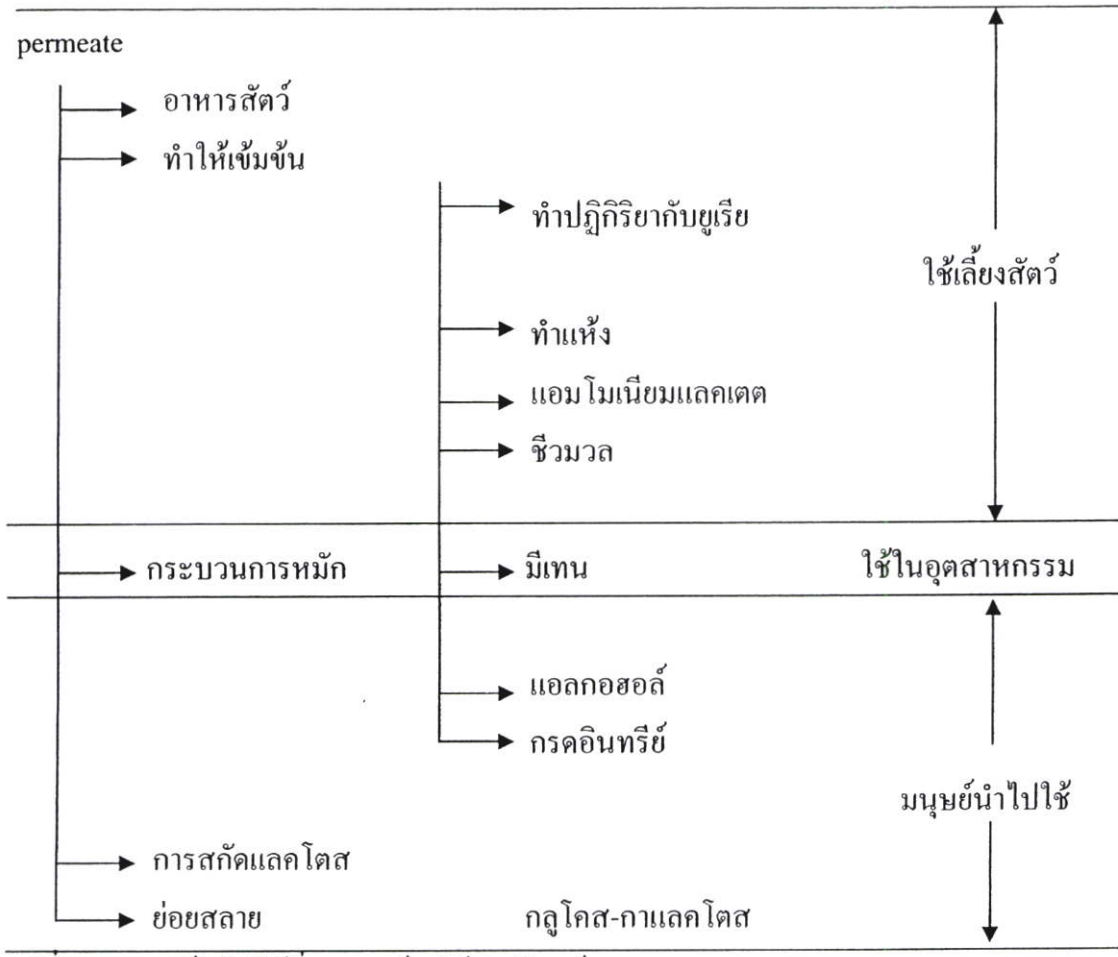
นำเวย์มาระเหยภายใต้สภาพสูญญากาศจนมีความเข้มข้นร้อยละ 80 แล้วจึงลดอุณหภูมิก่อนที่จะบรรจุพิมพ์ ตัวอย่างเนยแข็งจากเวย์ ได้แก่ ไมซอสท์ (Mysost) จีทอสท์ (Gjetost) พูลทอสท์ (Putost) สุพรีม (Supriam) เป็นต้น (ชลัท. 2534)

โดยทั่วไปเวย์จะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง ถ้าเปรียบเทียบค่า BOD ระหว่างน้ำเสียที่ปล่อยลงแม่น้ำลำคลอง ควรบำบัดน้ำจนมีค่า BOD เหลือประมาณ 20 แต่เวย์มีค่า BOD อยู่ในช่วง 4,000 – 4,800 ซึ่งเป็นอันตรายที่ค่อนข้างสูง (Scott. 1986) ดังนั้นถ้าไม่ลดการทำงานและ การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จะมีผลทำให้แลคโตสเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดแลคติกอย่างรวดเร็ว ทำให้ความเป็นกรดของเวย์สูงขึ้นและเกิดการเสื่อมเสียในที่สุด (ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ. 2526) ดังนั้นเพื่อคงรักษาคุณภาพของเวย์ (Alfa – Laval. 1987) ได้แนะนำวิธีเก็บรักษาไว้ 2 ทาง คือ ทางตรงและทางอ้อม

การเก็บรักษาทางตรงทำได้ 3 วิธีคือ การใช้ความเย็นที่อุณหภูมิ 0 – 5 องศาเซลเซียส วิธีนี้สามารถเก็บรักษาได้นาน 10 – 15 ชั่วโมง การใช้ความร้อนโดยวิธีพาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สามารถเก็บรักษาได้นานกว่า และวิธีสุดท้ายคือ การใช้สารเคมี ได้แก่ โซเดียมไบซัลเฟต หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การเก็บรักษาทางอ้อมสามารถทำได้โดยนำเวย์ผ่านกระบวนการอย่างใดอย่างหนึ่งที่เหมาะสม ได้แก่ การทำเป็นเวย์ผงหรือเวย์เข้มข้น

แผนผังแสดงความเป็นไปได้ในการนำเวย์มาใช้ประโยชน์แสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 ความเป็นไปได้ที่จะนำเวย์มาใช้ประโยชน์

ที่มา : Pedersen and Werner (1978)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาวิจัยที่นำเวย์มาใช้ประโยชน์อื่นๆ ดังนี้

วนปรัสต์ และคณะ (2545) ศึกษาการเจริญและการสร้างสารให้กลิ่นรสของแบคทีเรียแลกติกในเวย์ โดยทดลองเลี้ยงเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Lactobacillus casei* เพื่อศึกษาการเจริญ การสร้างกรดและการสร้างสารให้กลิ่นรส ในการเลี้ยงแต่ละคราวได้ใช้เชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวหรือใช้เชื้อผสม 2 หรือ 3 สายพันธุ์ พบว่าเวย์หมักด้วยหัวเชื้อผสมของ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ในปริมาณร้อยละ 9 หมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ให้กรดแลกติกร้อยละ 0.64 ซึ่งสูงกว่าในเวย์ที่หมักด้วยแลกติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวหรือเชื้อผสมอื่นๆ และกรดที่ได้นี้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่พบในนมเปรี้ยวทั่วไป ในการวิเคราะห์สารให้กลิ่นรสในเวย์ที่หมักด้วยเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละคราวด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี/แมสสเปกโตตเมตตรี (GC/MS) พบว่าสารหอมระเหยที่สร้างขึ้นมีรูปแบบเฉพาะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Bogdanova(1974)ได้ศึกษาการนำเวย์มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโดยการนำเวย์มาพาส เจอไรส์ที่อุณหภูมิ 95 – 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 35 – 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเอาเฉพาะส่วนใสมาเติมหัวเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และเติมเชื้อยีสต์ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 30 – 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง

Gurr *et al.* (1984)ได้ศึกษาการผลิตโยเกริต์โดยการนำเวย์ไปกรองแล้วนำส่วนใสมาผสมกับหางนมพาสเจอไรส์ บ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมทรีโอนีนปริมาณร้อยละ 0.1 และเติมสตาร์ตเตอร์ *Bifidobacterium bifidum* หรือ *Bifidobacterium longum* ปริมาณร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Arasaratna *et al.*(1996) นำเวย์มาผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้คือ 20 กรัมต่อลิตร ภายใน 120 ชั่วโมง

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

Roukas and Kotzekidou (1998) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactococcus lactis* พบว่าได้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 45 กรัมต่อลิตร

Fitzpatrick and O'Keeffe (2001) ศึกษาอิทธิพลของ whey protein hydrolysate (WPH) ที่เติมลงใน whey permeate พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่สูงและรวดเร็ว

Pauli and Fitzpatrick (2002) ได้ศึกษาการนำเวย์มาผลิตกรดแลกติกโดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มลงไป โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณสูงถึงร้อยละ 90

Fitzpatrick *et al.* (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei*

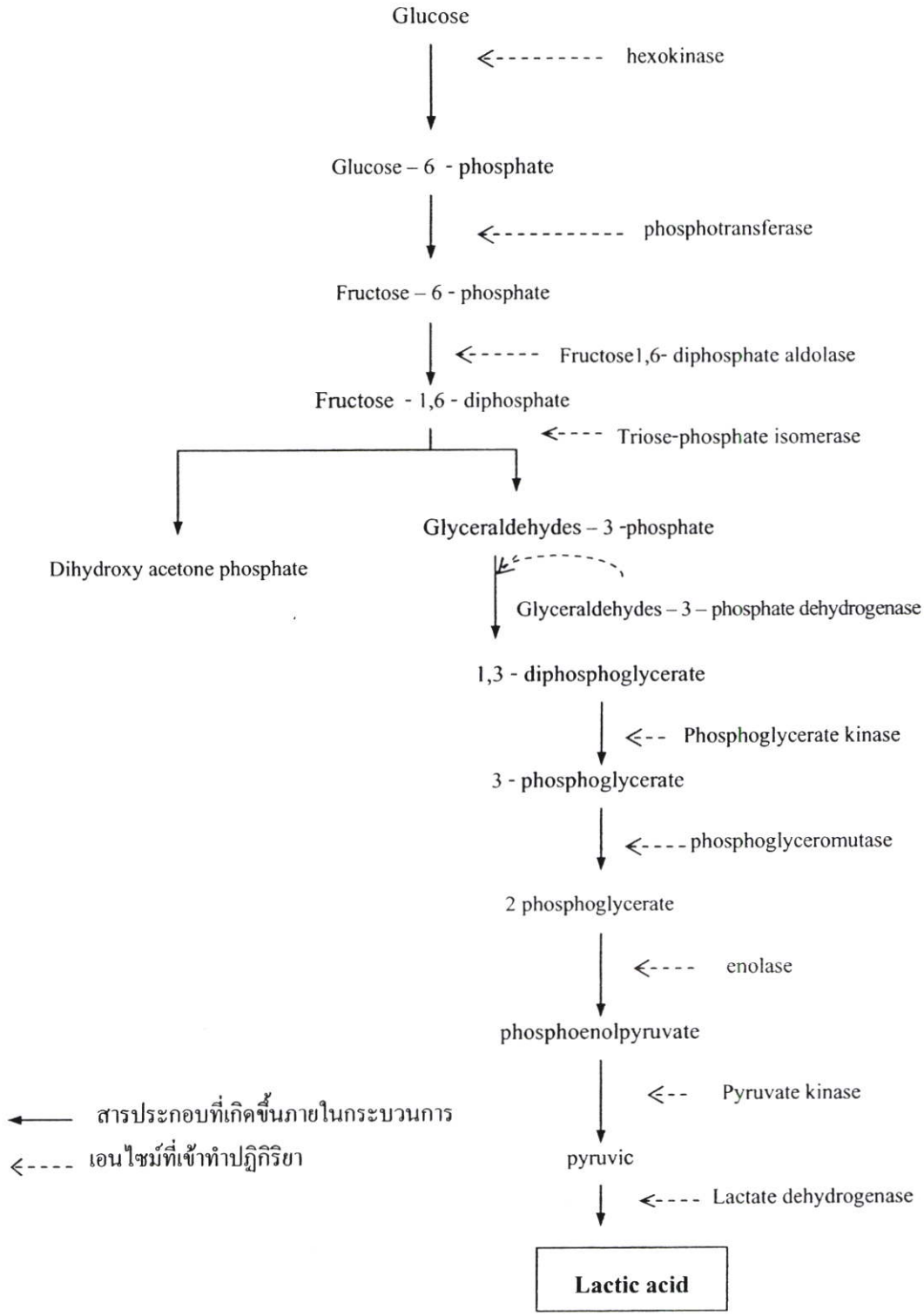
Kargi and Ozmihci (2006) ศึกษาการนำเวย์มาผลิตเอทธานอลโดยใช้เชื้อ *Kluyveromyces marxianus* NRRL – 1195 ในการผลิตใช้วิธีการหมักแบบกะ พบว่าสามารถให้เอทธานอลในปริมาณที่สูง ระหว่าง 0.35 – 0.54 กรัมเอทธานอลต่อน้ำตาล 1 กรัม

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก

แลกติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria ; LAB) จัดอยู่ใน แฟมิลี่ Lactobacillacea เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส ไม่มีไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนกรด มีทั้งลักษณะรูปร่างกลมและรูปร่างท่อน (Salminen.1998) ในการเจริญได้พลังงานจากระบวนการหมัก (fermentation) น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส มีความต้องการอาหารที่สมบูรณ์ (complex medium) ลักษณะที่สำคัญของแลกติกแอซิด

แบคทีเรียคือความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ซึ่งทำให้เกิดรสชาดที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผักดอง เนยแข็ง แลกติกแอซิดแบคทีเรียมีบทบาทในการหมักอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิดด้วยกัน เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผักและผลไม้ดอง ไส้กรอก เบียร์ ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ แลกติกแอซิดแบคทีเรียต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังต้องการวิตามินและเกลือแร่อีกหลายชนิดในการเจริญ ซึ่งความต้องการสารอาหารต่างๆ เหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ (Priest and Campbell . 1996) ในปี 1919 Orla – Jensen เป็นผู้เริ่มจัดอนุกรมวิธานแลกติกแอซิดแบคทีเรียอย่างเป็นระบบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสแบ่งได้ 2 ชนิด ดังนี้

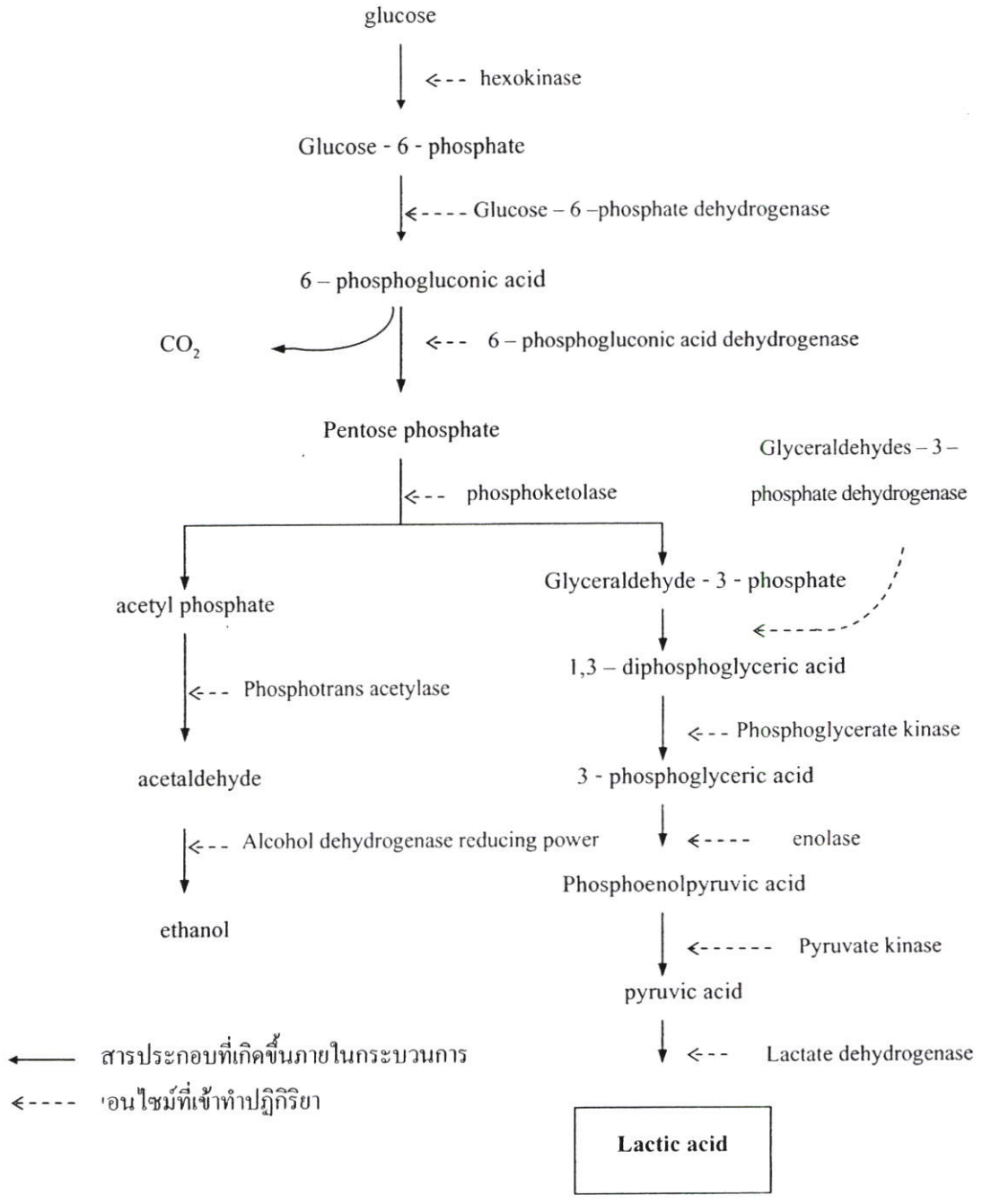
2.3.1. โฮโมแลกติกเฟอเมนเตทีฟ (Homolactic fermentative) เป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ โดยกลุ่มโฮโมเฟอเมนเตทีฟ (homofermentative) โดยกลไกการเกิดกรดแลกติกคือการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูวิกแอซิด (pyruvic acid) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ด้วยวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) แล้วเปลี่ยนไพรูวิกแอซิดเป็นแลกติกแอซิด ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 กลไกการเกิดกรดแลกติกด้วยวิถีไกลโคไลซิสโดยแลกติกแอซิด กลุ่มโฮโมแลกติกเฟอเมนเตทีฟ (Homolactic fermentative)

ที่มา : Salminen *et al.*(1998)

2.3.2. เฮทเทอโรแลกติกเฟอร์เมนเตทีฟ (Heterolactic fermentative) เป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลกติก เอทธานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือกรดอะซิติก กลไกการเกิดกรดแลกติกดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 กลไกการเกิดกรดแลกติกโดยแลกติกแอซิดกลุ่ม เฮทเทอโรแลกติกเฟอร์เมนเตทีฟ (Heterolactic fermentative)

ที่มา : Salminen *et al.* (1998)

ปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียออกเป็น 12 สกุล (Salminen.1998) ได้แก่ *Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Vagococcus, Aerococcus ,Pediococcus, Tetragenoccus, Leuconostoc, Oenococcus, Weissella, Lactobacillus* และ *Carnobacterium* ลักษณะและความแตกต่างของแต่ละสกุลแสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 แสดงลักษณะความแตกต่างของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

ลักษณะ	รูปร่างท่อน		รูปร่างกลม							
			Lactoc.		*Leucon.*					
	Carnob.	*Lactob.*	*Aeroc.*	*Enteroc.*	*Vagoc.*	*Oenoc.*	*Pedioc.*	*Streptoc.*	*Tetragenoc.*	*Weissella.*
เซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
ผลิต CO_2 จากกลูโคส	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
เจริญที่ 10 องศาเซลเซียส	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±
เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
เจริญที่พีเอช 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
เจริญที่พีเอช 9.6	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
ชนิดของกรดแลกติก	L	D,L,DL	L	L	L	L	D,DL	L	L	D,DL

ที่มา : Salminen *et al.* (1998)

แลกโตบาซิลัส (*Lactobacillus sp.*) เป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุดมีความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์ คุณสมบัติทางชีวเคมีและรูปร่างทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากความแตกต่างของโมเลกุลเปอร์เซนต์ G + C ภายในสกุลสูงระหว่าง 32 – 53 เปอร์เซ็นต์ สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 2 – 53 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิเจริญได้ดีและเหมาะสมคือที่ 30 – 40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5.5 – 6.2 หรืออาจเจริญได้ที่ พีเอช 5.0 หรือต่ำกว่านี้ได้ (Sneath *et al.*. 1984)

Lactobacillus sp. จัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Stiles and Holzapfel. 1997) ดังนี้ คือ

obligately homofermentative lactobacilli

facultatively heterofermentative lactobacilli

obligately heterofermentative lactobacilli

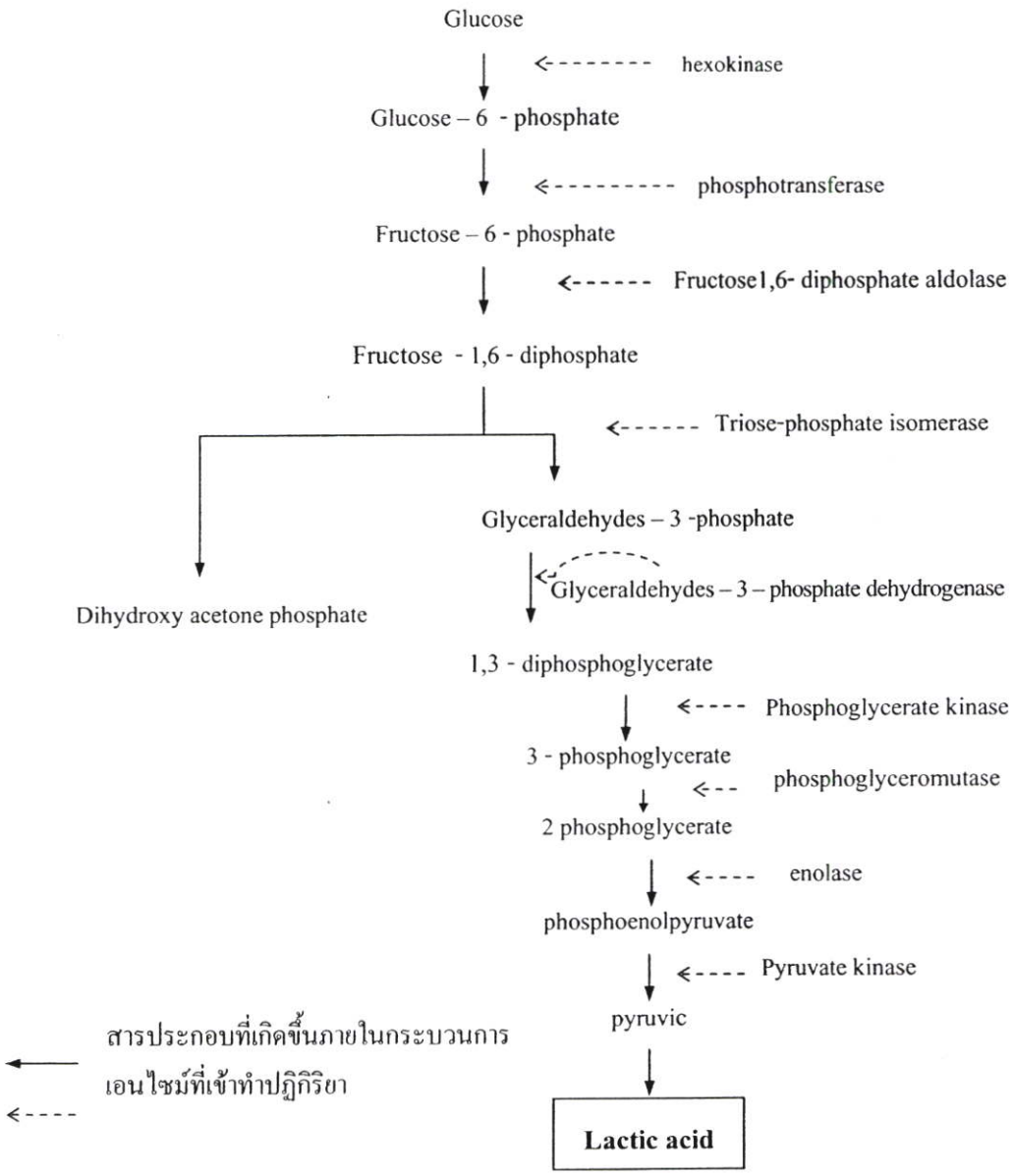
ลักษณะและความแตกต่างของแต่ละกลุ่ม แสดงดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ลักษณะและความแตกต่างของ *Lactobacillus* sp.ทั้ง 3 กลุ่ม

ลักษณะ	กลุ่ม I ,obligately homofermentative lactobacilli	กลุ่ม II,facultatively heterofermentative lactobacilli	กลุ่ม III,obligately heterofermentative lactobacilli
การหมักน้ำตาลเพนโตส	-	+	+
การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส	-	-	+
การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคเนต	-	+	+
เอนไซม์ FDP aldolase	+	+	-
เอนไซม์ Phosphoketolase	-	+	+
	Lb.acidophilus	*Lb.casei*	*Lb.brevis*
	Lb.delbruckii	*Lb.curvatus.*	*Lb.buchneri*
	Lb.helveticus	*Lb.plantarum*	*Lb.fermentum*

ที่มา : Salminen *et al.* (1998)

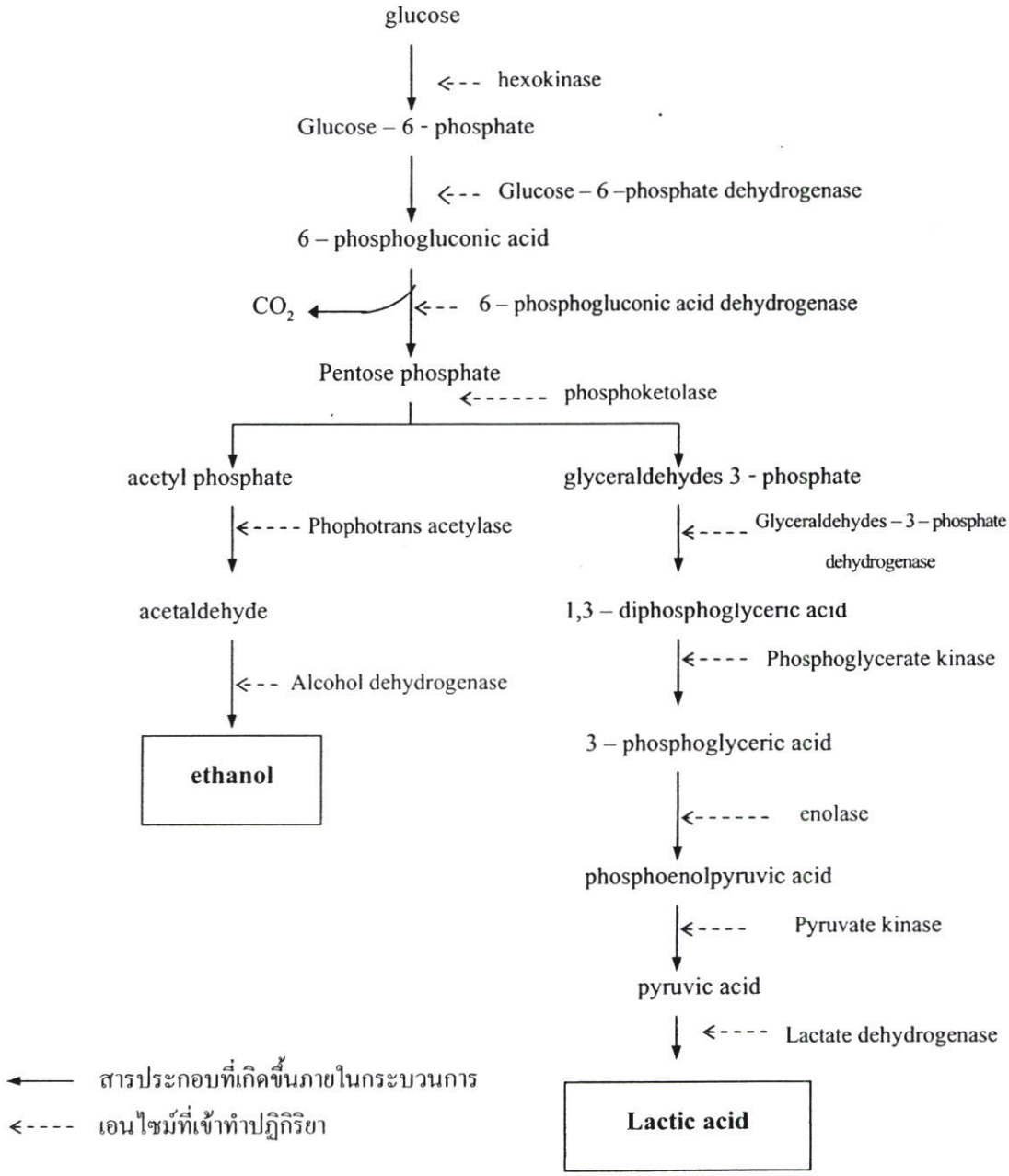
กลุ่ม I obligately homofermentative lactobacilli แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถหมักน้ำตาลเฮกโซส (มากกว่าร้อยละ 85) เป็นกรด แลกติกโดยวิถี Embden – Meyerhof- Parnas (EMP) สามารถผลิตเอนไซม์Fructose-1,6-bisphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase ดังนั้นจึงไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนตได้ (Wood and Holzapfel.1995) ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 วิถี Embden – Meyerhof- Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของกลุ่ม obligately homofermentative lactobacilli

ที่มา : Salminen *et al.*(1998)

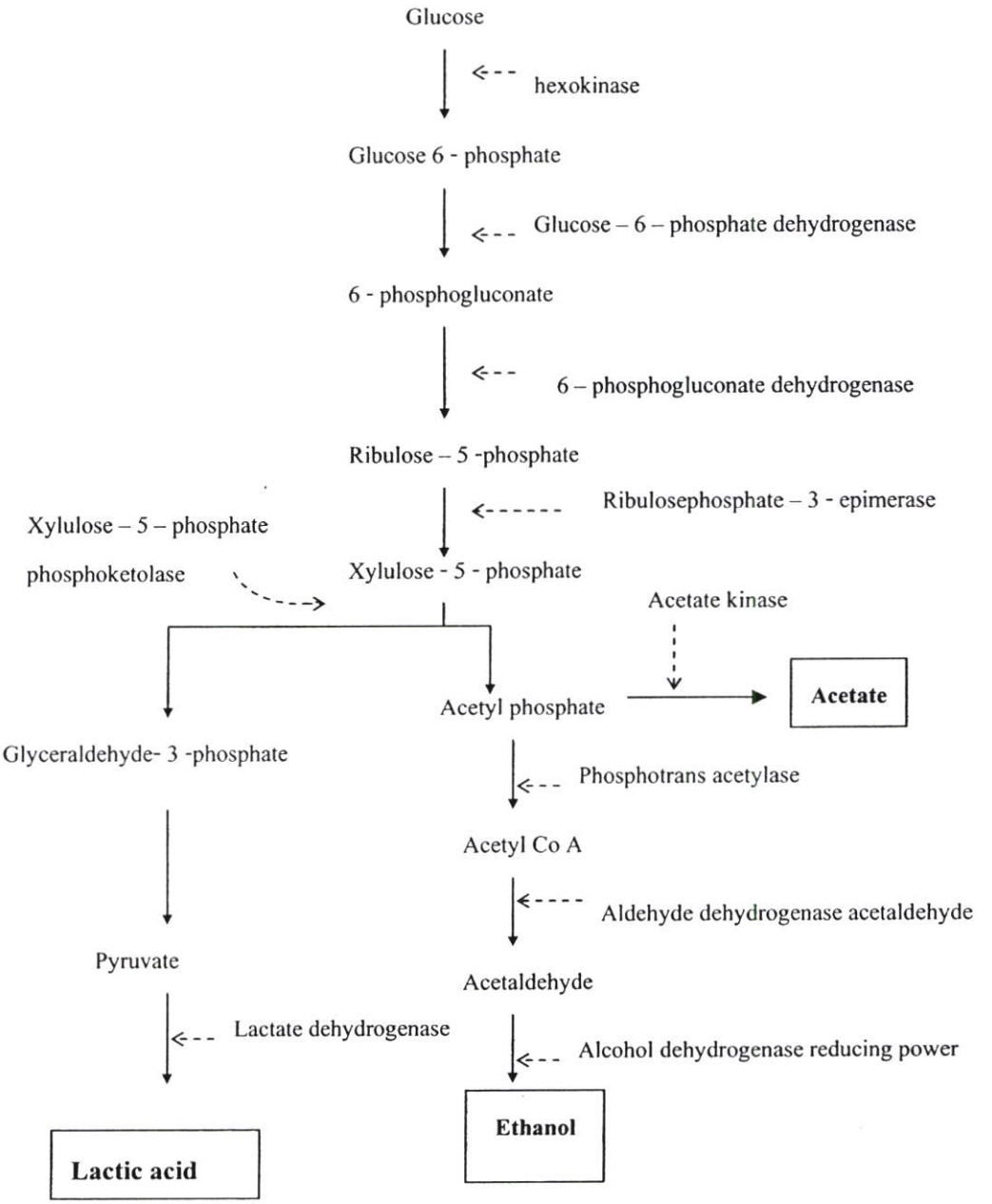
กลุ่ม II facultatively heterofermentative lactobacilli แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล เฮกโซสเป็นกรดแลกติกโดยวิถี Embden – Meyerhof- Parnas (EMP) สามารถผลิตเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase ดังนั้นจึงสามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโตสได้ (Wood and Holzapfel.1995) ดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 วิถี Embden – Meyerhof- Parnas (EMP) ในการผลิตกรดแลกติกของกลุ่ม facultatively heterofermentative lactobacilli

ที่มา : www.brighton73.freeserve.co.uk

กลุ่ม III obligately heterofermentative lactobacilli แบคทีเรียกลุ่มนี้หมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโทสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนตเป็นแลคเตต เอทานอล (กรดอะซิติก) และคาร์บอนไดออกไซด์ (Wood and Holzapfel.1995) ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 วิถีฟอสโฟกลูโคเนตในการผลิตกรดแลกติกของกลุ่ม obligately heterofermentative lactobacilli

ที่มา : www.brighton73.freeserve.co.uk

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

Lactobacillus casei เป็น facultatively anaerobic จัดอยู่ในกลุ่ม facultatively lactobacilli แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้และไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นท่อน(Sneath *et al.*. 1984) ดังรูปที่ 2.13 แบคทีเรียแลกติกที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม พบในน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากพืช และในบริเวณลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ชิโรต้าเป็นสายพันธุ์หลักในการผลิตนม นอกจากนี้ได้มีการนำ *Lactobacillus casei* ไปใช้ในงานวิจัยและอุตสาหกรรมต่างๆ อีกมากมาย ดังนี้

ลัญจกร และคณะ (2548) ได้ศึกษาการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจาก *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 โดยใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารทุกสูตร แต่เจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จ (MRS) โดยให้กิจกรรมยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็น 20 AU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 – 24 ซึ่งเป็นช่วง late log phage ถึงระยะ early stationary phase ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลง CW1 (สัดส่วนน้ำนึ่งปลาทูน่า ต่อน้ำมะพร้าว เป็น 1 ต่อ 1) ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 20 AU / ml ใน ชั่วโมงที่ 20 และสูตรอาหารดัดแปลง CW 2 (1 ต่อ 2),CW 3(1ต่อ 3)และ CW 4 (1 ต่อ 4) มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 10 AU / ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง และพบกิจกรรมการยับยั้งเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยในสูตรอาหาร ทูน่า 2 (สัดส่วนน้ำนึ่งปลาทู ต่อน้ำมะพร้าว เป็น 2 ต่อ 1) และ ทูน่า 3 (3 ต่อ1) และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใดๆ ในสูตรอาหารทูน่า 4 (4 ต่อ1)

รูปที่ 2.13 *Lactobacillus casei* ขนาด 2 ไมครอน โดยกล้องจุลทรรศน์ส่องผ่าน

ที่มา : www.lactospore.com

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

2.4.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50—55 ในการสร้างเซลล์ (สมใจ.2544)

ปนัดดาและคณะ(2545) ศึกษาการหมักกรดแลกติกในอาหาร MRS น้ำสับปะรดและนมพร่องมันเนยด้วย *Pediococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus* sp. ในอาหาร MRS มีปริมาณสูงสุด 9.2 กรัมต่อลิตร ในอาหารน้ำสับปะรดและในนมพร่องมันเนยมีปริมาณ 7.6 และ 7.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับกรดแลกติกที่ผลิตได้จากเชื้อ *Pediococcus* sp.ในอาหารทั้ง 3 ชนิด พบว่าอาหาร MRS อาหารน้ำสับปะรด อาหารนมพร่องมันเนยมีปริมาณกรดแลกติก 11.8, 11.1 และ 11.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Arasaratnam *et al.* (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าเมื่อนำเวย์มาเติมกลูโคสลงไป 20 กรัมต่อลิตรร่วมกับสารสกัดยีสต์ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร กรดแลกติกที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้น

Yun *et al.* (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกาแลกโตส น้ำตาลแลกโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์และแป้ง พบว่า ในน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตสและน้ำตาลมอลโตส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 18.18, 17.95 และ 16.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลกาแลกโตส น้ำตาลแลกโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์และแป้งจะให้ปริมาณกรดแลกติก 2.7, 1.26, 2.24, 1.68, 1.83 และ 1.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำ

Yun *et al.* (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ โดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่า เมื่อเซลล์เจริญในอาหารที่ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลมอลโตส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณการผลิตจะอยู่ระหว่าง 5.2 – 6.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กรดแลกติกที่ได้คิดเป็น 0.96 กรัมต่อกรัมแหล่งคาร์บอน การผลิตกรดแลกติกจากกลูโคส ฟรุกโตสและมอลโตส โดย *Enterococcus faecalis* RKY 1 สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง

Bulet *et al.*(2004) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส โมลาส ฝักถั่ว เละรำข้าวสาลี ในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* พบว่ากลูโคส เพียงอย่างเดียวให้กรดแลกติกในปริมาณที่สูง เช่นเดียวกับที่ใช้น้ำตาลจากฝักถั่วให้ปริมาณกรดแลกติก สูงถึง 58 กรัมต่อลิตร

Wee *et al.* (2004) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากโมลาสในการผลิตกรดแลกติก โดยใช้เชื้อ *Enterococcus faecalis* ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าที่ความเป็นกรดด่าง 7.0 ได้ปริมาณกรดแลกติก 95.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94.9

Huang *et al.*(2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่า ความเข้มข้นของแป้งที่ 20 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด – ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดแลกติก 0.85 – 0.92 กรัมต่อกรัมสารตั้งต้น

Oh *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลีและข้าวโพด โดยนำมาย่อยกับเอนไซม์ และจึงนำไปผลิตกรดแลกติก ด้วยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่า เมื่อใช้ข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลีเป็นสารตั้งต้นจะให้ปริมาณกรดแลกติกมากกว่า 0.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่ออาหารประกอบด้วยแป้งสาลีที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 200 กรัมต่อลิตร แป้งข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตจะสูงถึง 5.36 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณเซลล์จะสูงถึง 14.08 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้แป้งสาลีเพียงอย่างเดียว

Kadam *et al.* (2006) ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส แลคโตส กาแลคโตส ไซโลส มอลโตส ที่สามารถให้ปริมาณกรดที่สูง โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูงที่สุด

Ohkouchi and Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเศษอาหารเหลือทิ้งจากโรงอาหาร โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้สูงถึง 9.2 กิโลกรัมต่อลิตร

Saha (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารอินนูลิน โดยเชื้อ *Lactobacillus intermedius* NRRL B – 3693 พบว่าที่ความเข้มข้นของอินนูลินร้อยละ 25 ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 35.9 กรัมต่อลิตร

Tanaka *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก ในรูปของ D- form จากรำข้าวซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้สูงถึง 9.2 กิโลกรัมต่อลิตร

Wee *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากการใช้น้ำตาลกลูโคสโดยเชื้อ *Lactobacillus* sp. RKY 2ที่ปริมาณต่างๆ ได้แก่ 50, 75, 100 และ 125 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ปริมาณน้ำตาล 125 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดแลกติกมากที่สุด

Xu *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ กลูโคส เซลโลไบโอส และไซโลส โดยเชื้อ *Lactobacillus sake* และ *Lactobacillus casei* พบว่า *Lactobacillus sake* และ *Lactobacillus casei* สามารถใช้กลูโคสได้ดีที่สุดในการผลิตกรดแลกติก ซึ่งให้ผลผลิต 3 กรัมต่อลิตรและ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Ganguly *et al.* (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากใยบวบด้วยวิธีการตรึงเซลล์โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* RBU 2-10 พบว่ากรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงถึง 70 กรัมต่อลิตร

2.4.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 8 — 10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ (สมใจ.2544)

Arasaratnam *et al.* (1996) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ เปปโตน ถั่วเหลืองและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในเวย์และกลูโคสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดีและเหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกได้แก่ สารสกัดยีสต์

Fu and Mathews (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากอาหารสังเคราะห์โดยดัดแปลงสูตรอาหารมาจากอาหารสังเคราะห์ MRS ซึ่งมีส่วนประกอบของเปปโตน 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณสูงถึง 40 กรัมต่อลิตร

Kulozik and Wilde (1999) พบว่าเมื่อเติมสารสกัดยีสต์ลงไปในเวย์จะทำให้ชีวมวลของเซลล์ (A.O.A.C 1990)และปริมาณกรดเพิ่มขึ้น แต่เมื่อไม่เติมสารสกัดยีสต์การเจริญของเซลล์และปริมาณกรดจะน้อย

Fitzpatrick and O'Keeffe (2001) ศึกษาถึงอิทธิพลของการเติม whey protein hydrolysate (WPH) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนลงไปใน whey permeate สำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus helveticus* พบว่า สามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตสในเวย์ให้เป็นกรดแลกติกได้ในปริมาณสูง ภายในระยะเวลา 30 – 40 ชั่วโมง

Nancib *et al.* (2001) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ เปปโตน ยูเรีย corn steep และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดี คือ สารสกัดยีสต์

Pauli and Fitzpatrick (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยมีการเติมสารสกัดจากมอลต์และสารสกัดยีสต์ลงไปเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าเมื่อเติมสารสกัดจากมอลต์และสารสกัดยีสต์ลงไป ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงกว่าเมื่อไม่มีการเติม

Altaf *et al.* (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วเบงกอล ถั่วเขียว ถั่วเหลืองและ baker's yeast ที่เติมลงในแป้งซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต

กรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV6 พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้จะสูงถึงร้อยละ 92

Nancib *et al.* (2005) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปทิซอย ยูเรีย เปปโตน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัมโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงถึง 24.8 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

Kadam *et al.* (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ น้ำแช่ข้าวโพด ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 พบว่าเมื่อใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 89 กรัมต่อลิตร

2.4.3 แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญ ซึ่งตามปกติต้องเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียมและคลอไรด์ นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีก เช่น โคบอลล์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีสและซิงค์ แต่โดยทั่วไปมักจะพบแร่ธาตุเจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (สมใจ.2544)

Fitzpatrick *et al.* (2001) ศึกษาอิทธิพลของแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่มีการเติมแมงกานีสในรูปของ $MnSO_4.H_2O$ ร่วมกับสารสกัดยีสต์ลงไปในเวย์ พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดจะสั้นลงและเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสได้ดี แต่เมื่อไม่มีการเติมแมงกานีสเวลาที่ใช้ในการผลิตจะนานขึ้นและเชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ได้ดีเท่าที่ควร

Huang *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่งโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่ามีการเติมแร่ธาตุชนิดต่างๆ ได้แก่ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟตและซิงค์ซัลเฟตลงไป เพื่อช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลได้เร็วขึ้น

Nancib *et al.* (2005) ศึกษาอิทธิพลของการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปทิซอย ยูเรีย เปปโตน เคซีน ที่ใส่ลงในน้ำอินทผลัมโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* พบว่าปริมาณกรดแลกติกจะสูงเมื่อมีการเติมวิตามินบีร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

Ohkouchi and Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งและเศษอาหารที่เหลือทิ้งจากโรงอาหาร โดยเชื้อ *Lactobacillus manihotvorans* LMG 18011 พบว่าเมื่อเติมแมงกานีสลงไปปริมาณกรดแลกติกจะสูงกว่าเมื่อไม่เติมแมงกานีส

2.4.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตมากเช่นกัน เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแตกต่างกันไป (สมใจ.2544)

Mostafa (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

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

Oh *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูกโดยเชื้อ *Enterococus faecalis* RKY 1 ในการศึกษาได้มีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 38 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูง

Idris and Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสัปปะรด โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbruekii* ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาอุณหภูมิที่ระดับ 27 30 37 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีที่สุด

John *et al.* (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติก

Tanaka *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากรำข้าว โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 พบว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

Vishu *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้ง โดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV 6 พบว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุดในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

2.4.5 ค่าความเป็นกรดด่าง (พีเอช)

การผลิตจำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม จึงจะได้ผลผลิตปริมาณสูง การควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อให้ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่ละลายน้ำ ถ้าพีเอชลดลงคาร์บอเนตจะสลายตัวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชคงที่ประมาณ 7 หรืออาจควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการให้กรดหรือด่าง เช่น กรดซัลฟิวริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์เติมลงไป

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

Fu and Mathews (1999) ได้ศึกษาอิทธิพลของพีเอช สารตั้งต้นและปริมาณออกซิเจนในการผลิตกรดแลกติก จากน้ำตาลแลคโตส โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมของเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกอยู่ในช่วง 5 – 6

Senthuran *et al.* (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกอยู่ในช่วง 5.5 – 6.5 ถ้าพีเอชสูงกว่า 6.5 การผลิตกรดแลกติกจะลดลง

Pauli and Fitzpatrick (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าในการศึกษามีการควบคุมให้ค่าพีเอชอยู่ที่ 5.4 จึงจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

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

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

Kourkoutas *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ด้วยวิธีการตรึงเซลล์กับชิ้นผลไม้ พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกอยู่ในช่วง 5.5 –6.0

Oh *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูกโดยเชื้อ *Enterococus faecalis* RKY 1 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกคือ 7

Idris and Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสัปปะรด โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 การใช้ปริมาณน้ำตาลจะเร็วและให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง

John *et al.* (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าพีเอช 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติก

2.4.6 การให้อากาศ

ออกซิเจนเป็นธาตุชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศ (aerobe) ปริมาณออกซิเจนในอาหารจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญและการผลิตสารเมตาบอไลท์ (สมใจ.2544)

Arasaratnam *et al.* (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ในสภาวะนิ่งพบว่ากรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงถึง 41 กรัมต่อลิตร

Gonzalez – vara *et al.* (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp.casei DSM 20011 และ *Lactobacillus coryniformis* subsp. torquens DSM 20004 ด้วยการหมักแบบต่อเนื่องในสภาวะที่ไม่มีอากาศ พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณ 35 กรัมต่อลิตร และ 39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Mostafa (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ในสภาวะนิ่งพบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้สูงถึงร้อยละ 2.2

Roukas and Kotzekidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactococcus lactis* ซึ่งมีการกวนให้อากาศ 300 รอบต่อนาที พบว่ากรดแลกติกที่ผลิตได้สามารถผลิตได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

Fu and Mathew (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลแลคโตส โดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งในการศึกษาได้มีการศึกษาถึงการผลิตกรดแลกติกแบบ anaerobic และ aerobic ที่มีการกวนให้อากาศที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าการเลี้ยงแบบ anaerobic จะให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงกว่าการเลี้ยงแบบ aerobic

Senthuran *et al.* (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่า มีการให้อากาศโดยการกวนที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญภายในเวลา 8 ชั่วโมง สำหรับการเพิ่มกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตกรดแลกติก

Nancib *et al.* (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ได้มีการให้อากาศ โดยการกวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่า เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญอยู่ในช่วง stationary phase ภายในเวลา 20 ชั่วโมง

Wee *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากโมลาสโดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* ในการศึกษามีการควบคุมการให้อากาศโดยการกวนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีพบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้สูงถึงร้อยละ 98

Nancib *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำอินทผลัมโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRL – B445 พบว่ามีการควบคุมการให้อากาศโดยการกวนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นสายพันธุ์ facultative anaerobic จึงไม่ต้องการการให้อากาศแบบพ่น (air – sparging)

Oh *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูกโดยเชื้อ *Enterococus faecalis* RKY 1 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกคือมีการให้อากาศโดยมีการกวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที

Gao *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเศษปลา โดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* (NBRC 3863) ในการหมักได้มีการใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร มีการควบคุมอุณหภูมิ

ค่าพีเอช และการกวนที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้จะสูงถึง 87 กรัมต่อลิตร

2.4.7 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนต

กระบวนการหมักทางชีวภาพที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตกรดต่างๆนั้นยังมีปัญหา เมื่อกรดที่เชื้อผลิตมานั้นมีความเข้มข้นสูงจนเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโต (product inhibition) จึงได้มีการศึกษาการใช้สารเพื่อปรับสภาพให้เป็นกลางให้สภาวะที่ทำการหมักมีสภาพเป็นกลางเพื่อให้เชื้อสามารถเจริญและผลิตกรดได้มากขึ้น สารตัวกลางหนึ่งที่ใช้ในกระบวนการหมัก คือ แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ซึ่งได้มีผู้ทำการศึกษาการผลิตกรดโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารปรับสภาพให้เป็นกลาง ดังนี้

Arasaratnam *et al.* (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ ด้วยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* โดยในเวย์ได้มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไป 30 กรัมต่อลิตร เพื่อแก้ปัญหาระดับพีเอชที่ลดลงซึ่งมีผลทำให้ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณน้อย

Altaf *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยอาหารแข็งจากเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV 6 โดยในอาหารได้มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปเพื่อเป็นบัฟเฟอร์ในการปรับค่าพีเอชของอาหาร พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณ 3.8 กรัมต่อ 6 กรัมสารตั้งต้น

Ding and Tan (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* โดยมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไป 15 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงขึ้น

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

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่องHigh Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท SHIMADZU

รุ่น C-R7Ae plus

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

ตู้เย็นอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO รุ่น MDF-U 4086S

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Phytotron climate simulator

เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อที่สามารควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องอบลมร้อน ของบริษัท Binder

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่นLIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

ตู้เขี่ยเชื้อ (Larmina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

โถดูดความชื้น

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

เข็มเขี่ยเชื้อ (niddle)

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX^{R}

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^{R}

กระบอกตวง (cylinder)ของบริษัท PYREX^{R}

บีกเกอร์ (beaker)ของบริษัท PYREX^{R}

ปิเปตต์ (pipette)

คิวเวต (แก้ว)

3.2 สารเคมี

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)

เปปโตน (peptone)

ยูเรีย (urea)

แลคโตส (lactose)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4\ H_2O$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4\ .\ 7H_2O$)

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ไฮโดรคลอริก (HCl)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กับเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) การหาน้ำตาลแลคโตส ดูในภาคผนวก ข.

3.3 วัตถุดิบ

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

3.3.1 การเก็บวัตถุดิบ

เวย์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยจะเก็บที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส

3.3.2 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

ก่อนใช้นำออกมาทำละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการแยกโปรตีนออกจากเวย์ ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (ดัดแปลง จาก Kessler.1981) แยกไขมันโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Glass fiber (GC-50)

3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้ว streak ลงในอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก.) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลอง ดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติก แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.4.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus casei* TISTR 1341ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก.) ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

3.5 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก

การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ มีสูตรอาหารทั้งหมด 9 สูตรดังนี้

สูตรอาหาร	เวย์	สารสกัดยีสต์	เปปโตน	น้ำตาลแลกโตส	แร่ธาตุ
สูตรที่ 1	-	+	+	+	+
สูตรที่ 2	+	+	-	+	+
สูตรที่ 3	+	-	+	+	+
สูตรที่ 4	+	+	+	-	+
สูตรที่ 5	+	+	+	+	-
สูตรที่ 6	+	-	-	+	+
สูตรที่ 7	+	-	-	-	+
สูตรที่ 8	+	-	-	+	-
สูตรที่ 9	+	-	-	-	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก Roukas and Kotzekidou (1998), Fu and Mathew (1999), Fitzpatrick *et al.* (2001) , Nancib *et al.* (2005) และ Idris and Suzana (2006)

หมายเหตุ + หมายถึง เติม

- หมายถึง ไม่เติม

ปริมาณสารอาหารที่ใช้ในอาหารทั้ง 9 สูตร มีดังนี้

สารสกัดยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลแลคโตส	50	กรัมต่อลิตร

แหล่งแร่ธาตุ ประกอบด้วย

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.1	กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 1 ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ใช้เป็นชุดควบคุม

สูตรที่ 2 – 9 ใช้เวย์เป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สูตรอาหารทั้ง 9 สูตรนี้เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรสูตรอาหารร้อยละ 70 (350 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลกโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อจากข้อ 3.4.2 ร้อยละ 5 ลงในอาหารทั้ง 9 สูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักที่สภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีของ A.O.A.C 2000 (ภาคผนวก ข) ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

3.6 การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก

3.6.1 การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เลือกสูตรอาหารที่ทำให้เชื้อเจริญและผลิตกรดแลกติกที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 โดยผันแปรชนิดแหล่งไนโตรเจน ดังนี้

สูตรอาหาร	สารสกัดยีสต์ (ร้อยละ)	เปปโตน (ร้อยละ)	ยูเรีย (ร้อยละ)
สูตรที่ 1	0.5	-	-
สูตรที่ 2	-	0.5	-
สูตรที่ 3	0.5	1	-
สูตรที่ 4	0.5	-	0.5
สูตรที่ 5	-	1	0.5
สูตรที่ 6	0.5	-	1
สูตรที่ 7	-	1	1
สูตรที่ 8	0.5	1	0.5
สูตรที่ 9	0.5	1	1

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เติม

สูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรสูตรอาหารร้อยละ 70 (350 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารที่เตรียม 9 สูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักที่สภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีของ A.O.A.C 2000 (ภาคผนวก ข) ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

3.6.2 การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 และข้อ 3.6.1 โดยผันแปรความเร็วรอบ ดังนี้

สูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 และข้อ 3.6.1เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรสูตรอาหารร้อยละ 70 (350 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหาร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่งและที่ความเร็วรอบ 50 70 100 และ 150 รอบต่อนาที เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีของ A.O.A.C 2000 (ภาคผนวกข) ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ ตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

3.6.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 และข้อ 3.6.1 โดยผันแปรอุณหภูมิดังนี้

สูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 และข้อ 3.6.1เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรสูตรอาหารร้อยละ 70 (350 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 ($\pm$ 1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหาร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 35 37 38 40และ 42 องศาเซลเซียสทำการหมักสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.2 เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีของ A.O.A.C 2000 (ภาคผนวก ข) ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

3.6.4 การศึกษาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

โดยเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.1 โดยผันแปรปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ดังนี้

สูตรอาหาร	ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต (ร้อยละ)
สูตรที่ 1	0
สูตรที่ 2	1
สูตรที่ 3	2
สูตรที่ 4	3
สูตรที่ 5	4
สูตรที่ 6	5

สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.1 เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรสูตรอาหารร้อยละ 70 (350 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลกโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารที่เตรียม 6 สูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.3 ในสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.2 เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

3.7 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 โดยการหมักระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและการหมักระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.7.1 การผลิตกรดแลกติกระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 3.6.1 และ 3.6.4 มาทำการผลิตกรดแลกติก โดยใช้การหมักระดับฟลาสก์สภาพการหมักแบบกะโดยใช้ ฟลาสก์ขนาดใหญ่ 2 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรร้อยละ 70 (1330 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 (70 มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.3 ในสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.2 เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956

(ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี T - test

3.7.2 การผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมจากที่ได้ศึกษาในข้อ 3.5 3.6.1 และ 3.6.4 มาทำการผลิตกรดแลกติกโดยใช้การหมักในถังหมักสภาพการหมักแบบกะโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร ร้อยละ 70 (1330 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 (70 มิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.3 กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที (Gao *et al.* 2006) ไม่ต้องพ่นอากาศ เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี T-test

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลการวิเคราะห์การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในอาหาร 9 สูตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวัดปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอช พบว่า

เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 1.82 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 48 ในอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งประกอบด้วยเวย์เติมสารสกัดยีสต์ เปปโตน แหล่งแร่ธาตุ สูงกว่าอาหารสูตรที่ 1, 5, 6, 8 และ 9 (1.15, 1.55, 1.67, 1.46 และ 1.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่สูงกว่าอาหารสูตรที่ 2, 3 และ 7 (1.75, 1.72 และ 1.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อดูจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะพบว่าในอาหารสูตรที่ 4 (5.73 กรัมต่อลิตร) จะสูงกว่าอาหารสูตรที่ 2 (5.03 กรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)แต่จะมีค่าสูงกว่าอาหารสูตรที่ 7 (4.71 กรัมต่อลิตร) อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออาหารสูตรที่ 4 (ร้อยละ 46.25) มีค่าต่ำกว่าอาหารสูตรที่ 2, 3, 5, 6, 7, 8 และ 9 (ร้อยละ 68.68, 70.16, 73.21, 74.26, 49.38, 77.94 และ 50.17 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่มีค่าต่ำกว่าอาหารสูตรที่ 1 (ร้อยละ 48.97) อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนค่าพีเอช พบว่า อาหารสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่ในอาหารสูตรที่ 5, 6, 8 และ 9 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และในอาหารสูตรที่ 3 และ 7 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ดังตารางที่ 4.1)

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณกรดแลกติกและปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ชั่วโมง 48 จะมีค่าสูงสุดและเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 54 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) มีค่าคงที่และค่าพีเอชจะมีค่าเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 120

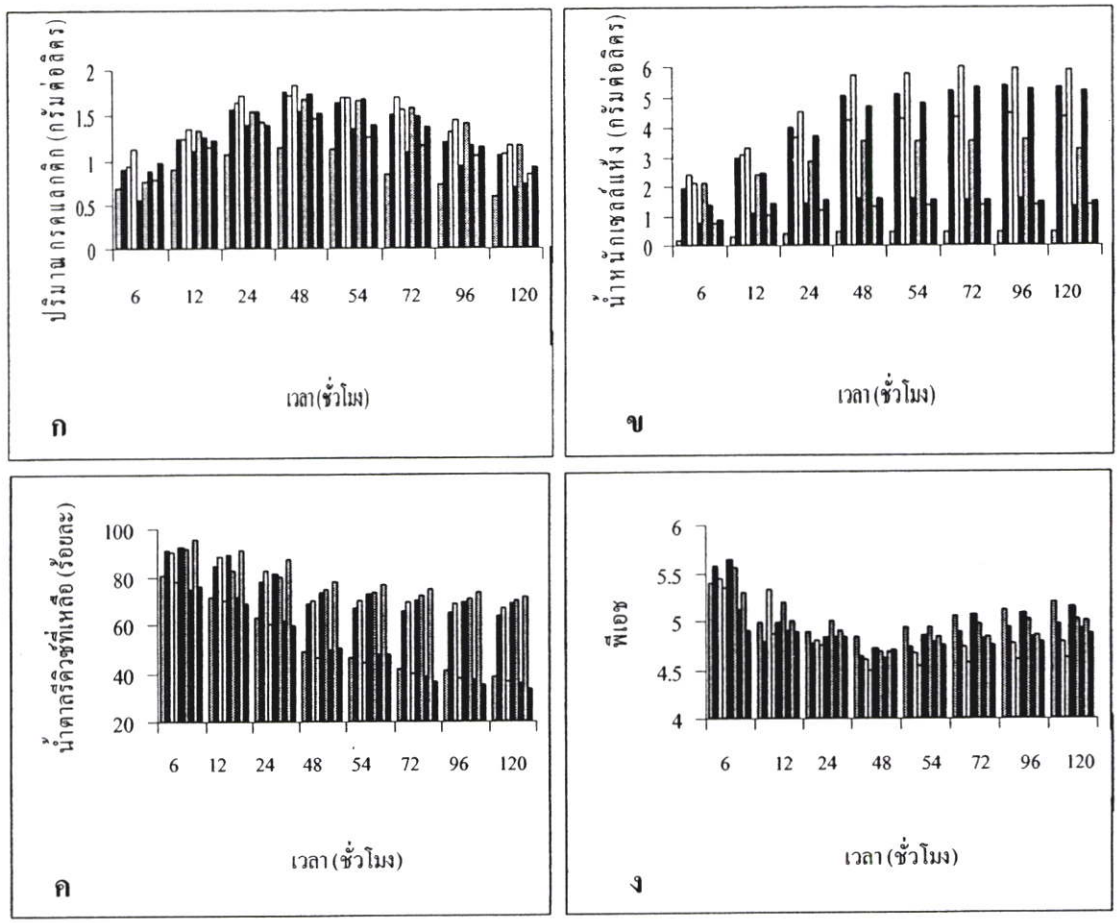
จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยเวย์เติมสารสกัดยีสต์ แลคโตส แร่ธาตุ อาหารสูตรที่ 3 ซึ่งประกอบด้วยเวย์เติมเปปโตน แลคโตส แร่ธาตุ อาหารสูตรที่ 4 ซึ่งประกอบด้วยเวย์เติมสารสกัดยีสต์ เปปโตน แร่ธาตุและอาหารสูตรที่ 7 ซึ่งประกอบด้วยเวย์เติมแหล่ง แร่ธาตุเป็นสูตรอาหารที่ให้ปริมาณกรดแลกติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่เนื่องจากในอาหารสูตรที่ 4 เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและการผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าในอาหารสูตรที่ 2, 3 และ 7 ซึ่งในอาหารสูตรที่ 2 และ 3 มีการเติมน้ำตาลแลคโตสเพิ่มในเวย์ด้วยซึ่งเป็นการสิ้นเปลือง เนื่องจากเชื้อใช้น้ำตาลไม่หมดและมีปริมาณน้ำตาลเหลือมาก

ส่วนในอาหารสูตรที่ 7 ถึงแม้จะมีปริมาณน้ำตาลเหลือใกล้เคียงกับอาหารสูตรที่ 4 แต่มีปริมาณเหลือมากกว่าและปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่าแสดงว่าการเจริญของเชื้อเจริญน้อยกว่า ดังนั้นอาหารสูตรที่ 4 เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 เพื่อใช้ในการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลกติกในหัวข้อต่อไป โดยการทดลองได้สอดคล้องกับการทดลองของ Kulozik and Wilde (1999) พบว่าเมื่อเติมสารสกัดยีสต์ลงไปในเวย์จะทำให้ชีวมวลของเซลล์และปริมาณกรดเพิ่มขึ้นแต่เมื่อไม่เติมสารสกัดยีสต์การเจริญของเซลล์และปริมาณกรดจะน้อยและการศึกษาของ Pauli and Fitzpatrick (2002) พบว่าการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยมีการเติมสารสกัดจากมอลต์และสารสกัดยีสต์ลงไปเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงกว่าเมื่อไม่มีการเติม

ตารางที่ 4.1 ผลของปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอชของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341ที่เลี้ยงในอาหาร 9 สูตรที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สูตรอาหาร	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)	พีเอช
สูตรที่ 1	1.15 ^{d}	0.43 ^{i}	48.97 ^{de}	4.83 ^{a}
สูตรที่ 2	1.75 ^{ab}	5.89 ^{b}	68.68 ^{c}	4.64 ^{c}
สูตรที่ 3	1.72 ^{ab}	5.21 ^{d}	70.16 ^{c}	4.6 ^{d}
สูตรที่ 4	1.82 ^{a}	6.08 ^{a}	46.25 ^{e}	4.5 ^{e}
สูตรที่ 5	1.55 ^{c}	2.01 ^{f}	73.21 ^{b}	4.72 ^{b}
สูตรที่ 6	1.67 ^{b}	4.98 ^{c}	74.26 ^{b}	4.69 ^{b}
สูตรที่ 7	1.74 ^{ab}	5.38 ^{c}	49.38 ^{d}	4.62 ^{cd}
สูตรที่ 8	1.46 ^{c}	1.21 ^{h}	77.94 ^{a}	4.69 ^{b}
สูตรที่ 9	1.53 ^{c}	1.84 ^{g}	50.17 ^{d}	4.7 ^{b}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT



รูปที่ 4.1 ผลขององค์ประกอบอาหารสูตร 9 สูตร ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก (ก) ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร) (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และ (ง) ค่าพีเอช ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ชั่วโมง ที่ 6, 12, 24, 48, 54, 72, 96 และ 120 ตามลำดับ โดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

4.2 ผลการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

4.2.1 ผลการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในอาหาร 9 สูตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวัดปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอช พบว่า

เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 1.77 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 48 ในอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย เวย์เติมสารสกัดยีสต์และเปปโตน ในปริมาณร้อยละ 0.5 และ 1 ตามลำดับ สูงกว่าอาหารสูตรที่ 2, 4, 5, 6 และ7 (1.6, 1.61, 1.58, 1.6 และ 1.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่สูงกว่าอาหารสูตรที่ 1, 8 และ 9 (1.68, 1.74 และ 1.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อดูจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง จะพบว่า ในอาหารสูตรที่ 3 (1.98 กรัมต่อลิตร) จะสูงกว่าอาหารทั้ง 8 สูตร อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออาหารสูตรที่ 3 (ร้อยละ 49.62) มีค่าต่ำกว่าอาหารสูตรที่ 1, 2, 4, 5, 6 และ 7 (ร้อยละ 52.86, 60.26, 60, 63.06, 62.12 และ 65.68 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่มีค่าต่ำกว่าอาหารสูตรที่ 8 และ 9 (ร้อยละ 51.58 และ 51.96 ตามลำดับ) อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนค่าพีเอช พบว่า อาหารสูตรที่ 3, 4, 5, 8 และ 9 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และอาหารสูตรที่ 3 และ 7 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ในอาหารสูตรที่ 1, 2 และ 6 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ดังตารางที่ 4.2)

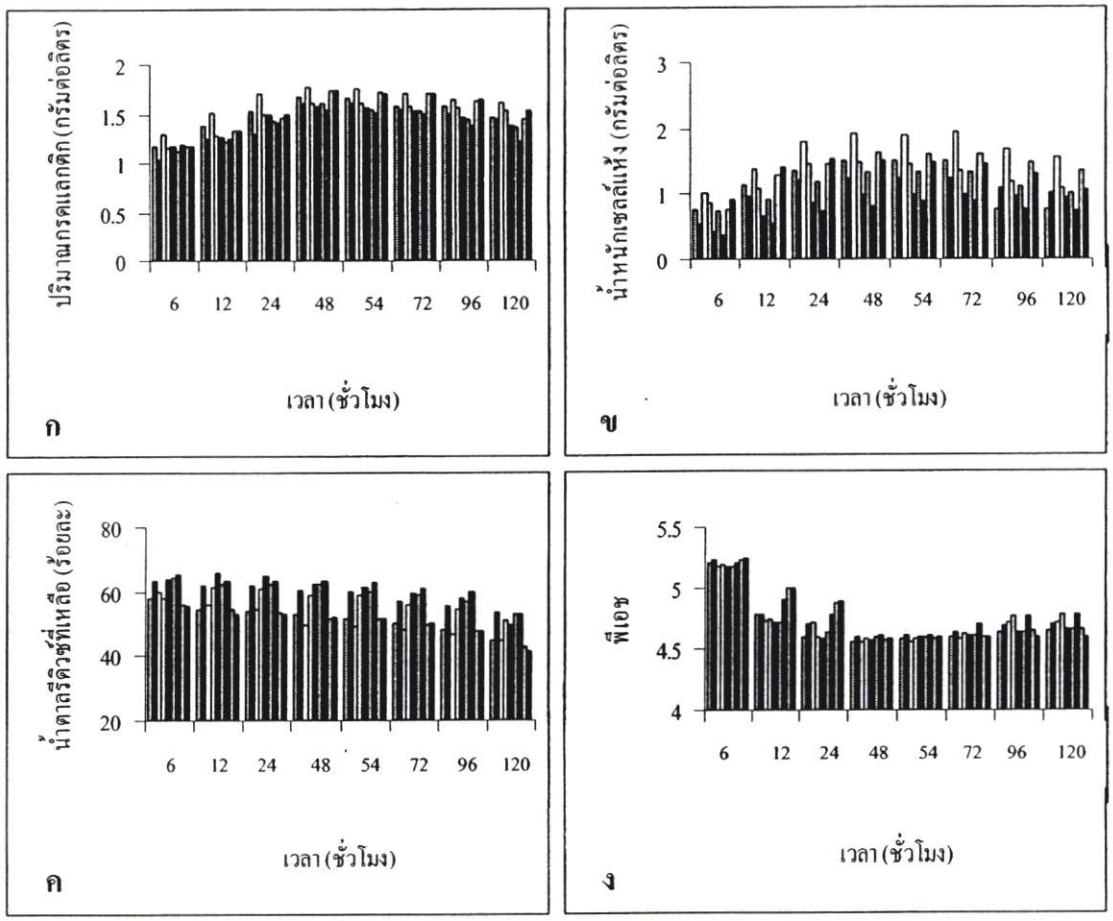
จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า *Lactobacillus casei* TISTR 1341 สามารถผลิตกรดแลกติกและเจริญได้ดีในอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งประกอบด้วยเวย์ที่เติมสารสกัดยีสต์และเปปโตน ในปริมาณร้อยละ 0.5 และ 1 ตามลำดับ เนื่องจากว่าในอาหารสูตรที่ 1, 8 และ 9 ถึงแม้ว่าจะให้ปริมาณกรดแลกติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารสูตรที่ 3 แต่เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารสูตรที่ 1, 8 และ 9 จะมีปริมาณน้อยกว่าอาหารสูตรที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งในอาหารสูตรที่ 8 และ 9 มีการเติมยูเรียเพิ่มในเวย์ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองเนื่องจากเชื้อไม่สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้เมื่อดูจากปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในอาหารสูตรที่ 3 ก็มีปริมาณน้อยกว่าในอาหารสูตรที่ 1, 8 และ 9 อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แสดงว่าในอาหารสูตรที่ 3 นอกจากปริมาณกรดแลกติกจะมีปริมาณสูงที่สุดการเจริญของเชื้อก็มีการเจริญที่ดีกว่าและมีการใช้น้ำตาลได้มากกว่า ทั้งนี้โดยทั่วไปเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน(สมใจ. 2544) ดังนั้นอาหารสูตรที่ 3 เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 เพื่อใช้ในการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลกติกในหัวข้อต่อไป โดยการทดลองได้สอดคล้องกับการทดลองของ Fu and Mathew (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากอาหารสังเคราะห์โดยได้ดัดแปลงสูตรอาหารมาจากอาหาร MRS ซึ่งมีส่วนประกอบของเปปโตน 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์

5 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณสูงถึง 40 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.2 ผลของปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอชของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341ที่เลี้ยงในชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจนของอาหาร 9 สูตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สูตรอาหาร	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)	พีเอช
สูตรที่ 1	1.68 ^{ab}	1.51 ^{b}	52.86 ^{d}	4.6 ^{ab}
สูตรที่ 2	1.6 ^{bc}	1.24 ^{c}	60.26 ^{c}	4.6 ^{ab}
สูตรที่ 3	1.77 ^{a}	1.98 ^{a}	49.62 ^{e}	4.55 ^{c}
สูตรที่ 4	1.61 ^{bc}	1.48 ^{c}	60 ^{c}	4.58 ^{abc}
สูตรที่ 5	1.58 ^{bc}	0.98 ^{f}	63.06 ^{b}	4.57 ^{bc}
สูตรที่ 6	1.6 ^{bc}	1.32 ^{d}	62.12 ^{bc}	4.59 ^{ab}
สูตรที่ 7	1.54 ^{c}	0.82 ^{g}	65.68 ^{a}	4.61 ^{a}
สูตรที่ 8	1.74 ^{a}	1.62 ^{b}	51.58 ^{dc}	4.57 ^{bc}
สูตรที่ 9	1.73 ^{a}	1.51 ^{c}	51.96 ^{dc}	4.58 ^{abc}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT



สูตรที่ 1 สารสกัดยีสต์ ร้อยละ 0.5

สูตรที่ 2 เปปโตน ร้อยละ 1

สูตรที่ 3 สารสกัดยีสต์ + เปปโตน ร้อยละ 0.5 และ 1 ตามลำดับ

สูตรที่ 4 สารสกัดยีสต์ + ยูเรีย ร้อยละ 0.5 และ 0.5 ตามลำดับ

สูตรที่ 5 เปปโตน + ยูเรีย ร้อยละ 1 และ 0.5 ตามลำดับ

สูตรที่ 6 สารสกัดยีสต์ + ยูเรีย ร้อยละ 0.5 และ 1 ตามลำดับ

สูตรที่ 7 เปปโตน + ยูเรีย ร้อยละ 1 และ 1 ตามลำดับ

สูตรที่ 8 สารสกัดยีสต์ + ยูเรีย + เปปโตน ร้อยละ 0.5 0.5 และ 1 ตามลำดับ

สูตรที่ 9 สารสกัดยีสต์ + ยูเรีย + เปปโตน ร้อยละ 0.5 0.5 และ 1 ตามลำดับ

รูปที่ 4.2 ผลของชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก (ก) ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร) (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยล ะ) และ (ง) ค่าพีเอช ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ชั่วโมง ที่ 6, 12, 24, 48, 54, 72, 96 และ 120 ตามลำดับ โดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

4.2.2 ผลการศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341ในเวย์เติมสารสกัดยีสต์และเปปโตน ในปริมาณร้อยละ 0.5 และ 1 ตามลำดับ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง ความเร็ว 50, 70, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวัดปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอช พบว่า

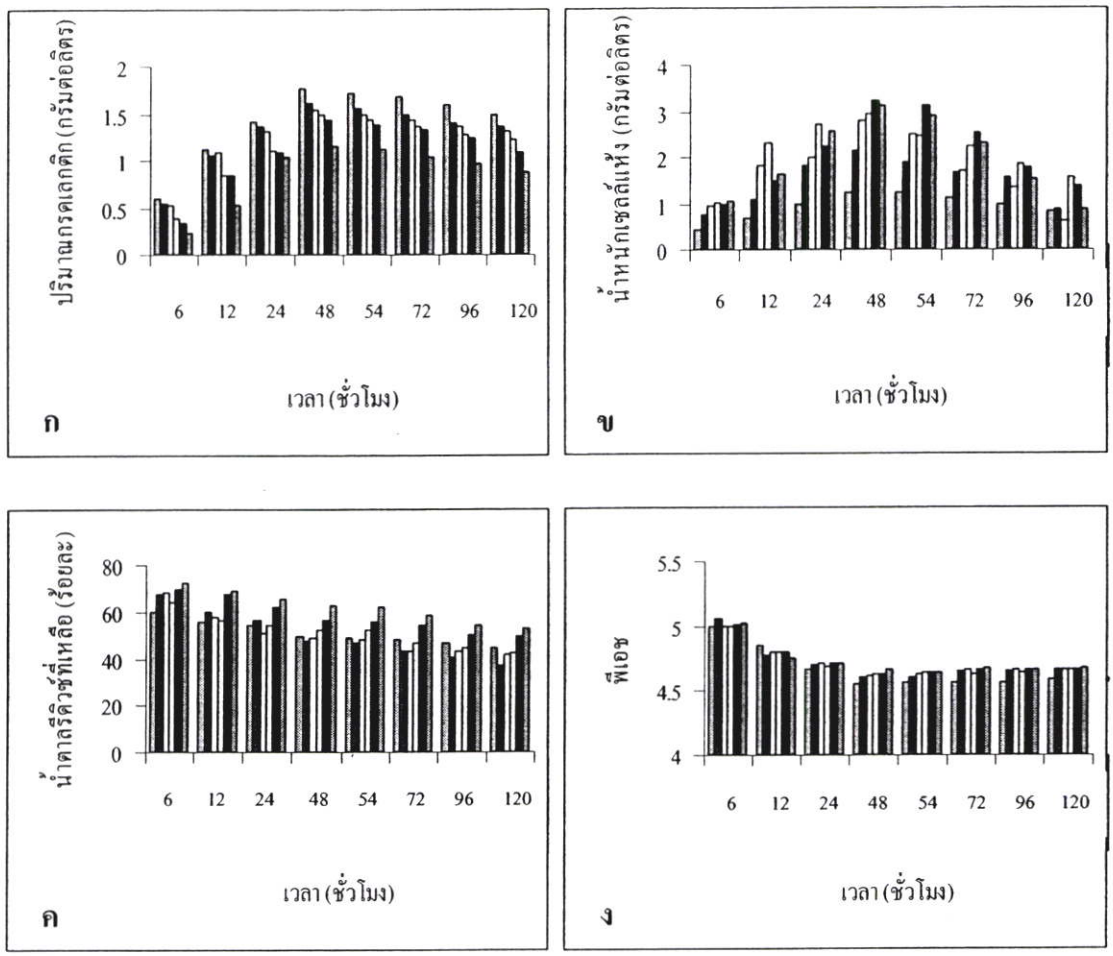
เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 1.77 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 48 ที่สภาวะนิ่ง สูงกว่าความเร็ว 50, 70, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที (1.62, 1.55, 1.49, 1.43 และ 1.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อดูจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะพบว่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (3.48 กรัมต่อลิตร) จะสูงกว่าที่สภาวะนิ่ง ความเร็ว 50, 70, 100 และ 150 รอบต่อนาที (1.24, 2.15, 2.79, 2.94 และ 3.24 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ทั้งนี้โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 – 55 ในการสร้างเซลล์ (สมใจ. 2544) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือที่สภาวะนิ่ง (ร้อยละ 46.83) มีค่าต่ำกว่าที่ความเร็ว 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที (ร้อยละ 52.41, 56.35 และ 62.48 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่มีค่าต่ำกว่าความเร็ว 50 และ 70 รอบต่อนาที (ร้อยละ 47.28 และ 48.59 ตามลำดับ) อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนค่าพีเอช พบว่าที่สภาวะนิ่งมีค่าต่ำกว่า (4.55) ความเร็วรอบ 50, 70, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่ความเร็ว 50, 70, 100, และ 150 รอบต่อนาที (4.6, 4.62, 4.63 และ 4.63) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และที่สภาวะนิ่งและที่ความเร็ว 200 รอบ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ดังตารางที่ 4.3)

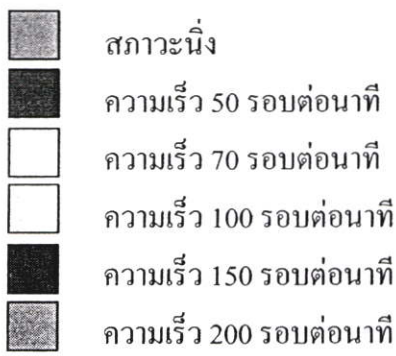
จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า *Lactobacillus casei* TISTR 1341 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สภาวะนิ่งและสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเร็วรอบแต่เนื่องจากการทดลองนี้ศึกษาผลผลิตปริมาณกรดแลกติก ดังนั้นที่สภาวะนิ่งจึงเหมาะสมที่นำไปศึกษาขั้นต่อไป โดยการทดลองได้สอดคล้องกับการทดลองของ Arasaratnam *et al.* (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ในสภาวะนิ่งพบว่ากรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงถึง 41 กรัมต่อลิตร และ Mostafa (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ในสภาวะนิ่งพบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้สูงถึงร้อยละ 2.2

ตารางที่ 4.3 ผลของปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอชของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341ที่สภาวะนิ่ง ความเร็ว 50,70,100,150 และ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)	พีเอช
สภาวะนิ่ง	1.77 ^{a}	1.24 ^{f}	46.83 ^{d}	4.55 ^{c}
50	1.62 ^{b}	2.15 ^{e}	47.28 ^{d}	4.60 ^{b}
70	1.55 ^{bc}	2.79 ^{d}	48.59 ^{d}	4.62 ^{b}
100	1.49 ^{cd}	2.94 ^{c}	52.41 ^{c}	4.63 ^{ab}
150	1.43 ^{d}	3.24 ^{b}	56.35 ^{b}	4.63 ^{ab}
200	1.16 ^{e}	3.48 ^{a}	62.48 ^{a}	4.66 ^{a}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT





รูปที่ 4.3 ผลของสภาวะนิ่งและความเร็ว 50, 70, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาทีที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก (ก) ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร) (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และ (ง) ค่าพีเอชของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ชั่วโมง ที่ 6, 12, 24, 48, 54, 72, 96 และ 120 ตามลำดับ โดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.2.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341ในเวย์เติมสารสกัดยีสต์และเปปโตน ในปริมาณร้อยละ 0.5 และ 1 ตามลำดับ ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิห้อง 35, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวัดปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอช พบว่า

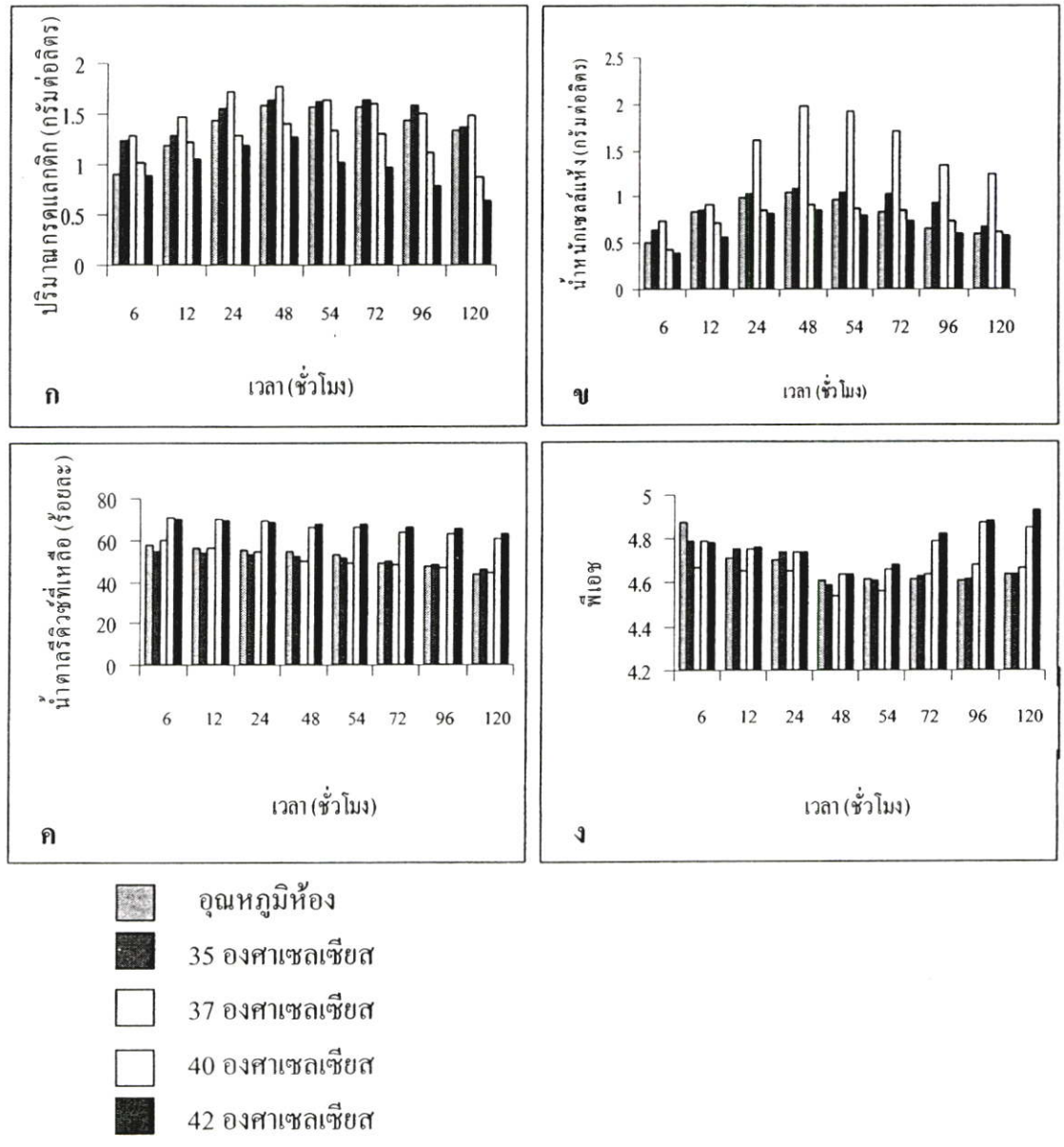
เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 1.76 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 48 ที่ 37 องศาเซลเซียส สูงกว่าอุณหภูมิห้อง 35, 40 และ 42 องศาเซลเซียส (1.63, 1.64, 1.4 และ 1.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อดูจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะพบว่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (1.97 กรัมต่อลิตร) จะสูงกว่าอุณหภูมิห้อง 35, 40 และ 42 (1.04, 1.08, 0.92 และ 0.86 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ)อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออุณหภูมิ 37 (ร้อยละ 49.58) มีค่าต่ำกว่าอุณหภูมิ 35(ร้อยละ 51.67) อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง 40 และ 42 (ร้อยละ 54.35, 66, และ 67.58 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนค่าพีเอช พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 และ 42 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่แตกต่างกันที่อุณหภูมิห้อง 35 และ 37 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ดังตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ผลของปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอชของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341ที่สภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง 35,37,40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียล)	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)	พีเอช
อุณหภูมิห้อง	1.63 ^{b}	1.04 ^{c}	54.35 ^{b}	4.61 ^{ab}
35	1.64 ^{b}	1.08 ^{c}	51.67 ^{c}	4.59 ^{bc}
37	1.76 ^{a}	1.97 ^{a}	49.58 ^{c}	4.54 ^{d}
40	1.40 ^{c}	0.92 ^{d}	66 ^{a}	4.64 ^{a}
42	1.36 ^{c}	0.86 ^{d}	67.58 ^{a}	4.64 ^{a}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง 35, 40 และ 42 องศาเซลเซียส โดยการทดลองได้สอดคล้องกับการทดลองของ Mostafa (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและJohn *et al.* (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติก



รูปที่ 4. 4 ผลของอุณหภูมิห้อง 35, 37, 40 และ 42 ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก (ก) ปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อลิตร) (ข) น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร) (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และ(ง) ค่าพีเอช ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ชั่วโมง ที่ 6, 12, 24, 48, 54, 72, 96 และ 120 ตามลำดับ โดยทำการเลี้ยงที่สภาวะนิ่ง

4.2.4 ผลการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)ที่เหมาะสม

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341ในเวย์เติมสารสกัดยีสต์และเปปโตนในปริมาณร้อยละ 0.5 และ 1 ตามลำดับ ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวัดปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอช พบว่า

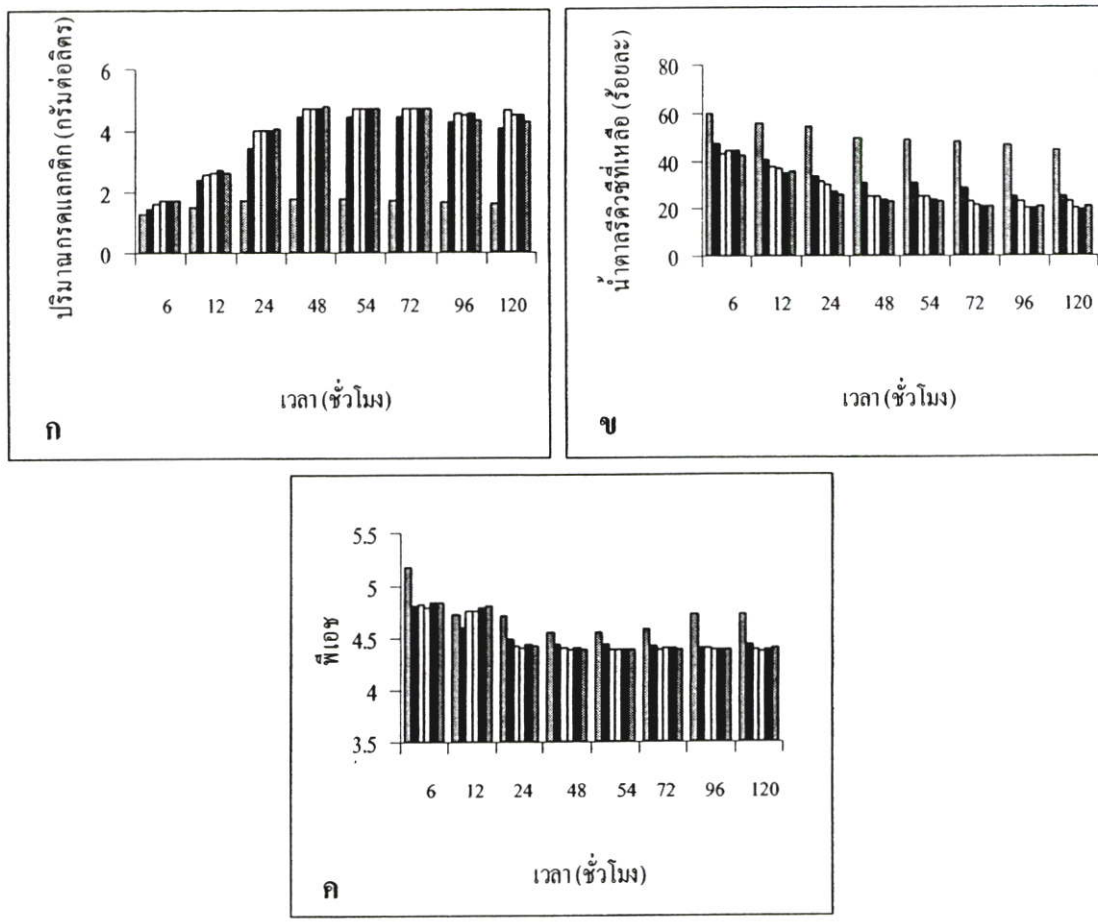
เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 4.77 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 48 ในสูตรอาหารที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 5 สูงกว่าสูตรที่ไม่เติมและที่มีการเติม ร้อยละ 1 (1.77 และ 4.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่สูงกว่าสูตรที่เติมร้อยละ 2, 3 และ 4 (4.74, 4.74 และ 4.75 ตามลำดับ) อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือสูตรที่มีการเติมร้อยละ 2, 3, 4 และ 5 (ร้อยละ 25.34, 24.77, 23.51 และ 22.76) มีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่แตกต่างจากสูตรที่ไม่มีการเติมและสูตรที่มีการเติม ร้อยละ 1 (46.83 และ 30.51 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนค่าพีเอช พบว่าสูตรอาหารที่มีการเติมร้อยละ 2, 3, 4 และ 5 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ($P<0.05$) แต่จะแตกต่างจากสูตรที่ไม่เติมและสูตรที่มีการเติมร้อยละ 1 (ดังตารางที่ 4.5)

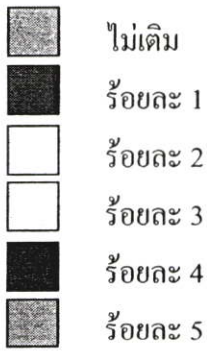
ตารางที่ 4.5 ผลของปริมาณกรดแลกติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และค่าพีเอชของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341ที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตและที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่สภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต (ร้อยละ)	ปริมาณกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)	พีเอช
0	1.77 ^{c}	46.83 ^{a}	4.55 ^{a}
1	4.44 ^{b}	30.51 ^{b}	4.43 ^{b}
2	4.74 ^{a}	25.34 ^{c}	4.39 ^{c}
3	4.74 ^{a}	24.77 ^{c}	4.39 ^{c}
4	4.75 ^{a}	23.51 ^{c}	4.40 ^{c}
5	4.77 ^{a}	22.76 ^{c}	4.38 ^{c}

หมายเหตุในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีมากกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตทำปฏิกิริยากับกรดแลกติกได้เกลือแคลเซียมแลกเตตและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เป็นกลางมากขึ้น (Altaf *et al.*. 2006) จึงไม่เกิดการยับยั้งการเติบโตของเชื้อที่เกิดจากกรดที่เชื้อผลิตขึ้นทำให้เชื้อสามารถเติบโตและผลิตกรดได้เพิ่มมากขึ้น และถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตจากความเข้มข้นร้อยละ 3 4 และ 5 แต่การผลิตกรดแลกติกมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เพราะฉะนั้นจึงไม่มีความจำเป็นในการใช้ความเข้มข้นในปริมาณที่สูงเพราะเมื่อสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 120 พบว่าปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตยังคงเหลือค้างอยู่ในปริมาณมากที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 4 และ 5 และเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในการทดลองซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Arasaratnam *et al.* (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ ด้วยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* โดยในเวย์ได้มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไป 30 กรัมต่อลิตร เพื่อแก้ปัญหาระดับพีเอชที่ลดลงซึ่งมีผลทำให้ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณน้อย และ Ding and Tan (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* โดยมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไป 15 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงขึ้น





รูปที่ 4.5 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก (ก) ปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อลิตร) (ข) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (ค) และค่าพีเอชของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ชั่วโมง ที่ 6, 12, 24, 48, 54, 72, 96 และ 120 ตามลำดับโดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

4.3 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและการผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 2 และแร่ธาตุ 3 ชนิด ได้แก่ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวย์เป็นตัวทำละลาย ศึกษาการผลิตกรดแลกติกระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 120 ชั่วโมงและศึกษาการผลิตกรดโดยใช้ถังหมัก 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดใน อัตรา 100 รอบต่อนาทีและมีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 ตลอดการทดลอง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า การเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* โดยใช้ถังหมัก ขนาด 2 ลิตร การผลิตกรดแลกติก ผลผลิต อัตราการผลิต (7.26, 0.187 และ 0.151 ตามลำดับ) จะมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงโดยใช้ฟลาสก์ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$ และ $P < 0.05$) (ดังตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ค่า p-value การเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักและฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 โดยใช้วิธี T- test

	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (Yield)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)
ฟลาสก์	5.49	0.145	0.114	12.95
ถังหมัก	7.26	0.187	0.151	11.79
p-value	0.000	0.000	0.000	0.000

หมายเหตุ

ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

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

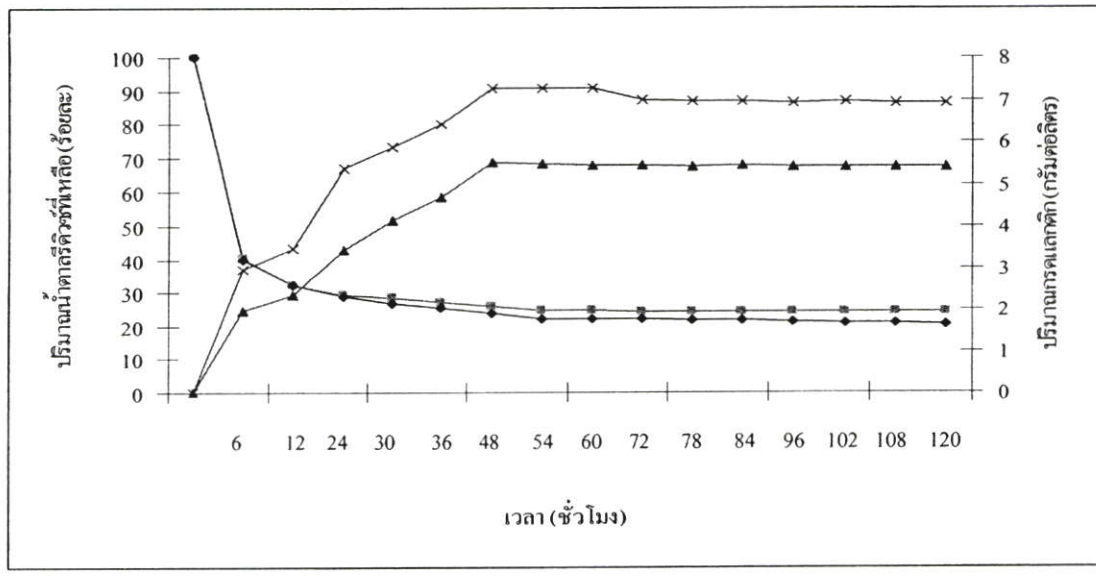
ค่า p – value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่า การผลิตในถังหมักมีการควบคุมสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมคือ ควบคุมพีเอช ที่ 6.5 อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mostafa (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ Idris and Suzana (2006) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจาก

วัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสัปปะรด โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่าที่พีเอช 6.5 การใช้ปริมาณน้ำตาลจะเร็วและให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง

นอกจากนี้การหมักในถังหมักมีการกวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที ซึ่งการกวนมีผลทำให้เกิดการผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อกับเชื้อที่ใช้ในการหมักทำให้เชื้อสามารถใช้สารอาหารที่อยู่ในถังหมักได้ดียิ่งขึ้น ทำให้ได้ปริมาณกรดมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Gao *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* NBRC 3863 ซึ่งใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร มีการกวนโดยใช้ความเร็ว 100 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงถึง 87 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341เมื่อทำการหมักในถังหมักจึงดีกว่าการหมักในฟลาสก์ เพราะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าเนื่องจากการผลิตกรดในถังหมักสามารถควบคุมพีเอช อุณหภูมิ และมีการกวน จึงทำให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก



ปริมาณกรดแลกติกในฟลาสก์

ปริมาณกรดแลกติกในถังหมัก

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ในฟลาสก์

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ในถังหมัก

รูปที่ 4.6 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและการผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตร ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341พบว่าเวย์ที่นำมาเป็นสารตั้งต้นมีแหล่งคาร์บอนที่อุดมสมบูรณ์แต่ยังขาดแหล่งไนโตรเจนและแหล่งแร่ธาตุที่เพียงพอต่อการผลิตกรดแลกติกดังนั้นในการนำเวย์มาใช้จึงจำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจนและแหล่งแร่ธาตุ นอกจากสารอาหารที่ต้องเติมแล้วสภาวะในการหมักยังเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตกรดแลกติก ได้แก่ สภาวะในการหมักที่เหมาะสม คือ สภาวะนิ่งและที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกที่สำคัญคือแคลเซียมคาร์บอเนตโดยสามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เวย์เป็นสารตั้งต้น คือ เวย์เติมสารสกัดยีสต์และเปปโตนปริมาณร้อยละ 0.5 และ 1 ตามลำดับ เติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณร้อยละ 2 เติมแหล่งแร่ธาตุ ซึ่งประกอบด้วย แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.1 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรกับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าการผลิตในถังหมักจะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าการผลิตในฟลาสก์ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 7.26 และ 5.49 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

บรรณานุกรม

ชลัท ศานติวรางคณา.2534. " การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเครื่องดื่มจากเวย์." **ปัญหาพิเศษภาควิชาอุตสาหกรรม คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง** กรุงเทพฯ.

ปนัดดา จันทร์เนย,ภิรมย์รัตน์ รักญาติและวรลักษณ์ อังศุวรางกูร.2545. "การหมักกรดแลคติคด้วย *Pediococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. และการกู้ผลผลิตด้วยตัวทำละลายอินทรีย์" **Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University**.

ลัญจกร จันทร์อุดม,สุกัญญา จันทะชุม และอรัญ หันพงศ์กิตติกูล.2548. "การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจาก *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11." **Songklanakarin J. Sci. Technol Vol 27 (Suppl.3)**.817 – 824.

วนปรัสต์ กัลยาวงษ์,ศิววรรณ พูลพันธุ์, วิทยา ปั้นสุวรรณและอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์.2545. "การเจริญและการสร้างสารให้กลิ่นรสของแบคทีเรียแลกติกในหางนมจากเนยแข็ง." **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28**.กรุงเทพฯ.565.

วรรณา ตั้งเจริญชัย.2532. **เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการนมและผลิตภัณฑ์นม ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร**. คณะเทคโนโลยีการเกษตร.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

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

ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ .2526.การผลิตผลิตภัณฑ์นมและการจัดการ. **เอกสารการฝึกอบรมเกี่ยวกับเทคโนโลยีอาหารนม ชุดที่3**.สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์. เชียงใหม่. 262.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล.2544.**วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2.**สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ศิริโภค.2544.**จุลชีวอุตสาหกรรม.**กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

Alfa – Laval.1987.Dairy Handbook.**Food Engineering AB**.Sweden.333.

A.O.A.C. 2000. Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists. **14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.**

Altaf,M.,Naveena,B.J. and Reddy,G..2005. "Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L(+) lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation." **Food technol Biotechnol 43(3)** : 235 – 239.

Altaf,Md..Naveena,B.F..Venkateshwan,M..Kumar,E.V. and Reddy,G..2006. "Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF

using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast –Optimization by RSM." **Process Biochemistry (41)** : 465-472.

Anders and Mikael 2002

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.

Bogdanova,G.J..1974.**New whole products of improve quality(in Russian)**.Moscow.Pishcevaya Promishlenost.

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

Datta,R.Tsai,S.p..Bonsignore,P.Moon,S.H.Frank,J.R..1995. "Technological and economic potential of Poly (lactic acid) and lactic acid derivatives." **FEMS Microbiology Reviews(16)**:221 – 231.

Dailey,O.D.,Dowd,M.K. and Mayorga,J.C..2000. "Influences of lactic acid on the solubilization of protein during steeping . **J. Agric. Food Chem.(48)**: 1352 – 1357.

Ding,S.F. and Tan,T..2006. " L-lactic acid production by Lactobacillus casei fermentation using different fed – batch feeding strategies." **Process Biochemistry** : 1451-1454.

Dobois, M., Gill, K.A., Hamilton, J.K., Rebersand, P.A. and Smith, F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". **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." **J. of Engineering and Environmental Science.(22)** :371 – 376 .

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

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

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

Fitzpatrick,J.J..Murphy,C.Mota,F.M..Pauli,T..2003. " Impurity and cost considerations for nutrient supplementation of whey permeate fermentations to produce lactic acid for biodegradable plastics." **International Dairy Journal (13)** : 575 – 580.

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.

Ganguly,R..Dwivedi,P..Sing,R.P..2007. "Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU 2-10." **Bioresource Technology (98)**:1246-1251.

Gao,M.T..Hirata,M..Toorisaka,E. And Hano,T..2006. "Acid – hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation." **Bioresource Technology (97):**2414 – 2420.

Gardner,W.H.. 1972. "Acidulants in food processing." **Hand book of food additives 2 nd ed. Vol 1**: 225 – 270.

Goaafery, T. and Reichelt,J..1983.**Induatail enzymology**.Mac Millian Pull.,Ltd..United Kingdom.237.

Gonzalez vara et el1996

Gurr,M.J..Marshall,V.M..Fuller,F..1984.**Fermented milk intestinal microflora and nutrition : In ferment milk**.IDF Bullet in Dec.

Hansen 1951

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..E.H.,Morth and D.G. Vahaleris.1973.Cottage cheese,In M.E. Schwartz.**Cheese marking technology**.Noyes Data corporation,Park Rideg.New Jersey. 7 – 12.

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

John et al 2006

Kadam, S.R..Patil,SS..Bastawde,KB..Khire,J.M.. and Gokhale,D.V..2006.. "Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production." **Process Biochemistry (41)** :72 – 126.

Kargi and Ozmichi 2006

Kosikowski,F.V..1977.Cheeses and fermented milk foods.**Enwards Erothers. Inc. Ann. Arbor.** Michigan. 701.

Kourkoutas,Y..Xolias,V..Kallis,M..Bezirtzoglou,E..Kanellaki,M.. 2005. "*Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive,fermented milk and lactic acid production." **Process Biochemistry (40)** : 411 – 416.

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

Lee,K.2005 . " Comparison of fermentative capacities of Lactobacilli in single and mixed culture in industrial media."**Process Biochemistry (40)** : 1559 – 1564.

Marshall,K.R.. 1982.In : Developments in Dairy Chemistry.1. Proteins, Fox,P.F..**Appl. Sci.Publish.**,London and New York.339.

Mostafa,N.A..1996. " Production of lactic acid from whey with agar immobilized cells in a continuous packed tubular reactor." **Energy Convers.Mgmt Vol.37 No3.** : 253 – 260.

Muller,V..2001.. "Bacterial Fermentation." **Encyclopedia of life Science** : 1- 7 .

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

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

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

Nielsen, E.W. and Ullum, J.A. 1989. **Dairy Technology**. Danish Turnkey Dairies Ltd., New York. 418 .

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

Ohkouchi,Y 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.** 106 .

Priest and Campbell 1996

Renner,E..1983.**Milk and Dairy Productions in Human Nutritiony**.Volles.Verl.Munchen.

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.

Saha,B.C..2006 "Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B- 3693." **Enzyme and Microbial Technology (39)** :991-995.

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

Scott,R.1986.Cheese making practise.**Elsevier Applica.Science Publishers**.London.529.

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

Sneath et al1984

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

Stiles and Holzapfel 1997

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

Vishu,C..naveena,B.J..altaf,M..Venkateshwar,M..2006. "Amylopullulanase –Anovel enzyme of *Lactobacillus amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid." **Enzyme and Microbial Technology (38)** :545- 550.

Ward.1996.**Iron and Infection : New Developments and their Implications.J. of Trauma injury Infection and Critical Care.Vol.41.No. 2** : 356 – 364.

Webb,B.H. and E.O.Whitter.1970.By products from milk. **The AVI Publishing Company,Inc**,.Westport, Connecticut.428.

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

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

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

Westerguard,V..1983. Milk Power Technology Evaporations and Spray Drying. **AIS Nitro – Atomizer**. Copenhagen. Denmark.147.

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

Xu,z..Wang,Q..Wang,P..Cheng,G..Ji,Y..Jiang,Z..2006. "Production of lactic acid from soybean stalk hydrolysate with *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus casei* ." **Process Biochemistry.**

Yun,J.S..Wee,Y.J.Ryu,H.W..2003. "Production of optically pure L(+) – lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY 1 ." **Enzyme and Microbial Technology(33)**:416 – 423.

Zadow,J.G..1991.Lactose Utilisation.**CSIRO Reserecher Quarterly.51 (1,2)** :99 – 106.

www.brighton73.freeserve.co.uk

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

www.lactospore.com

www.ratjes.nl/ lactose.html

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

(meat extract)	10	กรัม
สารสกัดยีสต์	5	กรัม
เปปโตน	10	กรัม
ดี –กลูโคส (D – glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอตเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมซิเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . 4H_2O$)	0.05	กรัม

วิธีการ

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

1.2 อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

(meat extract)	10	กรัม
สารสกัดยีสต์ (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

ไตรแอมโมเนียมซิเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . 4 H_2O$)	0.05	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

วิธีการ

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

2. สารเคมี

สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 3

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

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

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

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. น้ำหนักเซลล์แห้ง

วิธีการ

1.เตรียมหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน

2.ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยของเซลล์ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

3.นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนลอยที่แช่แข็งเก็บไว้สำหรับการวิเคราะห์ค่าปริมาณน้ำตาลและกรดแลกติก

4.เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองและนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 1 – 2 ครั้ง

5.รินส่วนลอยน้ำทิ้ง นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

6.ทิ้งให้เย็นใน desicator และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

7.คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งจาก

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

2. การวิเคราะห์น้ำตาลแลกโตส วิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dobois,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

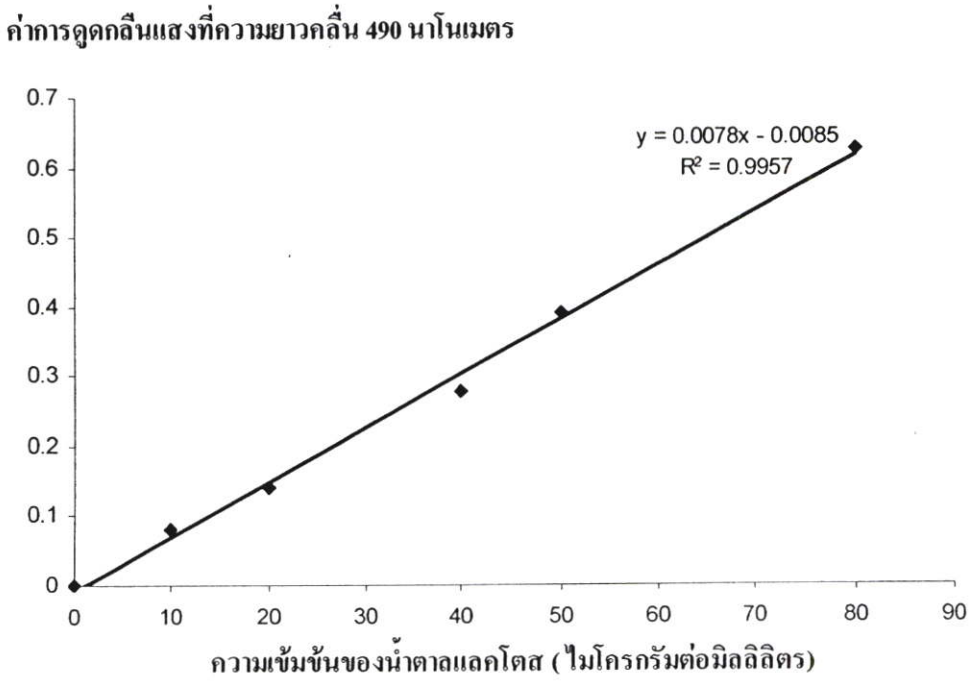
หลอดที่	สารละลายแลคโตส (400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายแลคโตส มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0	1000	0
2	25	975	10
3	50	950	20
4	100	900	40
5	125	875	50
6	200	800	80

วิธีการ

1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายแลคโตสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆปล่อยลงที่ข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของแลคโตส ในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

ความเข้มข้นของแลคโตส(กรัมต่อลิตร) = (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร)x(อัตราการเจือจาง)
(ความชันของกราฟมาตรฐาน)x(1,000)



รูปที่ ข - 1 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้น 0 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Column (HPLC)

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

คอลัมภ์ : Inertsil C8 – 3

เฟสเคลื่อนที่ : โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ : 20 ไมโครลิตร

เวลาที่ใช้ในการวิเคราะ ห์ต่อ 1 ตัวอย่าง : 30 นาที

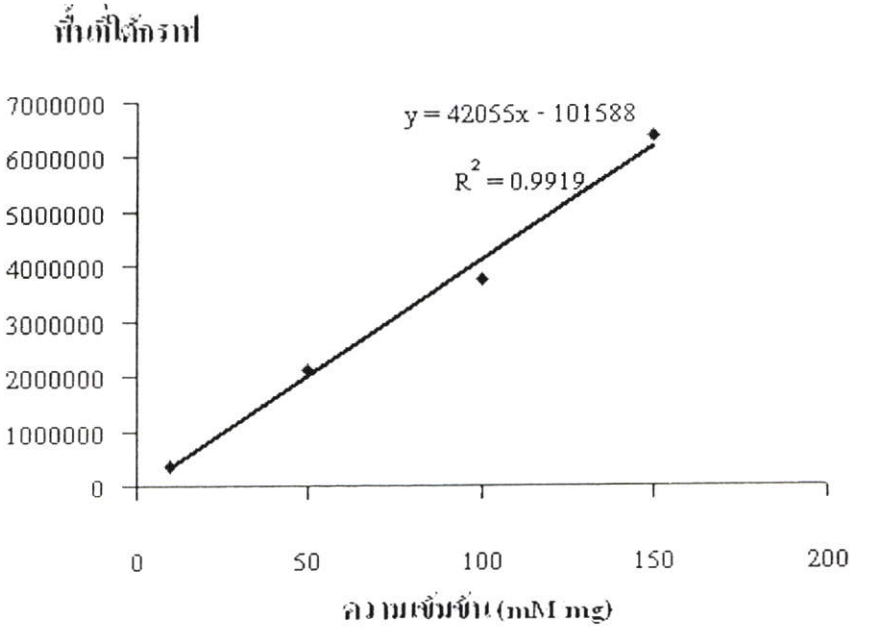
เครื่องตรวจสอบ : เครื่อง UV visible ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

การเตรียมตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ : ตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้มาจากส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงจากตัวอย่างที่เก็บ เพื่อทำการวิเคราะห์ทุกชั่วโมง กรองส่วนใสผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45ไมโครเมตร ก่อนการวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วยเครื่อง HPLC

3.2 วิธีการ

1. ทำการฉีดสารตัวอย่างที่ผ่านการกรอง เข้าสู่เครื่อง HPLC

2.นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์มาทำการคำนวณปริมาณกรดแลกติกที่มีในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแลกติก



รูปที่ ข - 2 แสดงกราฟมาตรฐานกรดแลกติก

ภาคผนวก ค

วิธีคำนวณค่าจลนพลศาสตร์

ค – 1 ผลผลิตที่ได้ (Yield, $Y_{x/s}$)

$$Y_{x/s} = \Delta X / \Delta S$$

ΔX = ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้น

ΔS = ปริมาณสับสเตรทที่ถูกใช้ไป

ค – 2 อัตราการผลิตผลผลิต (Q_p)

$$Q_p = \Delta p/t$$

Δp = ผลได้ของผลผลิตที่เกิดขึ้น

t = เวลาที่ผลิตผลิตภัณฑ์

ภาคผนวก ง

ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 9 สูตร

ตารางที่ ง - 1 ผลปริมาณกรดแลกติกในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 9 สูตร เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / สูตรอาหาร	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
1	0.68 ^{de}	0.89 ^{c}	1.07 ^{c}	1.11 ^{c}	1.12 ^{c}	1.15 ^{d}	1.13 ^{c}	0.83 ^{d}	0.73 ^{b}	0.59 ^{a}
2	0.9 ^{bc}	1.24 ^{ab}	1.57 ^{ab}	1.62 ^{b}	1.63 ^{b}	1.75 ^{ab}	1.64 ^{a}	1.51 ^{a}	1.2 ^{ab}	1.04 ^{a}
3	0.93 ^{bc}	1.23 ^{ab}	1.64 ^{a}	1.68 ^{ab}	1.71 ^{ab}	1.72 ^{ab}	1.7 ^{a}	1.69 ^{a}	1.32 ^{ab}	1.07 ^{a}
4	1.13 ^{a}	1.35 ^{a}	1.71 ^{a}	1.76 ^{a}	1.78 ^{a}	1.82 ^{a}	1.69 ^{a}	1.56 ^{a}	1.44 ^{a}	1.16 ^{a}
5	0.55 ^{c}	1.11 ^{b}	1.4 ^{b}	1.47 ^{cd}	1.5 ^{cd}	1.55 ^{c}	1.35 ^{b}	1.09 ^{cd}	0.94 ^{ab}	0.69 ^{a}
6	0.77 ^{cd}	1.34 ^{a}	1.54 ^{ab}	1.57 ^{bc}	1.62 ^{bc}	1.67 ^{b}	1.65 ^{a}	1.59 ^{a}	1.41 ^{ab}	1.17 ^{a}
7	0.87 ^{bc}	1.25 ^{ab}	1.55 ^{ab}	1.62 ^{b}	1.68 ^{ab}	1.74 ^{ab}	1.67 ^{a}	1.48 ^{ab}	1.17 ^{ab}	0.73 ^{a}
8	0.79 ^{bcd}	1.14 ^{ab}	1.42 ^{b}	1.42 ^{d}	1.42 ^{d}	1.46 ^{c}	1.25 ^{bc}	1.17 ^{bc}	1.04 ^{ab}	0.83 ^{a}
9	0.97 ^{ab}	1.22 ^{ab}	1.39 ^{b}	1.46 ^{cd}	1.49 ^{d}	1.53 ^{c}	1.4 ^{b}	1.38 ^{abc}	1.14 ^{ab}	0.91 ^{a}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-2 ผลน้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 9 สูตร เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / สูตรอาหาร	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
1	0.2 ^{c}	0.3 ^{d}	0.4 ^{d}	0.42 ^{c}	0.43 ^{e}	0.43 ^{c}	0.43 ^{e}	0.44 ^{d}	0.46 ^{e}	0.46 ^{d}
2	1.95 ^{b}	3.0 ^{a}	4.02 ^{a}	4.20 ^{ab}	4.32 ^{ab}	5.03 ^{ab}	5.06 ^{ab}	5.2 ^{ab}	5.39 ^{ab}	5.34 ^{a}
3	2.4 ^{a}	3.11 ^{a}	3.64 ^{ab}	3.79 ^{ab}	3.88 ^{bc}	4.22 ^{bc}	4.27 ^{bc}	4.33 ^{bc}	4.45 ^{bc}	4.33 ^{bc}
4	2.11 ^{b}	3.3 ^{a}	4.53 ^{a}	4.74 ^{a}	4.9 ^{a}	5.73 ^{a}	5.79 ^{a}	5.99 ^{a}	5.95 ^{a}	5.91 ^{a}
5	0.74 ^{d}	1.09 ^{c}	1.44 ^{c}	1.5 ^{d}	1.58 ^{d}	1.6 ^{d}	1.60 ^{d}	1.56 ^{d}	1.58 ^{d}	1.33 ^{d}
6	2.09 ^{b}	2.42 ^{b}	2.85 ^{b}	2.95 ^{c}	3.01 ^{c}	3.52 ^{c}	3.53 ^{c}	3.55 ^{c}	3.6 ^{c}	3.24 ^{c}
7	1.36 ^{c}	2.43 ^{b}	3.74 ^{ab}	3.82 ^{a}b	4.06 ^{ab}	4.71 ^{ab}	4.78 ^{ab}	5.34 ^{ab}	5.23 ^{ab}	5.2 ^{ab}
8	0.74 ^{d}	1.03 ^{c}	1.19 ^{cd}	1.22 ^{de}	1.25 ^{de}	1.33 ^{de}	1.35 ^{de}	1.36 ^{d}	1.37 ^{de}	1.35 ^{d}
9	0.85 ^{d}	1.44 ^{c}	1.54 ^{c}	1.57 ^{d}	1.58 ^{d}	1.6 ^{d}	1.55 ^{d}	1.54 ^{d}	1.51 ^{de}	1.47 ^{d}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)ในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 9 สูตร เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / สูตรอาหาร	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
1	80.45 ^{c}	71.07 ^{d}	62.35 ^{e}	61.07 ^{d}	57.64 ^{d}	48.97 ^{de}	46.52 ^{e}	41.73 ^{e}	41.06 ^{d}	38.04 ^{d}
2	90.76 ^{b}	84.30 ^{c}	77.92 ^{d}	76.03 ^{c}	73.75 ^{c}	68.68 ^{c}	66.82 ^{d}	65.50 ^{d}	64.36 ^{c}	63.55 ^{c}
3	90.05 ^{b}	87.89 ^{b}	82.23 ^{b}	81.03 ^{b}	77.77 ^{b}	70.16 ^{c}	69.73 ^{c}	69.44 ^{c}	68.3 ^{b}	66.69 ^{bc}
4	77.62 ^{d}	69.62 ^{de}	59.88 ^{f}	58.40 ^{e}	55.74 ^{d}	46.25 ^{e}	44.48 ^{f}	39.80 ^{ef}	37.48 ^{e}	36.37 ^{de}
5	92.32 ^{b}	88.61 ^{ab}	80.82 ^{bc}	79.43 ^{b}	77.89 ^{b}	73.21 ^{b}	72.16 ^{b}	69.84 ^{c}	69.35 ^{b}	68.47 ^{ab}
6	91.25 ^{b}	82.56 ^{c}	79.61 ^{cd}	76.79 ^{c}	75.21 ^{c}	74.26 ^{b}	73.01 ^{b}	71.88 ^{b}	70.25 ^{b}	69.51 ^{ab}
7	74.49 ^{c}	70.91 ^{de}	61.44 ^{ef}	59.14 ^{de}	57.81 ^{d}	49.38 ^{d}	47.74 ^{e}	38.48 ^{fg}	36.74 ^{e}	35.51 ^{de}
8	95.28 ^{a}	90.52 ^{a}	86.69 ^{a}	84.18 ^{a}	83.12 ^{a}	77.94 ^{a}	76.71 ^{a}	74.47 ^{a}	73.07 ^{a}	71.34 ^{a}
9	75.63 ^{de}	68.74 ^{e}	59.41 ^{f}	57.25 ^{e}	55.76 ^{d}	50.17 ^{d}	47.38 ^{e}	36.53 ^{g}	35.06 ^{e}	32.85 ^{e}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-4 พีเอชในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 9 สูตร เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / สูตรอาหาร	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
1	5.39 ^{d}	4.98 ^{c}	4.88 ^{bc}	4.85 ^{ab}	4.84 ^{a}	4.83 ^{a}	4.93 ^{a}	5.05 ^{a}	5.11 ^{a}	5.19 ^{a}
2	5.58 ^{b}	4.78 ^{c}	4.77 ^{cf}	4.74 ^{d}	4.70 ^{ab}	4.64 ^{c}	4.74 ^{bc}	4.89 ^{bc}	4.94 ^{bc}	4.96 ^{c}
3	5.45 ^{c}	5.32 ^{a}	4.81 ^{de}	4.78 ^{cd}	4.70 ^{ab}	4.60 ^{d}	4.67 ^{c}	4.74 ^{d}	4.77 ^{d}	4.79 ^{d}
4	5.35 ^{e}	4.87 ^{d}	4.75 ^{f}	4.62 ^{e}	4.57 ^{ab}	4.50 ^{e}	4.54 ^{d}	4.57 ^{e}	4.61 ^{e}	4.63 ^{e}
5	5.64 ^{a}	4.98 ^{c}	4.83 ^{cd}	4.79 ^{bcd}	4.51 ^{b}	4.72 ^{b}	4.85 ^{ab}	5.06 ^{a}	5.08 ^{a}	5.15 ^{ab}
6	5.56 ^{b}	5.20 ^{b}	5.00 a	4.87 ^{a}	4.81 ^{ab}	4.69 ^{b}	4.93 ^{a}	4.97 ^{ab}	5.01 ^{ab}	5.02 ^{bc}
7	5.12 ^{g}	4.90 ^{d}	4.84 ^{cd}	4.83 ^{abc}	4.72 ^{ab}	4.62 ^{cd}	4.78 ^{bc}	4.82 ^{cd}	4.84 ^{cd}	4.92 ^{cd}
8	5.30 ^{f}	5.00 ^{c}	4.90 ^{b}	4.81 ^{abc}	4.80 ^{ab}	4.69 ^{b}	4.83 ^{ab}	4.84 ^{bcd}	4.86 ^{cd}	5.00 ^{bc}
9	4.90 ^{h}	4.89 ^{d}	4.84 ^{cd}	4.77 ^{cd}	4.75 ^{ab}	4.70 ^{b}	4.75 ^{bc}	4.76 ^{cd}	4.78 ^{d}	4.87 ^{cd}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-5 ปริมาณกรดแลกติกในการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / สูตรอาหาร	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
1	1.16 ^{bc}	1.38 ^{ab}	1.52 ^{ab}	1.55 ^{b}	1.58 ^{ab}	1.68 ^{ab}	1.66 ^{ab}	1.58 ^{ab}	1.57 ^{ab}	1.46 ^{ab}
2	1.03 ^{c}	1.25 ^{b}	1.29 ^{c}	1.44 ^{b}	1.31 ^{c}	1.6 ^{bc}	1.6 ^{bc}	1.54 ^{b}	1.5 ^{abc}	1.45 ^{ab}
3	1.3 ^{a}	1.51 ^{a}	1.7 ^{a}	1.72 ^{a}	1.74 ^{a}	1.77 ^{a}	1.76 ^{a}	1.7 ^{a}	1.64 ^{a}	1.6 ^{a}
4	1.15 ^{bc}	1.28 ^{b}	1.49 ^{bc}	1.54 ^{b}	1.57 ^{ab}	1.61 ^{bc}	1.6 ^{bc}	1.58 ^{ab}	1.56 ^{abc}	1.53 ^{ab}
5	1.16 ^{bc}	1.27 ^{b}	1.49 ^{bc}	1.51 ^{b}	1.54 ^{b}	1.58 ^{bc}	1.55 ^{c}	1.53 ^{b}	1.46 ^{abc}	1.38 ^{ab}
6	1.12 ^{bc}	1.22 ^{b}	1.43 ^{bc}	1.45 ^{b}	1.5 ^{b}	1.6 ^{bc}	1.54 ^{c}	1.53 ^{b}	1.44 ^{bc}	1.36 ^{ab}
7	1.18 ^{ab}	1.24 ^{b}	1.41 ^{bc}	1.45 ^{b}	1.49 ^{b}	1.54 ^{c}	1.51 ^{c}	1.49 ^{b}	1.38 ^{c}	1.22 ^{b}
8	1.17 ^{abc}	1.32 ^{b}	1.46 ^{bc}	1.52 ^{b}	1.58 ^{ab}	1.74 ^{a}	1.72 ^{a}	1.7 ^{a}	1.62 ^{ab}	1.45 ^{ab}
9	1.16 ^{abc}	1.32 ^{b}	1.49 ^{bc}	1.53 ^{b}	1.61 ^{ab}	1.73 ^{a}	1.7 ^{ab}	1.7 ^{a}	1.64 ^{a}	1.53 ^{ab}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-6 น้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / สูตรอาหาร	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
1	0.77 ^{bc}	1.12 ^{bcd}	1.36 ^{bc}	1.41 ^{bcd}	1.45 ^{b}	1.5 ^{c}	1.5 ^{bc}	1.5 ^{bc}	1.47 ^{ab}	1.47 ^{ab}
2	0.53 ^{d}	0.95 ^{d}	1.20 ^{bc}	1.23 ^{cd}	1.23 ^{c}	1.24 ^{d}	1.23 ^{d}	1.23 ^{d}	1.09 ^{bc}	1.0 ^{abc}
3	1.01 ^{a}	1.38 ^{ab}	1.8 ^{a}	1.83 ^{a}	1.85 ^{a}	1.91 ^{a}	1.90 ^{a}	1.94 ^{a}	1.68 ^{a}	1.56 ^{a}
4	0.87 ^{abc}	1.07 ^{cd}	1.45 ^{bc}	1.46 ^{bc}	1.46 ^{b}	1.48 ^{c}	1.45 ^{c}	1.35 ^{cd}	1.17 ^{abc}	1.09 ^{abc}
5	0.43 ^{de}	0.67 ^{cf}	0.86 ^{d}	0.88 ^{e}	0.92 ^{d}	0.98 ^{e}	0.98 ^{e}	0.99 ^{e}	0.97 ^{bc}	0.93 ^{bc}
6	0.74 ^{c}	0.9 ^{de}	1.18 ^{c}	1.2 ^{d}	1.30 ^{c}	1.32 ^{d}	1.32 ^{d}	1.33 ^{cd}	1.11 ^{bc}	1.01 ^{abc}
7	0.37 ^{e}	0.55 ^{f}	0.73 ^{d}	0.76 ^{e}	0.77 ^{e}	0.81 ^{f}	0.88 ^{e}	0.88 ^{e}	0.77 ^{c}	0.75 ^{c}
8	0.77 ^{c}	1.28 ^{abc}	1.44 ^{bc}	1.49 ^{bc}	1.54 ^{b}	1.62 ^{b}	1.60 ^{b}	1.6 ^{b}	1.47 ^{ab}	1.36 ^{abc}
9	0.91 ^{ab}	1.41 ^{a}	1.53 ^{ab}	1.56 ^{b}	1.52 ^{b}	1.51 ^{c}	1.48 ^{c}	1.45 ^{bcd}	1.31 ^{ab}	1.06 ^{abc}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)ในการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / สูตรอาหาร	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
1	57.63 ^{c}	54.26 ^{de}	53.80 ^{d}	53.26 ^{d}	53.17 ^{e}	52.86 ^{d}	51.68 ^{d}	50.10 ^{d}	48.03 ^{b}	44.51 ^{bcd}
2	63.30 ^{a}	61.78 ^{bc}	61.71 ^{bc}	61.66 ^{c}	61.28 ^{c}	60.19 ^{b}	59.74 ^{bc}	57.12 ^{bc}	55.36 ^{a}	53.26 ^{a}
3	59.84 ^{b}	55.95 ^{d}	54.44 ^{d}	54.09 ^{d}	53.14 ^{e}	49.62 ^{e}	48.79 ^{e}	48.04 ^{d}	46.78 ^{b}	44.41 ^{bcd}
4	57.72 ^{c}	61.09 ^{c}	60.72 ^{c}	60.54 ^{c}	59.25 ^{d}	58.65 ^{c}	58.84 ^{c}	56.02 ^{c}	54.51 ^{a}	51.08 ^{ab}
5	63.61 ^{a}	65.89 ^{a}	64.90 ^{a}	64.08 ^{a}	64.20 ^{a}	62.39 ^{a}	61.17 ^{ab}	59.20 ^{ab}	57.72 ^{a}	49.48 ^{abc}
6	64.40 ^{a}	62.46 ^{bc}	62.33 ^{bc}	62.24 ^{bc}	62.19 ^{bc}	62.12 ^{a}	59.91 ^{bc}	58.70 ^{ab}	56.96 ^{a}	53.14 ^{a}
7	65.13 ^{a}	63.50 ^{b}	63.39 ^{bc}	63.37 ^{ab}	63.28 ^{ab}	63.10 ^{a}	62.77 ^{a}	60.99 ^{a}	60.01 ^{a}	52.74 ^{a}
8	56.14 ^{cd}	54.41 ^{de}	53.28 ^{d}	52.78 ^{d}	52.34 ^{e}	51.58 ^{d}	51.33 ^{d}	49.93 ^{d}	47.66 ^{b}	42.83 ^{cd}
9	55.47 ^{d}	53.18 ^{e}	52.86 ^{d}	52.36 ^{d}	52.08 ^{e}	51.73 ^{d}	51.34 ^{d}	49.95 ^{d}	47.74 ^{b}	41.13 ^{d}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-8 พีเอชในการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / สูตรอาหาร	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
1	5.20 ^{c}	4.78 ^{c}	4.59 ^{e}	4.60 ^{cf}	4.57 ^{c}	4.55 ^{c}	4.58 ^{ab}	4.59 ^{b}	4.63 ^{ab}	4.65 ^{c}
2	5.23 ^{b}	4.78 ^{c}	4.70 ^{c}	4.67 ^{d}	4.62 ^{bc}	4.60 ^{a}	4.61 ^{a}	4.64 ^{ab}	4.69 ^{ab}	4.70 ^{abc}
3	5.17 ^{e}	4.73 ^{de}	4.71 ^{c}	4.63 ^{d}e	4.59 ^{c}	4.55 ^{c}	4.55 ^{b}	4.58 ^{b}	4.72 ^{ab}	4.72 ^{abc}
4	5.19 ^{cd}	4.75 ^{d}	4.59 ^{c}	4.58 ^{f}	4.59 ^{c}	4.58 ^{abc}	4.58 ^{ab}	4.62 ^{ab}	4.77 ^{a}	4.78 ^{ab}
5	5.18 ^{d}	4.71 ^{e}	4.58 ^{e}	4.59 ^{cf}	4.59 ^{c}	4.57 ^{bc}	4.59 ^{a}	4.61 ^{ab}	4.64 ^{ab}	4.66 ^{bc}
6	5.18 ^{de}	4.71 ^{e}	4.63 ^{d}	4.62 ^{e}	4.61 ^{c}	4.59 ^{ab}	4.60 ^{a}	4.61 ^{ab}	4.63 ^{ab}	4.66 ^{bc}
7	5.20 ^{c}	4.90 ^{b}	4.78 ^{b}	4.75 ^{c}	4.72 ^{a}	4.61 ^{a}	4.1 ^{a}	4.70 ^{a}	4.77 ^{a}	4.79 ^{a}
8	5.23 ^{b}	5.00 ^{a}	4.88 ^{a}	4.80 ^{b}	4.68 ^{ab}	4.57 ^{bc}	4.58 ^{ab}	4.60 ^{ab}	4.65 ^{ab}	4.66 ^{bc}
9	5.25 ^{a}	5.00 ^{a}	4.89 ^{a}	4.86 ^{a}	4.72 ^{a}	4.58 ^{abc}	4.59 ^{ab}	4.60 ^{ab}	4.60 ^{b}	4.60 ^{c}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-9 ปริมาณกรดแลกติกในการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะนิ่งและความเร็วรอบ เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชั่วโมง / สภาวะ	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
นิ่ง	0.6 ^{a}	1.12 ^{a}	1.42 ^{a}	1.5 ^{a}	1.6 ^{a}	1.77 ^{a}	1.72 ^{a}	1.69 ^{a}	1.59 ^{a}	1.49 ^{a}
50	0.55 ^{a}	1.05 ^{a}	1.37 ^{a}	1.42 ^{a}	1.5 ^{b}	1.62 ^{b}	1.56 ^{b}	1.5 ^{b}	1.4 ^{ab}	1.37 ^{ab}
70	0.52 ^{a}	1.08 ^{a}	1.32 ^{a}	1.41 ^{a}	1.48 ^{b}	1.55 ^{bc}	1.49 ^{bc}	1.44 ^{bc}	1.36 ^{b}	1.32 ^{ab}
100	0.39 ^{b}	0.85 ^{ab}	1.11 ^{b}	1.27 ^{b}	1.35 ^{c}	1.49 ^{cd}	1.43 ^{c}	1.36 ^{c}	1.28 ^{b}	1.23 ^{abc}
150	0.33 ^{b}	0.84 ^{ab}	1.08 ^{b}	1.21 ^{bc}	1.33 ^{c}	1.43 ^{d}	1.39 ^{c}	1.33 ^{c}	1.24 ^{b}	1.09 ^{bc}
200	0.23 ^{c}	0.53 ^{b}	1.04 ^{b}	1.09 ^{c}	1.13 ^{d}	1.16 ^{e}	1.13 ^{d}	1.03 ^{d}	0.96 ^{c}	0.87 ^{c}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-10 น้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะนิ่งและความเร็วรอบ เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชั่วโมง / สภาวะ	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
นิ่ง	0.45 ^{b}	0.7 ^{d}	1.00 ^{b}	1.03 ^{c}	1.14 ^{c}	1.24 ^{c}	1.24 ^{d}	1.13 ^{c}	0.97 ^{b}	0.82 ^{ab}
50	0.77 ^{ab}	1.1 ^{cd}	1.82 ^{ab}	1.86 ^{b}	1.97 ^{b}	2.15 ^{b}	1.90 ^{c}	1.66 ^{b}	1.57 ^{ab}	0.87 ^{ab}
70	0.93 ^{a}	1.82 ^{ab}	2.00 ^{a}	2.64 ^{ab}	2.64 ^{a}	2.79 ^{a}	2.52 ^{b}	1.7 ^{b}	1.36 ^{ab}	0.63 ^{b}
100	1.03 ^{a}	2.32 ^{a}	2.74 ^{a}	2.78 ^{a}	2.83 ^{a}	2.95 ^{a}	2.46 ^{b}	2.25 ^{a}	1.86 ^{a}	1.56 ^{a}
150	1.00 ^{a}	1.49 ^{bc}	2.25 ^{a}	2.45 ^{ab}	2.77 ^{a}	3.25 ^{a}	3.13 ^{a}	2.53 ^{a}	1.79 ^{a}	1.37 ^{ab}
200	1.05 ^{a}	1.62 ^{bc}	2.6 ^{a}	2.72 ^{a}	2.92 ^{a}	3.13 ^{a}	2.92 ^{a}	2.31 ^{a}	1.54 ^{ab}	0.86 ^{ab}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-11 น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)ในการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะนิ่งและความเร็วรอบ เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชั่วโมง / สภาวะ	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
นิ่ง	59.84 ^{c}	55.95 ^{c}	54.44 ^{cd}	54.09 ^{c}	53.14 ^{c}	49.62 ^{d}	48.79 ^{d}	48.04 ^{c}	46.78 ^{c}	44.41 ^{bc}
50	67.36 ^{c}	59.92 ^{c}	56.35 ^{c}	55.22 ^{c}	52.85 ^{c}	47.28 ^{d}	46.52 ^{d}	43.38 ^{d}	40.03 ^{e}	36.96 ^{d}
70	68.52. ^{bc}	57.58 ^{d}	50.90 ^{e}	50.50 ^{d}	49.98 ^{d}	48.59 ^{d}	47.82 ^{d}	43.47 ^{d}	43.44 ^{d}	41.95 ^{cd}
100	64.25 ^{d}	56.23 ^{de}	54.13 ^{d}	53.14 ^{c}	52.73 ^{c}	52.41 ^{c}	51.89 ^{c}	46.37 ^{c}	44.48 ^{d}	42.75 ^{cd}
150	69.71 ^{b}	67.18 ^{b}	62.21 ^{b}	60.82 ^{b}	59.71 ^{b}	56.35 ^{b}	55.76 ^{b}	53.94 ^{b}	50.18 ^{b}	49.24 ^{ab}
200	72.13 ^{a}	68.76 ^{a}	65.06 ^{a}	63.92 ^{a}	63.80 ^{a}	62.48 ^{a}	61.93 ^{a}	58.51 ^{a}	54.43 ^{a}	52.88 ^{a}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง- 12 พีเอชในการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะนิ่งและความเร็วรอบ เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชั่วโมง / สภาวะ	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
นิ่ง	4.99 ^{a}	4.85 ^{a}	4.67 ^{b}	4.65 ^{b}	4.63 ^{b}	4.55 ^{c}	4.56 ^{c}	4.57 ^{c}	4.57 ^{c}	4.59 ^{b}
50	5.06 ^{a}	4.77 ^{c}	4.70 ^{a}	4.70 ^{a}	4.66 ^{ab}	4.60 ^{b}	4.60 ^{b}	4.65 ^{ab}	4.65 ^{ab}	4.67 ^{a}
70	4.99 ^{a}	4.80 ^{b}	4.71 ^{a}	4.70 ^{a}	4.70 ^{a}	4.62 ^{b}	4.63 ^{a}	4.66 ^{ab}	4.66 ^{ab}	4.67 ^{a}
100	4.99 ^{a}	4.80 ^{b}	4.69 ^{b}	4.70 ^{a}	4.67 ^{ab}	4.63 ^{ab}	4.64 ^{a}	4.63 ^{b}	4.64 ^{b}	4.67 ^{a}
150	5.01 ^{a}	4.80 ^{c}	4.71 ^{a}	4.70 ^{a}	4.67 ^{ab}	4.63 ^{ab}	4.64 ^{a}	4.67 ^{a}	4.66 ^{ab}	4.66 ^{a}
200	5.02 ^{a}	4.75 ^{c}	4.71 ^{a}	4.70 ^{a}	4.68 ^{a}	4.66 ^{a}	4.64 ^{a}	4.68 ^{a}	4.67 ^{a}	4.68 ^{a}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง- 13 ปริมาณกรดแลกติกในการศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิ เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / อุณหภูมิ	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
ห้อง	0.9 ^{bc}	1.18 ^{b}	1.44 ^{bc}	1.48 ^{bc}	1.52 ^{b}	1.59 ^{b}	1.57 ^{a}	1.56 ^{a}	1.44 ^{ab}	1.34 ^{a}
35	1.23 ^{a}	1.28 ^{b}	1.55 ^{ab}	1.6 ^{ab}	1.63 ^{ab}	1.64 ^{ab}	1.62 ^{a}	1.63 ^{a}	1.58 ^{a}	1.37 ^{a}
37	1.29 ^{a}	1.47 ^{a}	1.71 ^{a}	1.73 ^{a}	1.74 ^{a}	1.76 ^{a}	1.64 ^{a}	1.6 ^{a}	1.5 ^{a}	1.48 ^{a}
40	1.02 ^{b}	1.22 ^{b}	1.28 ^{cd}	1.33 ^{cd}	1.36 ^{c}	1.4 ^{c}	1.34 ^{ab}	1.3 ^{ab}	1.11 ^{ab}	0.86 ^{b}
42	0.88 ^{c}	1.05 ^{c}	1.18 ^{d}	1.21 ^{d}	1.22 ^{c}	1.26 ^{d}	1.02 ^{b}	0.97 ^{b}	0.78 ^{b}	0.63 ^{b}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-14 น้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิ เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / อุณหภูมิ	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
25	0.51 ^{bc}	0.83 ^{ab}	0.98 ^{b}	1.04 ^{bc}	1.02 ^{bc}	1.04 ^{b}	0.96 ^{bc}	0.83 ^{b}	0.65 ^{b}	0.61 ^{a}
35	0.63 ^{ab}	0.85 ^{ab}	1.02 ^{b}	1.05 ^{b}	1.06 ^{b}	1.08 ^{b}	1.05 ^{b}	1.02 ^{b}	0.93 ^{a}	0.67 ^{a}
37	0.73 ^{a}	0.91 ^{a}	1.61 ^{a}	1.68 ^{a}	1.84 ^{a}	1.97 ^{a}	1.91 ^{a}	1.71 ^{a}	1.34 ^{a}	1.25 ^{a}
40	0.43 ^{c}	0.72 ^{ab}	0.85 ^{b}	0.88 ^{bc}	0.94 ^{bc}	0.92 ^{c}	0.88 ^{bc}	0.85 ^{b}	0.74 ^{ab}	0.62 ^{a}
42	0.39 ^{c}	0.56 ^{b}	0.81 ^{b}	0.84 ^{c}	0.84 ^{c}	0.86 ^{c}	0.79 ^{c}	0.73 ^{b}	0.6 ^{b}	0.58 ^{a}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง- 15 น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)ในการศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิ เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / อุณหภูมิ	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
25	57.51 ^{c}	56.27 ^{b}	55.16 ^{b}	54.57 ^{b}	54.44 ^{b}	54.35 ^{b}	53.13 ^{b}	48.98 ^{c}	47.42 ^{b}	43.45 ^{b}
35	54.73 ^{d}	53.65 ^{c}	53.18 ^{c}	52.97 ^{b}	52.59 ^{b}	51.67 ^{c}	51.63 ^{b}	49.52 ^{c}	48.42 ^{b}	45.79 ^{b}
37	59.84 ^{b}	55.95 ^{b}	54.44 ^{bc}	54.09 ^{b}	53.14 ^{b}	49.62 ^{c}	48.79 ^{c}	48.04 ^{c}	46.78 ^{b}	44.41 ^{b}
40	70.64 ^{a}	69.81 ^{a}	68.96 ^{a}	68.03 ^{a}	67.12 ^{a}	66.00 ^{a}	65.97 ^{a}	63.63 ^{b}	62.99 ^{a}	60.77 ^{a}
42	69.97 ^{a}	69.34 ^{a}	68.72 ^{a}	68.48 ^{a}	68.21 ^{a}	67.58 ^{a}	67.54 ^{a}	66.37 ^{a}	65.22 ^{a}	63.05 ^{a}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-16 พีเอชในการศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิ เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / อุณหภูมิ	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
25	4.87 ^{a}	4.71 ^{ab}	4.70 ^{ab}	4.68 ^{bc}	4.66 ^{a}	4.61 ^{ab}	4.62 ^{bc}	4.62 ^{b}	4.61 ^{b}	4.64 ^{b}
35	4.79 ^{b}	4.75 ^{a}	4.74 ^{a}	4.72 ^{ab}	4.67 ^{a}	4.59 ^{b}	4.61 ^{c}	4.63 ^{b}	4.62 ^{b}	4.64 ^{b}
37	4.67 ^{c}	4.65 ^{b}	4.65 ^{b}	4.64 ^{c}	4.61 ^{b}	4.54 ^{c}	4.56 ^{d}	4.64 ^{b}	4.68 ^{b}	4.67 ^{b}
40	4.79 ^{b}	4.75 ^{a}	4.74 ^{a}	4.73 ^{a}	4.70 ^{a}	4.64 ^{a}	4.66 ^{ab}	4.79 ^{ab}	4.87 ^{a}	4.85 ^{a}
42	4.78 ^{b}	4.76 ^{a}	4.74 ^{a}	4.71 ^{ab}	4.66 ^{a}	4.64 ^{a}	4.68 ^{a}	4.82 ^{a}	4.88 ^{a}	4.93 ^{a}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-17 ปริมาณกรดแลกติกในการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / แคลเซียมคาร์บอเนต	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
0	1.30 ^{c}	1.51 ^{d}	1.70 ^{d}	1.72 ^{c}	1.74 ^{c}	1.77 ^{c}	1.76 ^{c}	1.70 ^{c}	1.64 ^{b}	1.60 ^{d}
1	1.44 ^{b}	2.39 ^{c}	3.43 ^{c}	3.54 ^{b}	3.71 ^{b}	4.44 ^{b}	4.44 ^{b}	4.42 ^{b}	4.28 ^{a}	4.07 ^{c}
2	1.63 ^{a}	2.55 ^{b}	3.98 ^{b}	4.24 ^{a}	4.50 ^{a}	4.74 ^{a}	4.73 ^{a}	4.71 ^{a}	4.56 ^{a}	4.66 ^{a}
3	1.71 ^{a}	2.62 ^{ab}	4.02 ^{b}	4.31 ^{a}	4.45 ^{a}	4.74 ^{a}	4.73 ^{a}	4.71 ^{a}	4.51 ^{a}	4.52 ^{ab}
4	1.71 ^{a}	2.70 ^{a}	4.00 ^{b}	4.28 ^{a}	4.40 ^{a}	4.75 ^{a}	4.74 ^{a}	4.70 ^{a}	4.53 ^{a}	4.49 ^{ab}
5	1.71 ^{a}	2.60 ^{ab}	4.08 ^{a}	4.35 ^{a}	4.42 ^{a}	4.77 ^{a}	4.75 ^{a}	4.71 ^{a}	4.34 ^{a}	4.29 ^{bc}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง-18 น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ)ในการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / แคลเซียมคาร์บอเนต	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
0	59.84 ^{a}	55.95 ^{a}	54.44 ^{a}	54.09 ^{a}	53.14 ^{a}	49.62 ^{a}	48.79 ^{a}	48.04 ^{a}	46.78 ^{a}	44.41 ^{a}
1	47.12 ^{b}	40.37 ^{b}	33.50 ^{b}	32.70 ^{b}	32.56 ^{b}	30.51 ^{b}	30.28 ^{b}	28.69 ^{b}	24.84 ^{b}	24.77 ^{b}
2	43.13 ^{cd}	37.72 ^{c}	31.27 ^{c}	30.40 ^{c}	30.14 ^{c}	25.34 ^{c}	25.28 ^{c}	23.2 ^{c}	23.12 ^{bc}	23.02 ^{b}
3	44.58 ^{c}	36.70 ^{cd}	29.76 ^{c}	29.61 ^{c}	28.84 ^{c}	24.77 ^{cd}	24.74 ^{cd}	21.25 ^{d}	20.18 ^{bc}	20.18 ^{b}
4	44.73 ^{c}	35.12 ^{d}	26.90 ^{d}	26.57 ^{d}	26.15 ^{d}	23.51 ^{cd}	23.40 ^{cd}	21.07 ^{d}	19.97 ^{c}	19.82 ^{b}
5	42.42 ^{d}	35.25 ^{d}	25.95 ^{d}	25.93 ^{d}	25.80 ^{d}	22.76 ^{d}	22.73 ^{d}	21.03 ^{d}	20.83 ^{bc}	20.82 ^{b}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง- 19 พีเอชในการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ 37 องศา เซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง

ชั่วโมง / แคลเซียมคาร์บอเนต	6	12	24	30	36	48	54	72	96	120
0	5.17 ^{a}	4.73 ^{c}	4.71 ^{a}	4.63 ^{a}	4.59 ^{a}	4.55 ^{a}	4.55 ^{a}	4.58 ^{a}	4.72 ^{a}	4.72 ^{a}
1	4.80 ^{c}	4.60 ^{d}	4.48 ^{b}	4.47 ^{b}	4.46 ^{b}	4.43 ^{b}	4.43 ^{b}	4.42 ^{b}	4.41 ^{b}	4.43 ^{b}
2	4.83 ^{b}	4.76 ^{b}	4.42 ^{cd}	4.42 ^{c}	4.42 ^{c}	4.40 ^{c}	4.39 ^{c}	4.39 ^{bc}	4.40 ^{b}	4.39 ^{b}
3	4.79 ^{c}	4.76 ^{b}	4.40 ^{d}	4.41 ^{c}	4.40 ^{c}	4.39 ^{c}	4.39^{c}	4.40 ^{bc}	4.38 ^{b}	4.37 ^{b}
4	4.84 ^{b}	4.79 ^{a}	4.44 ^{c}	4.43 ^{c}	4.42 ^{c}	4.40 ^{c}	4.39 ^{c}	4.40 ^{bc}	4.39 ^{b}	4.39 ^{b}
5	4.84 ^{b}	4.80 ^{a}	4.42 ^{cd}	4.42 ^{c}	4.40 ^{c}	4.38 ^{c}	4.39 ^{c}	4.38 ^{c}	4.39 ^{b}	4.40 ^{b}

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และตัวอักษรไม่เหมือนกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ ง- 20 แสดงค่า p-value ของการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักและ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T- test

ชั่วโมง	6	12	24	30	36	48	54	60	72	78	84	96	108	120
ฟลาสก์	1.95	2.34	3.41	4.12	4.68	5.49	5.47	5.47	5.43	5.43	5.40	5.44	5.38	5.38
ถังหมัก	2.94	3.45	5.36	5.86	6.39	7.26	7.27	7.27	7.26	6.98	6.94	6.94	6.93	6.95
p-value	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

หมายเหตุ

ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

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

ค่า p – value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ ง- 21 แสดงค่า p-value ของการเปรียบเทียบระหว่างผลผลิต (กรัมผลผลิตต่อกรัมสับสเตรท) โดยใช้ถังหมักและ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T- test

ชั่วโมง	6	12	24	30	36	48	54	60	72	78	84	96	102	108	120
ฟลาสก์	0.065	0.069	0.115	0.129	0.148	0.145	0.144	0.145	0.144	0.144	0.143	0.143	0.142	0.142	0.142
ถังหมัก	0.098	0.102	0.160	0.171	0.190	0.187	0.186	0.186	0.186	0.178	0.177	0.176	0.175	0.175	0.173
p-value	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001

หมายเหตุ

ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

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

ค่า p – value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ง- 22 แสดงค่า p-value ของการเปรียบเทียบเปรียบเทียบอัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)โดยใช้ถังหมักและ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T- test

ชั่วโมง	6	12	24	30	36	48	54	60	72	78	84	96	102	108	120
ฟลาสก์	0.325	0.194	0.142	0.137	0.130	0.114	0.101	0.091	0.075	0.069	0.064	0.057	0.052	0.050	0.050
ถังหมัก	0.490	0.287	0.223	0.195	0.177	0.151	0.135	0.121	0.100	0.089	0.083	0.072	0.068	0.064	0.064
p-value	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000

หมายเหตุ

ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

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

ค่า p – value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ง-23 แสดงค่า p-value การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) โดยใช้ถังหมักและ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้วิธี T- test

ชั่วโมง	6	12	24	30	36	48	54	60	72	78	84	96	102	108	120
ฟลาสก์	20.11	16.08	14.63	14.11	13.63	12.95	12.30	12.26	12.17	12.17	12.16	12.10	12.07	12.04	12.01
ถังหมัก	19.97	16.06	14.38	13.33	12.66	11.79	11.08	11.01	10.95	10.84	10.85	10.49	10.45	10.44	10.08
p-value	0.001	0.020	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

หมายเหตุ

ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

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

ค่า p – value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาว จงกมล จริยกุล
วัน เดือน ปีเกิด	9 สิงหาคม 2523
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2545