14492

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาเบื้องต้นในการตรึงรูป *Lactobacillus casei* สำหรับใช้ในกระบวนการหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนม

(Preliminary Studies on the Immobilization of *Lactobacillus casei* for the Fermentation of Lactic Acid from Whey)

T096900

นางสาวอภิรดี ศรีธัญลักษณา

นางสาวอรสุม ศิริรัตน์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรม เกษตร คณะ เทคโนโลยีการ เกษตร

สถาบัน เทคโนโลยีพระจอม เกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2537

ปพ.
ว2591ก
2537

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 96900
วัน เดือน ปี - 5 Jun 2003

1286

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาเบื้องต้นในการตรึงรูป *Lactobacillus casei* สำหรับใช้ในกระบวนการหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนม

(Preliminary Studies on the Immobilization of *Lactobacillus casei* for the Fermentation of Lactic Acid from Whey)

โดย

นางสาวอภิรดี ศรีธัญลักษณา

นางสาวอรสุม ศิริรัตน์

ACC. NO.....
Date Received 16 ส.ค. 2537
Call No.....

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 13/3/37 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(นายปกรณ์ ยั่นสกุล)

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....

(นายวรากุล สกุล)

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 28 เดือน 4 พ.ศ. 37

ปก.
จ 259ก
2536

อภิรดี ศรีธัญลักษณา และ อรสุม ศิริรัตน์. 2537. : การศึกษาเบื้องต้นในการตรึงรูป *Lactobacillus casei* สำหรับใช้ในกระบวนการหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนม (Preliminary Studies on the Immobilization of *Lactobacillus casei* for the Fermentation of Lactic Acid from Whey). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม, 57 หน้า

จากการทดลองตรึงรูป *Lactobacillus casei* ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบนสารพาหะประเภทคาร์บอนกัมมันต์โดยใช้ Polyethyleneimine (PEI) เป็นสารช่วยในการยึดติดของเซลล์กับสารพาหะ พบว่า ภาวะที่มีแนวโน้มให้ผลการตรึงรูปที่ดี คือ เคลือบผิวคาร์บอนกัมมันต์โดยใช้สารละลาย PEI ความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้ความเข้มข้นของเซลล์ในการตรึงรูปเท่ากับ 0.7 % โดยน้ำหนักเซลล์เปียก เมื่อนำ *L. casei* ตรึงรูปไปหมักในอาหาร GYP ที่เพิ่มปริมาณกลูโคสเป็น 5% พบว่าในการหมักซ้ำ 3 ครั้ง *L. casei* ตรึงรูปยังคงมีประสิทธิภาพการหมักที่ดี และเมื่อทดลองใช้ *L. casei* ตรึงรูปหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนมที่เติมสารอาหารต่าง ๆ คือ 0.4 % yeast extract, 0.02 % เปปโตน, 0.04 % $MgSO_4.7H_2O$, 0.0074 % $MnSO_4.H_2O$ และ 3 % $CaCO_3$ โดยใช้ปริมาณ *L. casei* ตรึงรูป 10, 20, 30 กรัม ต่อน้ำหางนม 500 มิลลิลิตร พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงลดลงจาก 64.72 กรัม/ลิตร เป็น 11.84, 10.34, 8.41 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในช่วงระยะเวลาการหมัก 84 ชั่วโมง

ลายมือชื่อนักศึกษา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	23/3/37 วัน เดือน ปี

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. วราวุฒิ ครูส่ง และ อาจารย์ วริพัสต์ อารีกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่ออาจารย์ประพันธ์ ปิ่นศิริรดม ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะแนวทางต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของรายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอขอบคุณโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำหางนม ขอขอบพระคุณภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ให้โอกาสใช้เครื่องมือต่าง ๆ รวมทั้งสนับสนุนงานวิจัยให้เป็นไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดเวลา

กราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และอาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิประสาทความรู้ ให้คำแนะนำสั่งสอนและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

อภิรดี ศรีธัญลักษณา

อรสุม ดิริรัตน์

มีนาคม 2537

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วารสารปริทรรศน์	4
2.1. การตรึงรูป เซลล์จุลินทรีย์	4
2.2. การใช้ เซลล์ตรึงรูปสำหรับกระบวนการหมัก	10
2.3. Polyethyleneimine	12
2.4. การใช้ Polyethyleneimine ในการตรึงรูป เซลล์จุลินทรีย์	15
2.5. กรดแลคติคและแลค เตท	17
2.6. น้ำหางนม	21
2.7. กระบวนการหมัก เพื่อผลิตกรดแลคติค	23
2.8. การหมักกรดแลคติคโดยใช้ เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูป	25
3. อุปกรณ์ สาร เคมี และวิธีทดลอง	27
3.1. อุปกรณ์ และสาร เคมี	27
3.2. วิธีการทดลอง	28
4. ผลการทดลอง	35
5. สรุปผลการทดลองและข้อ เสนอแนะ	48
5.1. สรุปผลการทดลอง	48
5.2. ข้อ เสนอแนะ	49
เอกสารอ้างอิง	50
ภาคผนวก	52
ประวัติผู้ เขียน	57

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์เพื่อใช้ประโยชน์ในกระบวนการหมักกรดแลคติค	2
2.1	วิธีดักจับเซลล์ด้วยการทำให้เกิดเจลโดยพอลิเมอร์ของสารอินทรีย์	8
2.2	ชนิดของน้ำหางนม แบ่งตามความเป็นกรดทั้งหมด	22
4.1	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ของสารละลายเซลล์ในขั้นตอนการตรึงรูป *L. casei* เมื่อใช้ความเข้มข้นของ PEI ที่ระดับต่าง ๆ	35
4.2	ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หมักด้วย *L. casei* ตรึงรูปโดยใช้ความเข้มข้นของ PEI ที่ระดับต่าง ๆ กัน	36
4.3	ปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำ *L. casei* ตรึงรูปมาใช้ซ้ำ โดยมีความเข้มข้นของ PEI ที่ระดับต่าง ๆ กัน	38
4.4	ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หมักด้วย *L. casei* ตรึงรูปโดยใช้ความเข้มข้นเซลล์ที่ระดับต่าง ๆ กัน	42
4.5	ปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำ *L. casei* ตรึงรูปมาใช้งานซ้ำ	44
4.6	ปริมาณแลคโตสที่ลดลงในน้ำหางนม เมื่อหมักด้วยเซลล์ *L. casei* ตรึงรูปในปริมาณต่าง ๆ กัน	46

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ปฏิกิริยาการสัง เคราะห์ PEI	12
2.2	ปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนกับสารปฏิกิริยา	14
2.3	ขั้นตอนการผลิต เนยแข็ง	21
3.1	แสดงขั้นตอนการ เตรียม เซลล์ *L. casei* สำหรับใช้ในการตรึงรูป	29
3.2	แสดงขั้นตอนในการตรึงรูป *L. casei* บนคาร์บอนกัมมันต์ โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ	31
3.3	แสดงขั้นตอนในการ เตรียมน้ำหางนมสำหรับใช้ในการหมักกรดแลคติค	33
4.1	กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหาร เลี้ยง เชื้อที่หมักด้วย *L. casei* ตรึงรูป เมื่อใช้ความ เข้มข้นของ PEI ที่ระดับต่าง ๆ กัน	37
4.2	ปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหาร เลี้ยง เชื้อ เมื่อนำ *L. casei* ตรึงรูปมาใช้ซ้ำ โดยมีความ เข้มข้นของ PEI ที่ระดับต่าง ๆ กัน	39
4.3	ปริมาณกลูโคสในอาหาร เมื่อใช้ เซลล์ *L. casei* ตรึงรูปในการหมักครั้งที่ 1 และในการหมักครั้งที่ 2 เมื่อใช้ความ เข้มข้นของ PEI 0.5 %	41
4.4	ปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหาร เลี้ยง เชื้อที่หมักด้วย *L. casei* ตรึงรูป โดยใช้ความ เข้มข้นของ เซลล์ที่ระดับต่าง ๆ กัน	43
4.5	ปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหาร เลี้ยง เชื้อ เมื่อนำ *L. casei* ตรึงรูปมาใช้งานซ้ำ	45
4.6	ปริมาณแลคโตสที่ลดลงในน้ำหางนม เมื่อหมักด้วย เซลล์ *L. casei* ตรึงรูปในปริมาณต่าง ๆ กัน	47
ก.	กราฟมาตรฐานของกลูโคส	53
ข.	กราฟมาตรฐานของแลคโตส	54

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการใช้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักมากขึ้น เนื่องจากมีข้อดีหลายประการคือ เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ หรือความเป็นกรดด่าง (pH) ทำให้เซลล์จุลินทรีย์สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น นอกจากนี้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง จึงช่วยประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ อาหาร การผลิตสารเคมี (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยา ฮอร์โมน) เชื้อเพลิง การกำจัดน้ำเสีย และการผลิตกรดต่างๆ เช่นกรดแลคติค (lactic acid) กรดซิตริก (citric acid) กรดอะซิติก (acetic acid) เป็นต้น

การผลิตกรดแลคติค โดยการหมักของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติเป็นที่รู้จักกันเป็นเวลานาน และมีการศึกษาในด้านนี้เพิ่มมากขึ้น เพื่อทำการผลิตกรดแลคติคในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้เพราะกรดแลคติคมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายด้าน โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารให้กลิ่นรสและถนอมรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากนี้กรดแลคติคยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอาหารได้ปลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์นม เบียร์ ไวน์ เครื่องดื่ม เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์ขนมอบ เป็นต้น ในการหมักกรดแลคติคนั้นสามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิด เช่น แป้งข้าวโพด แป้งมันผรั่ง กากน้ำตาล (mollasses) และน้ำหางนม (whey)

น้ำหางนม เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งประกอบด้วย น้ำ น้ำตาล-แลคโตส (4-5 %) โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ น้ำหางนมจึงเป็นแหล่งน้ำตาลซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคติคแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria) สามารถนำมาใช้ในการผลิตกรดแลคติคได้ ในการหมักกรดแลคติคโดยใช้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปนั้น จะมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เซลล์อิสระคือ สามารถนำเซลล์ *L. casei* กลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง ปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้ดีขึ้น รวมทั้งสามารถลดระยะเวลาของการหมักให้สั้นลงด้วย

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อใช้ประโยชน์ในกระบวนการหมักกรดแลคติค

จุลินทรีย์	วิธีการตรึงรูป	เอกสารอ้างอิง
Lactobacillus vaccinostercus	ดักจับในแคลเซียมอัลจิเนต	Tipayang และ Kozaki, 1982
Lactobacillus delbreuckii	ดักจับใน K-carageenan	Davison และคณะ,1991
Lactobacillus casei	ดักจับในแคลเซียมอัลจิเนต	Krischke และคณะ,1991
Lactobacillus casei	ดักจับในแคลเซียมอัลจิเนต	Guoqiang และคณะ,1991
Lactobacillus casei และ *Lactococcus lactis*	ดักจับใน - แคลเซียมอัลจิเนต - K-carageenan - Polyacrylamide	Roukas และ Kotzekidou, 1991
Lactobacillus casei	ดักจับในเซรามิค	Guoqiang และคณะ,1992

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1. เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* บนคาร์บอนกัมมันต์โดยวิธีดูดซับทางกายภาพ
2. เพื่อศึกษาเบื้องต้นในการหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนม โดยใช้เซลล์ *L. casei* ตรึงรูป

บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

2.1 การตรึงรูป เซลล์จุลินทรีย์

เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูป หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้อยู่ในขอบ เขตที่จำกัด โดยไม่ทำให้ เกิดอันตรายต่อ เซลล์ ภายใต้การรักษาสภาวะ catalytic active ซึ่ง เป็นสภาวะที่จุลินทรีย์สามารถทำกิจกรรมต่าง ๆได้อย่างสมบูรณ์ (Cantalrelly , 1989) การตรึงรูป เซลล์เกิดขึ้นจากการสัง เกตธรรมชาติแล้วนำมาดัดแปลงให้ เหมาะสม เช่นการพิจารณาการสร้าง แผ่นฟิล์มในการผลิตน้ำส้มสายชู

การตรึงรูป เซลล์จุลินทรีย์ แบ่งออกได้ เป็น 3 วิธีใหญ่ ๆ (ภาวิณี , 2531) คือ

1) การ เชื่อมไขว้ (Crosslinking method)

2) การ เชื่อมกับสารพาหะ (Carrier binding method)

3) การดักจับหรือการล้อมรอบ (Entrapping method)

การ เชื่อมไขว้

การ เชื่อมไขว้ เป็นการตรึงรูป เซลล์จุลินทรีย์ โดยปราศจากสารพาหะที่ เป็นของแข็ง สามารถทำได้โดยการใช้สาร เชื่อมไขว้ (crosslinking agent) ซึ่งจะทำให้โม เลกุลของ เซลล์มีการ เชื่อมไขว้ภายในและระหว่างโม เลกุลของ เซลล์ วิธีนี้จะ เป็นการทำให้ เซลล์ เกิดการ เชื่อมไขว้ทั้ง 3 ทิศทาง และมีการจับ เป็นก้อน

การตรึงรูป เซลล์จุลินทรีย์ด้วยการ เชื่อมไขว้ยังแบ่งได้ เป็น 2 วิธีดังนี้

1) ใช้สารที่มีหมู่ฟังก์ชันนัลตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป เช่น กลู เทรัลดีไฮด์ (glutaral-dehyde) โทลูลีน (tolulene) ไดไอโซไซยา เนต (diisocyanate) เป็นต้น ทำปฏิกิริยากับ เซลล์ ซึ่งจะทำให้ เกิดปฏิกิริยาที่หมู่อะมิโนอิสระ และหรือคาร์บอกซิลอิสระบนผนัง เซลล์จะได้

เซลล์ที่เชื่อมโยงกันด้วยสารเชื่อมไขว้

2) เติมสารพอลิอิเล็กโทรไลท์เช่น การตรึงเซลล์ *Nitrosomonas curopaea* ทำได้โดยผสมเซลล์เข้ากับสารละลายของ trimethylammonium glycol chitosan iodide ที่มากเกินพอ หลังจากนั้นเติมpotassiumpolyvinylalcohol sulfate เซลล์จะถูกล้อมรอบไว้ภายในเจล ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนจำพวกพอลิไอออน (polyion complex)

การตรึงรูปโดยวิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถใช้สารเชื่อมไขว้เพียงชนิดเดียวในการตรึงรูปและการยึดเกาะของเซลล์มีความแข็งแรง แต่กระบวนการนี้จะมีข้อบกพร่อง 2 ประการ คือ ประการแรก ได้แก่ ความยุ่งยากในการควบคุมให้เกิดการเชื่อมไขว้ระหว่างโมเลกุลของเซลล์และยังคงรักษาประสิทธิภาพในการทำงานของเซลล์ ประการที่สองได้แก่ สมบัติความเป็นเจลของการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้ จะทำให้มีปัญหาต่อการไหลผ่านของสารละลาย เมื่อนำไปใช้งาน ซึ่งสามารถลดข้อบกพร่องนี้ได้โดยการตรึงรูปด้วยวิธีอื่นควบคู่กัน เช่น การดูดซับทางกายภาพ เป็นต้น

การเชื่อมกับสารพาหะ

เป็นวิธีการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์โดยให้เซลล์ยึดกับสารพาหะที่เป็นของแข็ง ปัจจัยที่สำคัญของการตรึงรูปวิธีนี้ คือ การเลือกชนิดของสารพาหะและปริมาณของเซลล์จุลินทรีย์ที่จะเชื่อมกับสารพาหะได้ การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์กับสารพาหะทำได้ 2 วิธี คือ

1) การดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption)

การตรึงรูปด้วยการดูดซับทางกายภาพ เป็นการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ไว้ที่ผิวของสารพาหะที่เป็นของแข็ง โดยใช้แรงดึงดูดที่ค่อนข้างอ่อน ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แรงแวนเดอร์วาลล์ (Van der Waals interaction) หรือแรงไฮโดรโฟบิค (hydrophobic interaction)

โดยธรรมชาติจุลินทรีย์ชอบเจริญบนผิวของของแข็ง เช่น เม็ดทราย ดินชั้น เนื้อเยื่อพืช ฟัน วิลไล (villi) ของลำไส้ แร่ธาตุ หลอดพอลิไวนิลคลอไรด์ เป็นต้น ลักษณะการเจริญบนพาหะของแข็งจะเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างท่อยึดเกาะบนผิวของพาหะ

ได้ เมื่ออยู่ในภาวะที่เหมาะสม การยึดเกาะดังกล่าว เป็นลักษณะการตรึงรูป เซลล์ด้วยการดูดซับทางกายภาพที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ส่วนแรงยึดระหว่าง เซลล์กับสารพาหะจะมีมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ สารพาหะและ เซลล์นอกจาก เกิดการจับกันด้วยแรงกระทำดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังอาจ เกิดพันธะไอโอโนจินิก(ionogenic bond) เมื่อมีไอออนอื่นช่วย เช่น Ca^{2+} , Fe^{2+}, Fe^{3+}, Al^{3+} เป็นต้น หรือสะพานไฮไดรด์ (hydride bridge) แรง เหล่านี้ขึ้นอยู่กับหมู่ต่าง ๆ ที่อยู่บนผิวของผนัง เซลล์ ได้แก่ เปปไทด์ (peptide) เฮกโซซามีน (hexosamine) และกรดไดอะมิโนไพมิลิก (diaminopymilic acid) ทั้งนี้ เนื่องจากหมู่เหล่านี้มีประจุจึงทำให้สามารถจับกับหมู่ที่มีประจุของสารพาหะได้

สารพาหะที่ เหมาะสมสำหรับการตรึง เซลล์ด้วยการดูดซับทางกายภาพ จะต้อง เป็นสารที่เซลล์ไม่สามารถนำไปใช้ในการ เจริญ เติบโต และทำให้มีการแปรสภาพธรรมชาติน้อยที่สุด สารพาหะที่นิยมใช้ได้แก่ เรซินแลก เปลี่ยนประจุ (ion-exchange resin) เซลลูโลสและอนุพันธ์ แลคทิน (lactin) พอลิไฮดรอกไซด์ของโลหะ คาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon) เป็นต้น

คาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon) เป็นสารประกอบคาร์บอนที่มีลักษณะ เป็นผง หรือ เป็น เม็ด เล็ก ๆ ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน และมีพื้นที่ผิวต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรมาก เนื่องจากมีรู เล็ก ๆอยู่มากมาย คาร์บอนกัมมันต์มีความสามารถในการ เก็บรวบรวมก๊าซของ เหลว หรือสารละลายบนผิวหน้าของรู เหล่านั้นได้ดี สับส เตรทที่ไม่มีขั้วจะถูกการดูดซับบนผงถ่านกัมมันต์ได้ดีกว่าสับส เตรทที่มีขั้ว จากการ เปรียบ เทียบคาร์บอนกัมมันต์กับสารพาหะชนิดอื่น ๆ คาร์บอนกัมมันต์จะมีความสามารถในการดูดซับได้ดีกว่า มีลักษณะทางกายภาพที่ดี นอกจากนี้ยังมีความคงทนต่อสาร เคมีและสามารถผลิตจากวัสดุ เหลือใช้ที่หาได้ง่าย สารที่มีคาร์บอน เป็นส่วนประกอบในปริมาณมากส่วนใหญ่จะนำมาผลิต เป็นคาร์บอนกัมมันต์ได้ เช่น ไม้ ลิกไนต์ เป็นต้น แต่คาร์บอนกัมมันต์มีข้อ เสีย คือสามารถแตกหักได้ง่าย เมื่อได้รับแรงกดหรือแรงกระแทก

การตรึงรูป เซลล์ด้วยการดูดซับทางกายภาพนี้ เป็น เทคนิคที่ทำได้โดยง่าย และรวด เร็ว แต่จะได้ผลที่ไม่ดีนัก ทั้งนี้ เนื่องจากในกระบวนการตรึงรูปนั้นต้องมีการปรับ pH และประจุของผนัง เซลล์จะมีการ เปลี่ยนแปลงตามอายุของ เซลล์และภาวะแวดล้อม

ข้อบกพร่องที่สำคัญในการตรึงรูป เซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้ได้แก่ แรงดึงดูดระหว่าง เซลล์กับสารพาหะค่อนข้างอ่อน จึงทำให้ เซลล์หลุดออกจากสารพาหะได้ง่าย ในระหว่างกระบวนการ

ใช้งาน นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงภาวะของการทดลอง เช่น pH ความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย อุณหภูมิและชนิดของตัวทำละลาย จะทำให้เซลล์ที่ตรึงรูปอยู่นั้นหลุดออกจากสารพาหะได้ ทำให้เซลล์ตรึงรูปด้วยวิธีนี้สามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วงเวลาที่จำกัด

2) การตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนท์ (Covalent binding)

โดยวิธีนี้เซลล์จะถูกตรึงด้วยพันธะโควาเลนท์กับสารพาหะ โดยการใช้สารพาหะที่มีหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive group)หรือโดยการเติมสารที่สามารถยึดเซลล์กับสารพาหะเข้าด้วยกัน สารพาหะที่มีหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยา ได้แก่ ไซยาโนเจนโบรไมด์ - เซลลูโลส (CNBr-cellulose) และกลูเทรัลดีไฮด์-เจลาทิน (glutaraldehyde-gelatin) เป็นต้น ส่วนสารที่สามารถยึดเซลล์และสารพาหะเข้าด้วยกันได้โดยพันธะโควาเลนท์ ได้แก่ ไอโซไซยาเนต (diisocyanate) คาร์โบไดอิมไมด์(carbodiimide)กลูเทรัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) แต่สารเหล่านี้มักจะทำให้เซลล์ตาย

การตรึงรูปวิธีนี้ค่อนข้างยากกว่าการดูดซับทางกายภาพ ทั้งนี้ปฏิกิริยาการเกิดพันธะโควาเลนท์ค่อนข้างซับซ้อนและมีความรุนแรง ดังนั้นในบางครั้งการเกิดพันธะโควาเลนท์จะไปกระทบกระเทือนต่อโครงสร้างของเซลล์ ทำให้เซลล์เปลี่ยนความจำเพาะต่อซับสเตรท แต่อย่างไรก็ตามแรงเกาะกันระหว่างเซลล์กับสารพาหะค่อนข้างแข็งแรง ทำให้เซลล์หลุดออกจากสารพาหะได้ยาก

การดักจับหรือการล้อมรอบ

การดักจับไว้ด้วยพาหะของแข็ง เส้นใย หรือล้อมรอบด้วยแคปซูลขนาดเล็ก (micro capsule) ที่มีลักษณะเป็นเจล ซึ่งอาจจะเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติ หรือได้จากการสังเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งได้จัดกลุ่มของสารพาหะตามกลไกการสร้างเจล (gel formation mechanism)

ตารางที่ 2.1 วิธีตักจับเซลล์ด้วยการทำให้เกิดเจลโดยพอลิเมอร์ของสารอินทรีย์

กลไกการเกิดเจล	พอลิเมอร์
พอลิเมอไรเซชัน (polymerization)	พอลิเอไครเลไมด์ (polyacrylamide)
	พอลิเมทาไครเลท (polymetacrylate)
การเชื่อมไขว้	พรีพอลิเมอร์ (prepolymer)
	โปรตีน
พอลิคอนเดนเซชัน (polycondensation)	พอลิยูเรเทน (polyurethane)
	อีพอกซีเรซิน (epoxy resin)
การเกิดเจลเนื่องจากความร้อน (thermal gelatin)	คอลลาเจน (collagen)
	เจลาทิน (gelatin)
	อะการ์ หรือ อะกาโรส (agar or agarose)
	เคปปาร์-คาร์ราจิแนน (keppa-carrageenan)
การเกิดเจลแบบไอโอโนโทปิค (ionotropic gelatin)	อัลจิเนต (alginate)
	ไคโทซาน (chitosan)
	เซลลูโลส (cellulose)
	เซลลูโลสไตรอะซิเตต (cellulose triacetate)

ที่มา : ภาวิณี , 2531

การตรึงรูป เซลล์โดยวิธีดักจับไว้ในสารพาหะ ซึ่งจะทำให้ได้ เซลล์ตรึงรูปที่มีลักษณะ เป็นชิ้นหรือ เป็น เม็ด ทำได้หลายวิธีดังนี้

1) เตรียมพอลิ เมอร์ให้มีลักษณะ เป็นแผ่น แล้วตัดให้มีขนาด เล็กลง วิธีนี้ เป็นวิธีที่ง่าย แต่จะได้ขนาดของ เซลล์ตรึงรูปที่ไม่สม่ำ เสมอ ซึ่งทำให้สารละลายอาหารไหลผ่านไม่สะดวก เมื่อบรรจุ เซลล์ตรึงรูปลงในคอลัมน์

2) ผสมสารผสมของ เซลล์กับพอลิ เมอร์ผ่าน เข็มฉีดยา ลงในสารละลายของ เกลือ ทำให้ เม็ดพอลิ เมอร์คงรูปอยู่ได้ วิธีนี้ทำให้ เม็ดของ เซลล์ตรึงรูปมีขนาดสม่ำ เสมอ แต่วิธีนี้อาจไม่เหมาะสำหรับการ เตรียมปริมาณมากและ เหมาะที่จะใช้กับพาหะบางชนิด เท่านั้น พาหะที่ใช้กันมาก คือ โซ เดียมอัลจิ เนต และแคปปาร์-คาร์ราจิแนน

3) การ เตรียมโดยใช้ระบบ 2 เฟส (two-phase system) เซลล์ตรึงรูปที่ เตรียมโดยวิธีนี้จะมีลักษณะกลม ทำให้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย เซลล์ตรึงรูปด้วยวิธีนี้ยอมให้สารละลายอาหารไหลผ่านได้สะดวกนอกจากนี้ยังสามารถ เตรียมได้ในปริมาณมากอีกด้วย การตรึงรูปโดยวิธีนี้ทำได้โดยผสมสารละลายแขวนลอยของ เซลล์ เข้ากับพอลิ เมอร์ไฮโดรโฟบิค- เฟส พร้อมทั้งกวนสารละลาย เพื่อ เหนี่ยวนำให้ เปลี่ยน เป็น เจล

ปัญหาที่สำคัญของการตรึงรูป เซลล์ด้วยวิธีดักจับหรือห่อหุ้มคือ ความจำกัดในการแพร่กระจายของสารอาหาร โดยปกติ เซลล์ตรึงรูปจะได้รับสารอาหารน้อยกว่า เซลล์อิสระ ทั้งนี้ เพราะเมื่อ เซลล์ถูกจับไว้ด้วยสารพาหะ จะทำให้สารอาหารซึมผ่านสารพาหะก่อนที่ เซลล์จะได้รับสารอาหาร อย่างไรก็ตามการตรึงรูปด้วยวิธีนี้ เซลล์จุลินทรีย์ยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้ เนื่องจากภาวะที่ใช้ตรึงรูปไม่รุนแรง และยังป้องกันการหลุดออกของ เอนไซม์หรือ เซลล์จุลินทรีย์ได้ดีกว่าวิธีอื่น ๆ จึงมีการศึกษา เกี่ยวกับการใช้วิธีการตรึงรูป เซลล์โดยการห่อหุ้มด้วยพอลิ เมอร์ต่าง ๆ โดย เฉพาะอัลจิ เนต

2.2 การใช้เซลล์ตรึงรูปสำหรับกระบวนการหมัก

การใช้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปในกระบวนการหมักมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เซลล์จุลินทรีย์อิสระหลายประการคือ (ภาวิณี , 2531)

1) เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปมีความคงทนต่อภาวะการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ หรือ ความเป็นกรดด่าง ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

2) เซลล์จุลินทรีย์ในเซลล์ตรึงรูปสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานขึ้น

3) เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูป สามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องได้ จึงทำให้มีข้อได้เปรียบอีกหลายประการ เช่น

- ทำให้สามารถลดขนาดของเครื่องมือต่าง ๆ ที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรมให้มีขนาดเล็ก และทำงานได้ในเนื้อที่น้อยลง ซึ่งจะส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการลงทุนลดลงตามไปด้วย
- ทำให้ควบคุมกระบวนการทำงานได้ดีกว่า
- ลดระยะเวลาของการผลิตสารผลิตภัณฑ์
- ได้สารผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่คงที่ตลอดกระบวนการ
- สามารถใช้สารละลายอาหารที่เจือจางซึ่งจะทำให้ไม่สิ้นเปลืองอาหาร เพราะสารอาหารจะถูกใช้ไปหมด
- ทำให้ไม่มีสารที่เป็นอันตรายต่อการทำงานของเซลล์ตกค้างอยู่ในคอลัมน์ เพราะมีการไหลผ่านของสารละลายอาหารตลอดเวลา ดังนั้นจึงช่วยให้ประสิทธิภาพการผลิตสารสูงขึ้น
- สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้เร็วกว่าการใช้เซลล์อิสระ ทั้งนี้เพราะเซลล์ตรึงรูปจะมีความหนาแน่นของเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรสารละลายอาหารมากกว่าเซลล์อิสระ
- สามารถนำเซลล์ตรึงรูปกลับคืนมาใช้ใหม่ได้

อย่างไรก็ตาม ระบบของเซลล์ตรึงรูปก็มีข้อบกพร่องดังต่อไปนี้ (ภาวิณี , 2531)

1) การรักษาสภาพธรรมชาติให้คงตัว ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ตรึงรูปมักจะไม่เจริญเติบโตและโดยธรรมชาติแล้ว เซลล์ที่ไม่เจริญเติบโตมักจะสูญเสียความสามารถในการทำงาน ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงต้องให้อาหารกับเซลล์ตรึงรูปตลอดเวลา ทั้งนี้เพื่อให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้และมี

ประสิทธิภาพในการทำงาน

2) เซลล์ตรึงรูปจะมีปัญหาในการแพร่กระจาย และการขนส่งสารละลายอาหาร และสารผลิตภัณฑ์ผ่านสารพาหะที่ใช้ตรึง

3) สารละลายอาหารและผลิตภัณฑ์ อาจจะทำให้ เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ เกิดขึ้นได้

ซึ่งข้อบกพร่องของระบบ เซลล์ตรึงรูปที่กล่าวมาแล้วนี้ เป็น เรื่องที่ควรนำมาพิจารณา เพื่อที่จะลดข้อบกพร่อง เหล่านี้ลง ซึ่งจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการหมัก เพิ่มขึ้น ในการลดข้อบกพร่อง J สามารถทำได้ด้วยวิธีการต่าง ๆดังนี้

1) ทำการตรึง เซลล์ให้มี เซลล์อยู่ที่พื้นผิวมากที่สุด

2) ลดขนาดของ เซลล์ตรึงรูปซึ่งจะทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับสารละลายอาหารได้มากขึ้น แต่ต้องไม่ทำให้มีขนาด เล็กจน เกินไป เพราะจะทำให้ เกิดความยุ่งยากในการไหลผ่านของสารละลายอาหาร

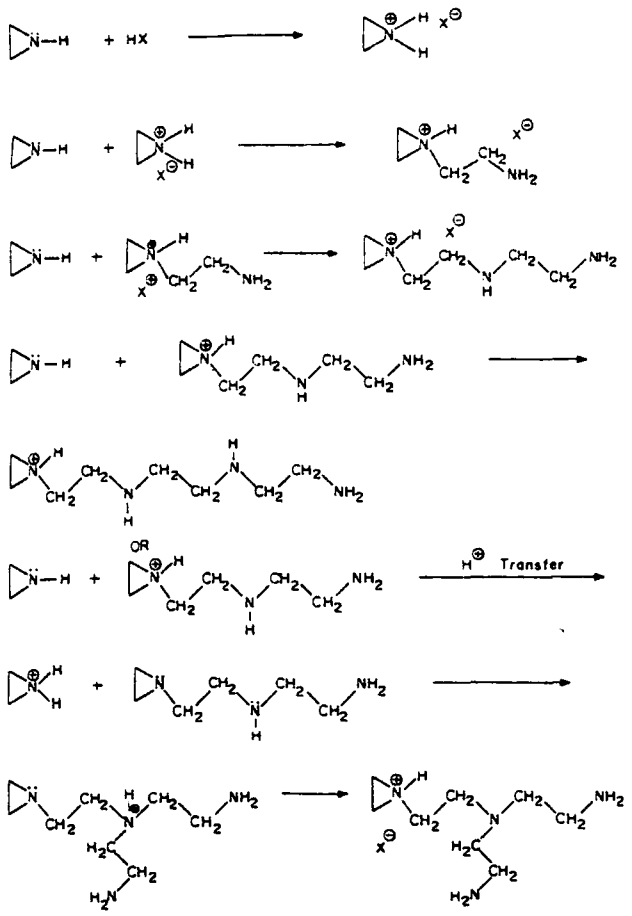
3) เพิ่มความ เข้มข้นของสารอาหารแต่วิธีนี้ต้องระวังไม่ให้มีความ เข้มข้นสูงจน เกินไป เพราะจะทำให้มีปัญหาในขั้นตอนการแยกสารผลิตภัณฑ์ออก และทำให้ไม่สามารถหมุน เวียนสารละลายอาหารกลับคืนมาใช้ใหม่ได้ เนื่องจากสารละลายอาหารจะมีความหนืดสูงขึ้น

4) เพิ่มขนาดรูพรุนของพาหะตรึงซึ่งจะช่วย เพิ่มอัตราการแพร่กระจาย แต่กรณีนี้จะใช้ได้ เฉพาะ เซลล์ที่มีขนาดใหญ่

5) ลดปริมาณของ เซลล์ที่นำมาตรึงรูปต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักของสารพาหะ

2.3 Polyethyleneimine (PEI)

Polyethyleneimine (PEI) เป็นสารประกอบเอมีน (amine) ประเภทอะลิฟาติก (aliphatic) ที่นิยมนำมาใช้เป็นสารช่วยให้เกิดการยึดติดในการตรึงรูปเอนไซม์ หรือเซลล์จุลินทรีย์ โดยวิธีดูดซับทางกายภาพกับสารพาหะ PEI มีสมบัติเป็นด่างอ่อน ๆ ความสามารถในการละลายของ PEI ขึ้นกับโครงสร้างในระดับปฐมภูมิ (primary structure) PEI ที่มีโครงสร้างโบนสาขา (branch PEI) สามารถละลายน้ำได้ดี ส่วน PEI ที่มีโครงสร้างโบนเส้นตรง (linear PEI) จะไม่ละลายน้ำ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ PEI แสดงในรูปที่ 2.1



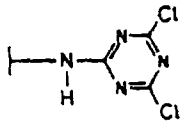
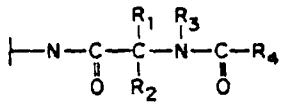
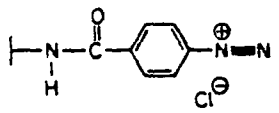
รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ PEI

ที่มา : Bahulekar และคณะ , 1991

กลไกในการช่วยยึดติดของ PEI

PEI ช่วยให้สารพาหะมีความเหมาะสมในการตรึงรูป เอนไซม์หรือตรึงรูป เซลล์จุลินทรีย์มากขึ้น เนื่องจาก PEI ประกอบด้วยหมู่อะมิโน (amino group) เป็นส่วนใหญ่ซึ่งจะ เกิดพันธะ เอไมด์ (amide) กับหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ที่มีอยู่ในโม เลกุลของ เอนไซม์หรือ เซลล์จุลินทรีย์ได้ดี เมื่อนำ PEI มาใช้ เคลือบสารพาหะที่ เป็นสารประกอบอนินทรีย์ที่มีความแข็ง เช่น อะลูมินา PEI จะทำให้ความสามารถในการยึดติดของ เอนไซม์ หรือ เซลล์จุลินทรีย์บนพาหะดังกล่าว เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ PEI ยังช่วยให้สารพาหะบางประ เภท เช่น อัลจิ เนต มีความแข็งแรงมากขึ้นด้วย

PEI อาจใช้ร่วมกับสารประกอบอื่น ๆ เพื่อ เพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงรูป เช่น กลู เท-รัลดีไฮด์ เนื่องจากจะทำให้ เกิดหมู่อัลดีไฮด์ (aldehyde group) ขึ้นบนตัวพยุง ซึ่งจะทำให้โครงร่างในการตรึงรูปแข็งแรงขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพของPEI โดยทำปฏิกิริยากับ ฟอสจีน (phosgene) ไทโอฟอสจีน (thiophosgene) ไซยานูริกคลอไรด์ (cyanuric chloride) ปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของ PEI กับสารปฏิกิริยา (reagent) แสดงดังรูปที่ 2.2

POLYMER HAVING $-NH_2$ GROUP	REACTION	REACTIVE DERIVATIVE OF POLYMER
$\vdash\!\!-\dot{N}H_2$	CARBAMYLATION	$\vdash\!\!-N{=}C{=}O$
	THIOCARBAMYLATION	$\vdash\!\!-N{=}C{=}S$
	S — TRIAZYNYL	
	GLUTARALDEHYDE	$\vdash\!\!-N{=}CH-(CH_2)_3-CHO$
	UGI REACTION (4CC REACTION)	
	DIAZO COUPLING REACTION	

รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนกับสารปฏิกิริยา

ที่มา : Bahulekar และคณะ , 1991

2.4 การใช้ polyethyleneimine ในการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์

เนื่องจาก PEI ช่วยทำให้การตรึงรูปเอนไซม์ หรือ เซลล์จุลินทรีย์ มีประสิทธิภาพมากขึ้นดังกล่าวมาแล้วจึงมีงานวิจัยที่ทดลองศึกษาการใช้ PEI ในการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ตั้งแต่ปี 1979-1987 ซึ่งอ้างโดย Bahulekar และคณะ (1991) ดังต่อไปนี้

ปี 1979 Gestrelius ได้ศึกษาการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต penicillin acylase (EC 3.5.1.11) โดยเติม PEI และ glutaraldehyde ลงไปในการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอ็นไซม์ acylase ซึ่งมีประสิทธิภาพเป็น 30 %

ปี 1980 Vojtisek และคณะ ทดลองตรึงเซลล์ *E. coli* โดยวิธีการเชื่อมไขว้ด้วย glutaraldehyde และเติมPEI ลงไป พบว่า *E. coli* สามารถผลิตเอนไซม์ penicillinacylase ซึ่งสามารถรักษา activity ได้ถึง 60 % เมื่อมีการใช้เซลล์ตรึงรูปซ้ำถึง 20 ครั้ง ปี 1981 Birnbaum และคณะ ทดลองใช้ PEI ช่วยในการตรึงเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยวิธีดักจับ หรือล้อมรอบด้วยอัลจิเนต เพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ พบว่า โครงสร้างเม็ดเจลของเซลล์ตรึงรูปมีความแข็งแรงขึ้นโดยไม่มีผลกระทบต่อกิจกรรมการหมัก

ปี 1984, 1986 Hiroshi และคณะ ทดลองตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนผ้า cotton โดยใช้ PEI ร่วมกับ glutaraldehyde พบว่า เซลล์ตรึงรูปมีแอคติวิตีของอินเวอร์เตสสูง และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำตาลซูโครส (sucrose hydrolysis) อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 3 เดือน โดยที่แอคติวิตีของอินเวอร์เตสไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก กระบวนการนี้ยังเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์แลคเตส และเอนไซม์ไลเปสซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ดี

ปี 1985 Tanaka และคณะ ศึกษาการตรึงรูปเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* และเอนไซม์กลูโคอไมเลส เพื่อใช้ในการหมักเอธานอลอย่างต่อเนื่องในสภาวะที่มีการเติม PEI พบว่า PEI จะช่วยเสริมความแข็งแรงของสารพาหะในการตรึงรูป และมีประสิทธิภาพในการหมักเพิ่มขึ้น

ปี 1986 Chao และคณะ ศึกษาการใช้ PEI ทั้งแบบ linear และ branch กับสาร

พาหะประเภท carageenan ในการตรึงรูปแบบดักจับโดยตรึงรูป เซลล์ *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งผลิต เอนไซม์แลค เตส และ เซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งผลิต เอนไซม์ไอโซ เมอ เรส และอิน เวอร์ เตส พบว่า การ เติม PEI จะช่วยทำให้พันธะของการตรึงรูปมีความคงตัว เพิ่มความต้านทานการ เสียสภาพ และลดการ เปลี่ยนแปลงในสภาวะที่มีอุณหภูมิ สูงขึ้น

ปี 1986 D' Souza และคณะ ศึกษาการใช้ PEI ในการตรึงรูป เซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ บนสารพาหะที่เป็นแก้ว พบว่า เซลล์จุลินทรีย์สามารถติดแน่นบนผิวของแก้ว โดยจะไม่หลุดออกมา แม้ว่าจะ เปลี่ยนแปลงค่าความ เป็นกรดด่าง ค่าความแรงอิออนิก หรือการล้างด้วยน้ำที่ไหลอย่างต่อ เนื่อง จึงทำให้สามารถนำมาใช้ซ้ำได้

ปี 1987 Joung และคณะ ทดลองใช้ PEI ในการตรึงรูป เซลล์ยีสต์ โดยวิธีดักจับด้วยแคล เซียมแอลจิ เนตสำหรับหมัก เอธานอลแบบต่อ เนื่อง พบว่า PEI ช่วยให้ความแข็งแรง เชิงกล (mechanical strength) ของ เซลล์ตรึงรูปที่ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังให้ประสิทธิภาพในการหมักแอลกอฮอล์สูงถึง 94 % โดยสามารถใช้ เซลล์ตรึงรูปได้นาน 3 เดือน

ปี 1987 Chibata และคณะ ศึกษาผลของการใช้ PEI ในการตรึงรูป เซลล์ *Bacillus flavum* ซึ่งผลิต เอนไซม์ฟูมา เรส ต่อการทนความร้อนและปฏิกิริยาต่าง ๆ พบว่า เมื่อใช้ PEI 3 % ทำให้ เซลล์จุลินทรีย์ และ เอ็นไซม์ที่ เซลล์ผลิตออกมาสามารถทนความร้อนได้สูงขึ้นในช่วง 50-55 องศา เซล เซียส และสามารถ เพิ่มอัตราการผลิตกรด L-malic ได้ถึง 2 เท่า เซลล์ตรึงรูปโดยใช้ PEI นี้สามารถผลิต เกลือมา เลตได้ 1 ตันต่อวัน จากคอลัมน์ขนาด 1,000 ลิตร

ปี 1988 D'souza และ Kamath ทดลองตรึงรูป เซลล์ยีสต์บนผ้าคอตตอน (cotton cloth) โดยวิธีการดูดซับ ซึ่งใช้ PEI เป็นสารช่วยให้ยึดติด ไม่ว่าจะ เคลือบ PEI ที่ตัว เซลล์หรือที่ผ้า พบว่า ยีสต์ติดแน่นอยู่กับผ้าโดยไม่หลุดออกมาแม้ว่าจะล้างด้วยสารละลายโปแตส เซียม-คลอไรด์ เอทธิลีน(ethylene) หรือ บัฟเฟอร์ หลังจากนำ เซลล์ยีสต์ตรึงรูปไปหมักในซูโครส 16 ครั้ง สามารถตรวจพบกิจกรรม (activity) ของ เอนไซม์อิน เวอร์ เตส 80 %

2.5 กรดแลคติกและแลคเตท (Lactic acid and Lactate)

กรดแลคติค เป็นกรดอินทรีย์ที่ เกิดขึ้นตามธรรมชาติ และมีประวัติการใช้งานในอุตสาห-กรรมอาหาร เป็น เวลานานก่อนที่จะนำมาใช้ เป็นส่วนประกอบในอาหารที่มีประโยชน์ต่อการค้า มีการใช้กรดแลคติคในการหมักผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น เนย โย เกิร์ต ขนมปัง ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ผักดอง เบียร์และไวน์ ปัจจุบันกรดแลคติคถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เกือบทุกประ เภท โดยมีหน้าที่สำคัญคือ ให้กลิ่นรสและถนอมรักษา

แม้ว่าจะมีการใช้ประโยชน์จากกรดแลคติคทางการค้ามานานกว่า 60 ปี แต่กรดแลคติค เพิ่งมีความสำคัญอย่างจริงจังในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา เนื่องจากผู้ผลิตกรดแลคติคได้ พยายามหาทางใช้ประโยชน์จากกรดแลคติคให้มากที่สุด เพื่อตอบสนองต่อความต้องการในอุตสาหกรรมอาหารที่ เพิ่มมากขึ้น (พิเชฐ,2534)

คุณสมบัติของกรดแลคติค

ความแตกต่างของกรดแลคติคกับกรดชนิดอื่นๆ คือ รสชาติซึ่งกรดแลคติกมีรสอ่อนและนุ่มกว่าและใช้ในรูปของ เหลวที่มีความ เข้มข้นต่าง ๆกัน ส่วนกรดอื่น ๆรสชาติจัดกว่าและใช้ในรูปผลึกหรือ เป็นผง

ข้อดีโดยทั่วไปของกรดแลคติค

1) กรดแลคติคมีผลทางการถนอมอาหารที่ดีกว่า

2) เกลือแคล เซียมของกรดแลคติค คือ แคล เซียมแลค เตทละลายน้ำได้ดีมากจึงใช้ในการแก้ไขข้อบกพร่องของผลิตภัณฑ์ที่มีปัญหาใน เรื่องความชุ่น เนื่องจาก เกลือแคล เซียม เพราะแคล เซียมแลค เตทจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์ใสขึ้น

3) กรดแลคติคใช้ในรูปของ เหลวจึงสะดวกในการตวงและวัดปริมาตรได้อย่างถูกต้อง

4) กรดแลคติค เกิดขึ้นได้ เองตามธรรมชาติ จึงมีการใช้ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมาย เช่น ผลิตภัณฑ์นม เนื้อ ขนมปังของหมักดอง เบียร์ ไวน์ เป็นต้น

5) กรดแลคติคที่ เกิดจากกระบวนการหมักจะอยู่ในรูป L (+) ซึ่ง เป็นรูปแบบที่ เกิดขึ้น

96900

ในร่างกายคน ดังนั้น เมื่อรับประทานอาหารที่มีกรดแลคติค เข้าไป จึงสามารถใช้ประโยชน์จากกรดแลคติคได้

การใช้ประโยชน์จากกรดแลคติค

การใช้ประโยชน์จากกรดแลคติคมีความสำคัญ เพิ่มขึ้น เรื่อย ๆ มีการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากกรดและ เกลือของกรดแลคติคกันอย่างกว้างขวาง เพื่อนำไปใช้กับอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากว่าอุตสาหกรรมอาหาร เป็นส่วนสำคัญที่สุดในการรองรับกรดแลคติคที่ผลิต เพิ่มขึ้น

กรดแลคติคมีความ เหมาะสมที่จะใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เนื่องจากมีรสกรดอ่อน ๆ ต่างจากรสจัดของกรดชนิดอื่น ๆ เมื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารจะไม่กลบหรือลบกลิ่นของสารให้กลิ่นรสตัวอื่น ๆ นอกจากนี้กรดแลคติคยังมีบทบาทที่ เด่นชัดด้านการถนอมรักษาอาหาร และควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ กรดแลคติคสามารถ เกิดขึ้นได้ เองในอาหารหลายประ เภทในธรรมชาติ โดยไม่ต้องมีการ เติมธาตุหรือสารอาหารอื่นลงในอาหารที่จะใช้ผลิตกรดแลคติค และกรดแลคติคยังมีข้อดีกว่ากรดชนิดอื่น ๆคือ เกลือของกรดละลายน้ำได้ดีมาก

นอกจากกรดแลคติคจะมีข้อดีดังที่กล่าวข้างต้นแล้วกรดแลคติกยังไม่ เป็นพิษ และได้รับการรับรองความปลอดภัยในฐานะที่ใช้ เป็นสารปรุงแต่งอาหารในประ เทศสหรัฐอ เมริกา รวมทั้งเป็นที่ยอมรับในประ เทศอื่นๆด้วย ตัวอย่างของอุตสาหกรรมอาหารที่มีการนำกรดแลคติคไปใช้ประโยชน์มีดังนี้

1. **ลูกกวาด** (Sugar confectionary)

ปัจจุบันกรดแลคติค เป็นส่วนที่สำคัญมากสำหรับการผลิตลูกกวาด การ เติมกรดแลคติคจะช่วยให้ลูกกวาดใส ไม่มีอากาศแทรก เมื่อให้ความร้อนสูง

2. **ผลิตภัณฑ์นม** (Dairy products)

การใช้กรดแลคติคในปฏิกิริยาการทำให้ เป็นกรด (Acidification) โดยตรงในผลิตภัณฑ์นม เช่น คอทเทจชีส (cottage cheese) เป็นที่นิยมกว่าขบวนการหมัก เพราะว่าการหมัก เสี่ยงต่อความผิดพลาดและการปน เปื้อนจาก เชื้อโรค การใช้กรดแลคติคโดยตรงช่วยประหยัด เวลาได้มากกว่า นอกจากนั้นกรดแลคติคยัง เกิดได้ เองตามธรรมชาติและมีรสชาติดี นิยม

ใช้เป็นสารให้ความเป็นกรดในผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็ง (cheese) มาการีน (magarine) และผงโยเกิร์ต (yoghurt powder)

3. **เบียร์** (Beer)

นิยมใช้กรดแลคติคในการปรับความเป็นกรดด่าง ระหว่างกระบวนการ Mashing และในระหว่าง wort cooking การปรับความเป็นกรดด่างของเบียร์ดิบ (lager beer) ด้วยกรดแลคติคจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและช่วยเพิ่มกลิ่นรส

4. **ไวน์ ไซเดอร์และไวน์ผลไม้** (Wine,Cider and Fruit Wines)

กรดแลคติคใช้สำหรับปรับความเป็นกรดของไวน์ที่มีความเป็นกรดต่ำ (low - acid wine) และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเสถียร ทั้งในระหว่างการหมักและการเก็บและไม่ถูกแบคทีเรียทำให้เสีย เหมือนกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) กรดมาลิก (malic acid) และกรดซิตริก (citric acid) นอกจากนั้นเกลือของกรดแลคติคสามารถละลายน้ำได้จึงไม่เป็นสาเหตุในการตกตะกอนเหมือนกรดทาร์ทาริก และกรดซิตริก

5. **เครื่องดื่ม** (Beverage)

กรดซิตริกมีรสฝาด ทำให้กลิ่นรสของเครื่องดื่มรวมทั้งน้ำผลไม้เสียไป ดังนั้นจึงได้มีการหันมาใช้กรดแลคติคแทน เพราะว่ามีรสอ่อนกว่าจึงไม่ทำให้กลิ่นรสของเครื่องดื่มเสียไป และยังช่วยเพิ่มกลิ่นรสอีกด้วย

6. **เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์** (Meat and Meat Products)

กรดแลคติคนิยมใช้อย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เนื่องจากกรดแลคติคมีรสกรดอ่อนๆและมีผลในการต้านทานจุลินทรีย์มาก มีการนำมาใช้ลดการปนเปื้อนในเนื้อวัว เป็ด ไก่ และซากหมูในโรงฆ่าสัตว์ พบว่า สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ลง เช่น *Salmonella* จะลดจำนวนลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อใช้กรดแลคติคแทนน้ำคลอรีนที่ใช้ล้าง ไส้กรอกสามารถใช้โซเดียมแลคเตท (Sodium lactate) ลด A_w เพื่อเพิ่มอายุการเก็บ นอกจากนี้โซเดียมแลคเตทยังมีรสเค็มอ่อนไม่เค็มจัด จึงสามารถใช้ในความเข้มข้นที่สูงกว่าโซเดียมคลอไรด์มาก

7. **ผลโอลีฟและผักดองชนิดอื่น ๆ** (Olives and Other Pickles)

ผลโอลีฟสีเขียวมักถูกบรรจุในสารละลายของเกลือ กรดแลคติคและน้ำ โดยกรดแลคติคจะทำหน้าที่เป็นสารป้องกันการเสีย ช่วยเพิ่มกลิ่นรส ทำให้น้ำเกลือใสไม่ขุ่น ในผลิตภัณฑ์หมักดอง

ใช้กรดแลคติคแทนกรดอะซิติกบางส่วนได้ เช่น แตงกวา หัวหอม จะให้รสชาติที่อ่อนกว่าและ เป็นที่ยอมรับมากกว่า รวมทั้งให้กลิ่นรสที่ดีกว่าการใช้กรดอะซิติกล้วน ๆ นอกจากนั้นยัง เพิ่มความต้านทานจุลินทรีย์อีกด้วย

8. ผลิตภัณฑ์ขนมอบ (Bakery products)

กรดแลคติคในรูปของ แคล เซียมแลค เตทใช้กับขนมปังข้าวไรน์ (ryn bread) และขนมปังข้าวสาลี (wheat bread) และยังใช้ได้ดีกับผลิตภัณฑ์ขนมอบ เช่น Meringues และ Marshmalloes จะช่วย เพิ่มความคงตัวของส่วนผสมและ เพิ่มปริมาตรให้ขนมอบ นอกจากนั้น โปรตีนอัลบูมินในไข่ที่ใช้ในขนมอบ ยังอาจใช้แคล เซียมแลค เตทที่ราคาถูกกว่ามากแทนกันได้

9. การใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ

จากการที่มีการศึกษา เพื่อลดปริมาณการใช้สารกันบูด เช่น เบนโซ เอต ซอร์ เบตให้น้อยลง ทำให้มีการพัฒนามาใช้น้ำ เกลือที่มีกรดแลคติคผสมกรดอะซิติก เช่นมายอง เนส น้ำสลัด สลัดกุ้ง

เมื่อแลค เตทรวมตัวกับแคล เซียม จะ เกิด เป็นโครงสร้าง เกลือที่แข็งแรงและถูกใช้ในกระบวนการผลิตผักและผลไม้กระป๋อง แคล เซียมแลค เตท เป็น เกลือแคล เซียมที่ถูกดูดซึมง่าย ซึ่งจะเป็นการช่วย เพิ่มธาตุแคล เซียมในอาหารสำหรับผู้บริโภคที่ขาดแร่ธาตุชนิดนี้

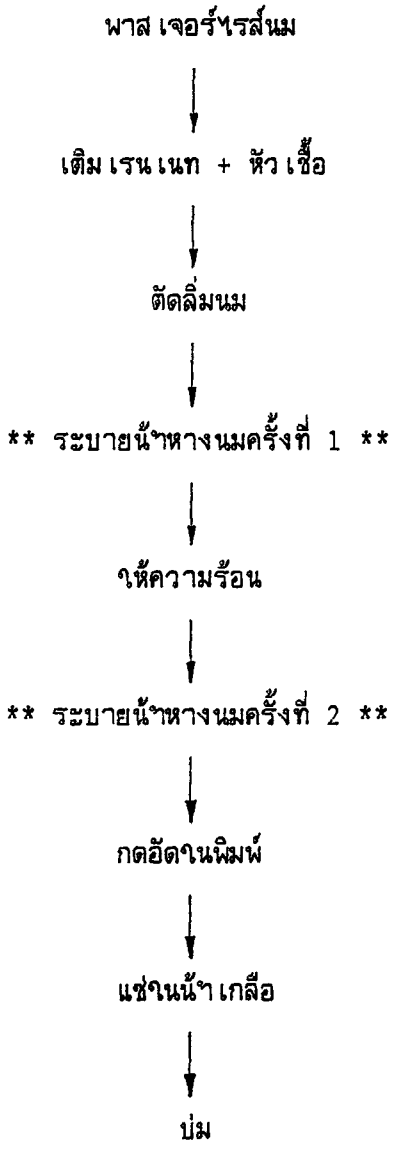
10. กรดแลคติคผง

การใช้กรดแลคติคในรูปของ เหลวกับผลิตภัณฑ์แห้ง เช่น ผงผสม เป็น เครื่องดื่ม หรือผงน้ำสลัดจะมีปัญหาในกระบวนการผลิต จึงมีการค้นคว้า เพื่อผลิตกรดแลคติคผงขึ้นมาใช้สำหรับผลิตภัณฑ์แห้ง โดยนิยมใช้ในรูปของ เกลือแคล เซียม ซึ่งมีกรดแลคติก 60 % กรดแลคติคผงมีการใช้ในผลิตภัณฑ์ น้ำสลัดผง ซอสผง หรือผสมในผง เครื่องดื่ม ชีสผง เพื่อ เพิ่มกลิ่นรส

14492

2.6 น้ำหางนม (whey)

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมผลิต เนยแข็งจากนมสดมีการขยายตัวมากขึ้น ทำให้มีน้ำหางนมที่เป็นผลิตผลพลอยได้อยู่สูงถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ของนมที่ใช้ในการผลิต ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งน้ำหางนม เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการผลิต เนยแข็ง

ที่มา : โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา , 2534

[illegible]

น้ำหางนม (whey) มีลักษณะโปร่งใส เป็นของเหลวสีเขียวอมเหลือง สามารถแบ่งตามความเป็นกรดทั้งหมด (total acidity) หรือแบ่งตามค่าความเป็นกรดด่างได้เป็น 3 ชนิดตามตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ชนิดของน้ำหางนมแบ่งตามความเป็นกรดทั้งหมด

น้ำหางนมชนิด	Titratable acidity (%)	pH
หวาน (sweet whey)	0.10-0.20	5.8-6.6
กรดปานกลาง (medium acid whey)	0.20-0.40	5.0-5.8
กรด (acid whey)	0.40-0.60	4.0-5.0

ที่มา : Green และ Kramer , 1985

น้ำหางนมมีองค์ประกอบโดยประมาณดังนี้

- น้ำตาลแลคโตส 4.80 %
- โปรตีน 0.85 %
- ไขมัน 0.35 %
- แร่ธาตุ 0.60 %
- น้ำ 93.40 %

จะเห็นว่าน้ำหางนมยังคงมีสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆอยู่ในปริมาณมาก ดังนั้นจึงน่าจะนำน้ำหางนมมาใช้ประโยชน์ เช่น การนำไป เป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักไวน์ น้ำส้มสายชู แอลกอฮอล์ กรดแลคติคและซิง เกิล เซลล์โปรตีน (single-cell protein) เป็นต้น (Green และ Kramer ,1985)

2.7 กระบวนการหมัก เพื่อผลิตกรดแลคติค

1) สับสเตรท

สับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติก ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต เช่น แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง กากน้ำตาล (molasses) และน้ำทิ้งจากผลิตภัณฑ์นม (whey) เป็นต้น สำหรับสับสเตรทพวกแป้งนั้นจะต้องผ่านกระบวนการย่อย ให้ได้น้ำตาลกลูโคส เสียก่อนโดยอาศัยกรดหรือเอนไซม์ ในการเลือกใช้สับสเตรทจะต้องคำนึงถึงว่าสับสเตรทนั้นมีปริมาณมากและหาได้ง่าย รวมถึงกระบวนการที่จำเป็นต้องใช้ในการหมัก เพื่อปรับสภาพสับสเตรท (pretreatment) และค่าใช้จ่าย

2) จุลินทรีย์

แลคติคแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่าง เป็นแท่ง สั้นและยาวไม่มีสปอร์รูปร่างกลม เดี่ยวหรือเกาะกันเป็นคู่ หรือวางตัวเรียงกันเป็นสายและในบางกรณี อาจจะมีเซลล์เกาะติดกัน 4 เซลล์ เนื่องจากแลคติคแอซิดแบคทีเรียมีรูปร่างกลมหรือรูปแท่งขนาดสั้น ดังนั้นการจำแนกชนิดจึงทำได้ค่อนข้างยากและรูปร่างของเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปตามสิ่งแวดล้อม เช่นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ไม่สามารถสังเคราะห์ฮีม (heme) ไม่มีเอนไซม์คาทาเลส (catalase) ต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโต เช่น วิตามินบี และกรดอะมิโน ต้องการอาหารที่มีแป้งชนิดที่ใช้หมักได้ มีโคโลนี (colony) ขนาดเล็ก มีความสามารถทนต่อกรดได้ดี ชอบอาศัยอยู่ในแห่งที่มีสารอาหารที่ใช้ในการหมัก เช่น พืช สัตว์ นมและผลิตภัณฑ์นม และสิ่งปฏิกูล เป็นต้น

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

2.1) Homofermenter หมายถึง แลคติคแอซิดแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้กลายเป็นกรดแลคติคได้ประมาณ 90 % เช่น *Lactobacillus casei , L. plantarum , L. bulgaricus , Pediococcus sp.* และ *Streptococcus sp.*

2.2) Heterofermenter หมายถึง แลคติคแอซิดแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติคได้ในปริมาณต่ำและมีสารประกอบอื่น ๆ เกิดขึ้นด้วย ได้แก่ เอทธิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก แบคทีเรียที่อยู่ในประเภทนี้ เช่น *Lactobacillus*

vaccinostercus , L.brevis และ *Leuconostoc sp.*

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ทั้งประเภท Homofermenter และ Heterofermenter ซึ่งจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

Lactobacillus casei

Lactobacillus casei เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในแฟมิลี่แลคโตบาซิลลาซีอี (Family Lactobacillaceae) มีรูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ แกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้เอง (non-motile) เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในประเภท Facultative anaerobe bacteria คือ เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้ *L. casei* ยังเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในประเภทแลคติคแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลแลคโตสแล้วให้กรดแลคติค ดังสมการต่อไปนี้

$$\underset{\text{แลคโตส}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + \underset{\text{น้ำ}}{H_2O} \xrightarrow{\text{lactase}} \underset{\text{กลูโคส}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{กาแลคโตส}}{C_6H_{12}O_6}$$

$$\underset{\text{น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว}}{2\ C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{กรดแลคติค}}{4\ C_3H_6O_3}$$

หลังจากที่น้ำตาลแลคโตสแตกตัวให้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแล้ว น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้จะเปลี่ยนแปลงต่อไปจนได้กรดไพรูวิค ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ต่อโดยเอนไซม์ lactic acid dehydrogenase และโคเอนไซม์ที่อยู่ในรูปรีดิวซ์แล้วให้กรดแลคติคดังสมการ

$$\underset{\text{กรดไพรูวิค}}{CH_3CO\ COOH} + NADH + H^+ \xrightarrow{\text{lactic acid dehydrogenase}} \underset{\text{กรดแลคติค}}{CH_3CHOHCOOH} + NAD^+$$

2.8 การหมักกรดแลคติคโดยใช้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูป

กรดแลคติคที่แลคติคแอซิดแบคทีเรียผลิตขึ้นนี้มีการนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย นอกจากนี้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปยังมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เซลล์อิสระหลายประการ ดังที่กล่าวมาแล้วในตอนต้น ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปในกระบวนการหมักกรดแลคติค ดังต่อไปนี้

ปี 1982 Tipayang และ Kozaki ศึกษาการเตรียมแบคทีเรียตรึงรูปโดยวิธีดักจับในแคลเซียมอัลจิเนต สำหรับผลิตกรดแลคติค พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต และแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเตรียมแบคทีเรียตรึงรูป คือ 3 % และ 2-3 %ตามลำดับ โดยภาวะดังกล่าวไม่พบว่ามีการหลุด (leakage) ของเซลล์ออกจากเม็ดเจล

จากการใช้เซลล์ตรึงรูปในการหมักกรดแลคติคเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ตรึงรูปให้ประสิทธิภาพในการหมักสูงกว่าเซลล์อิสระ กล่าวคือ นอกจากจะให้ผลผลิตของกรดแลคติคสูงกว่าแล้ว จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่หลังจากกระบวนการหมักในระบบของเซลล์ตรึงรูปยังมีมากกว่าระบบของเซลล์อิสระอีกด้วย

ปี 1991 Guoqiang และคณะ ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแลคเตท (lactate) จากเซลล์ *Lactobacillus casei* ตรึงรูปในแคลเซียมอัลจิเนตโดยประกอบเป็นเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ 2 ชนิดคือ แบบ stirred tank bioreactor และแบบ packed bed bioreactor พบว่าความเป็นกรดด่างเป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการหมัก ในการหมักโดยใช้ packed bed bioreactor ไม่สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่างได้ แต่สำหรับการหมักโดยใช้ stirred tank bioreactor สามารถควบคุมความเป็นกรดด่างของระบบได้ดีกว่า ประสิทธิภาพในการหมักสูงถึง 90-99% ได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็น L-lactate อย่างไรก็ตาม เมื่อนำเซลล์ *L. casei* ตรึงรูปไปหมักซ้ำ ปริมาณ D-lactate ในผลิตภัณฑ์จะเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่อค่าความเป็นกรดด่างไม่เหมาะสม

ปี 1991 Krischke และคณะ ศึกษาการผลิตกรดแลคติคในรูป L-lactic acid จากน้ำหางนมที่ผ่านการกรอง(whey permeate) โดยการหมักของ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* แบบต่อเนื่อง ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ stirred tank

และ fluidized bed พบว่า เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ stirred tank มีอัตราการผลิตกรดแลคติค 5.5 กรัม / ลิตร ต่อ ชั่วโมงและ ใช้สับสเตรทได้ 100 % สำหรับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ fluidized bed มีอัตราการผลิตกรดแลคติกเป็น 13.5 กรัม ต่อ ลิตร ต่อ ชั่วโมง ใช้สับสเตรทได้ 50 %

ปี 1991 Ronkas และ Kotzekidou ทดลองผลิตกรดแลคติกจากน้ำหางนมที่ผ่านการกรอง โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักระหว่าง *Lactobacillus casei* ตรึงรูป *Lactococcus lactis* ตรึงรูปและเซลล์ทั้งสองตรึงรูปร่วมกัน (coimmobilized *L. casei* and *L. lactis)* ในตัวพยุง คือ แคลเซียมอัลจิเนต เคปปา-คาราจีแนน (K-carageenan) อาการ์ (agar) และ โพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) พบว่าการใช้เซลล์ตรึงรูปร่วมกันในแคลเซียมอัลจิเนต สามารถหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนมได้มากที่สุด และเมื่อทำการหมักซ้ำทุก 48 ชั่วโมง ประสิทธิภาพในการหมักกรดแลคติคของเซลล์แบคทีเรียตรึงรูปร่วม เปลี่ยนแปลงน้อยมาก

ปี 1992 Guoqiang และคณะ ทดลองตรึงรูปเซลล์ *L. casei* บนเซรามิคซึ่งเคลือบด้วย PEI ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้ในกระบวนการหมักกรดแลคติค โดยประกอบเป็นเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ packed bed และ stirred tank เปรียบเทียบกัน เมื่อนำเซลล์ตรึงรูปดังกล่าวไปหมักในสารตั้งต้น พบว่าปริมาณกลูโคสที่เซลล์ *L. casei* ตรึงรูปใช้ไปในการหมักกรดแลคติคลดลงอย่างมาก สรุปได้ว่าการใช้ PEIมีส่วนช่วยให้การตรึงรูปเซลบนตัวพยุงติดแน่นขึ้นและการหมักโดยใช้ stirred tank bioreactor มีอัตราการผลิตกรดแลคติคสูงกว่าการใช้ packed bed bioreactor แต่ความคงทนของเซลล์ตรึงรูปจะน้อยกว่า

บทที่ 3

อุปกรณ์ สาร เคมี และวิธีทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสาร เคมี

อุปกรณ์

- หม้อนึ่งความดัน (TOMY, SS-320, Japan)
- ตู้เขี่ย เชื้อ (ESCO, Belgium)
- เครื่องหมุน เหวี่ยง (Jouan, Belgium)
- เครื่องแก้วที่ใช้ในการวิ เคราะห์
- ตู้อบฆ่า เชื้อ (Juoan, Belgium)
- ตู้บ่ม เชื้อ (WTC binder, USA)
- เครื่อง เขย่า (Gerhardt, Bonn, Germany)
- Spectrophotometer (CECIL, Cambridge, England)
- pH meter (SUNTEX, SP-701)

สาร เคมี

- คาร์บอนกัมมันต์ (ขนาด 1-2 มิลลิ เมตร)
- Calcium carbonate (MERCK)
- 3,5 - dinitrosalicylic acid (MERCK)
- Disodium hydrogen phosphate (CARLO ERBA)
- Glucose (Fluka)
- Hydrochloric acid (BAKER analyzed)
- Iron(II)sulphate (BDH laboratory reagent)
- Magnesium sulphate (Fluka)
- Manganese sulphate (Fluka)

- Polyethyleneimine (SIGMA)
- Potassium sodium tartrate (CARLO ERBA)
- Sodium chloride (UNIVAR)
- Sodium hydrogen phosphate (CARLO ERBA)
- Sodium hydroxide (UNIVAR)

<u>อาหาร เลี้ยง เชื้อ</u>

- GYP medium

<u>เชื้อจุลินทรีย์</u>

- *Lactobacillus casei* (TISTR NO. 453)

3.2 วิธีการทดลอง

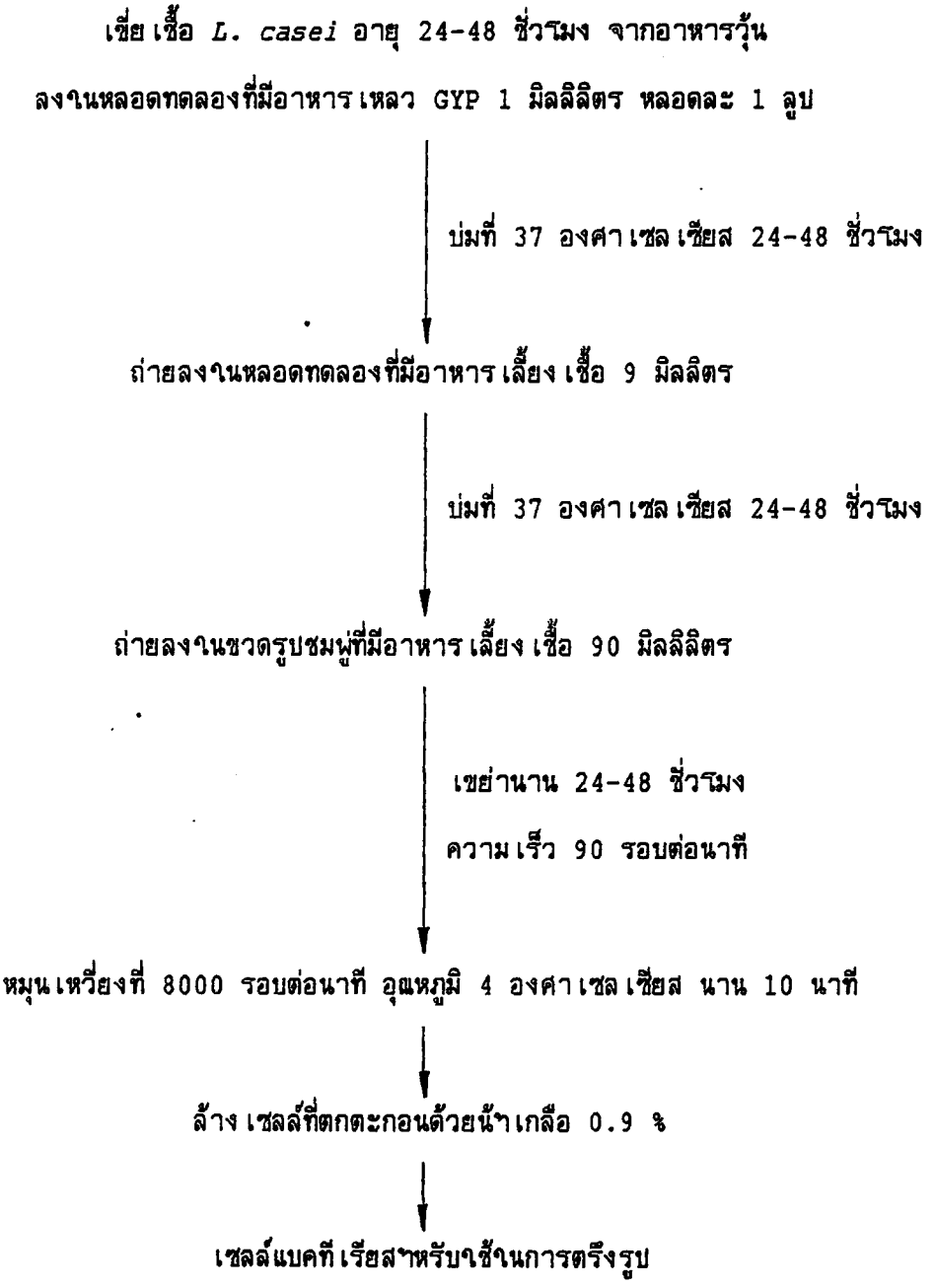
3.2.1 การ เตรียมคาร์บอนกัมมันต์ สำหรับใช้ เป็นสารพาหะในการตรึงรูป

แช่คาร์บอนกัมมันต์ในน้ำกลั่น ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง แล้วล้างน้ำกลั่นให้สะอาด หลังจากนั้นนำไปอบแห้งที่ 120 องศา เซล เซียส เป็น เวลา 2 ชั่วโมง

3.2.2 วิธี เตรียม เซลล์แลคติคแอซิดแบคที เรียสำหรับใช้ตรึงรูป

แลคติกแอซิดแบคที เรียที่ใช้ในการทดลองคือ *Lactobacillus casei* เชี่ย เชื้อดังกล่าวซึ่งมีอายุ 24-48 ชั่วโมงลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร เหลว GYP 10 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ลูป นำไปบ่มที่ 37 องศา เซล เซียส เป็น เวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นถ่าย เชื้อ ปริมาณ 10 มิลลิตรในหลอดทดลองลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร เลี้ยง เชื้อ เหลว GYP 90 มิลลิลิตร นำไป เขย่าด้วยความ เร็ว 90 รอบต่อนาที เป็น เวลา 24- 48 ชั่วโมงทำการ เก็บ เกี่ยว เซลล์ โดยนำไปหมุน เหวี่ยง เป็น เวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศา เซล เซียส โดยใช้ความ เร็ว 8000

รอบต่อนาที ล้าง เซลล์ที่ตกตะกอนด้วยสารละลาย เกลือความ เข้มข้น 0.9 % จะได้ เซลล์ เปียก สำหรับใช้ในการตรึงรูปโดยทุกขั้นตอนจะต้องทำภายใต้ภาวะปลอด เชื้อ (aseptic technic) ขั้นตอนการ เตรียม เซลล์แสดงได้ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการ เตรียม เซลล์ *L. casei* สำหรับใช้ในการตรึงรูป

3.2.3 วิธีการตรึงรูป *L. casei* บนคาร์บอนกัมมันต์ โดยวิธีดูดซับทางกายภาพ

(ดัดแปลงจากวิธีของ Guogiang , 1992)

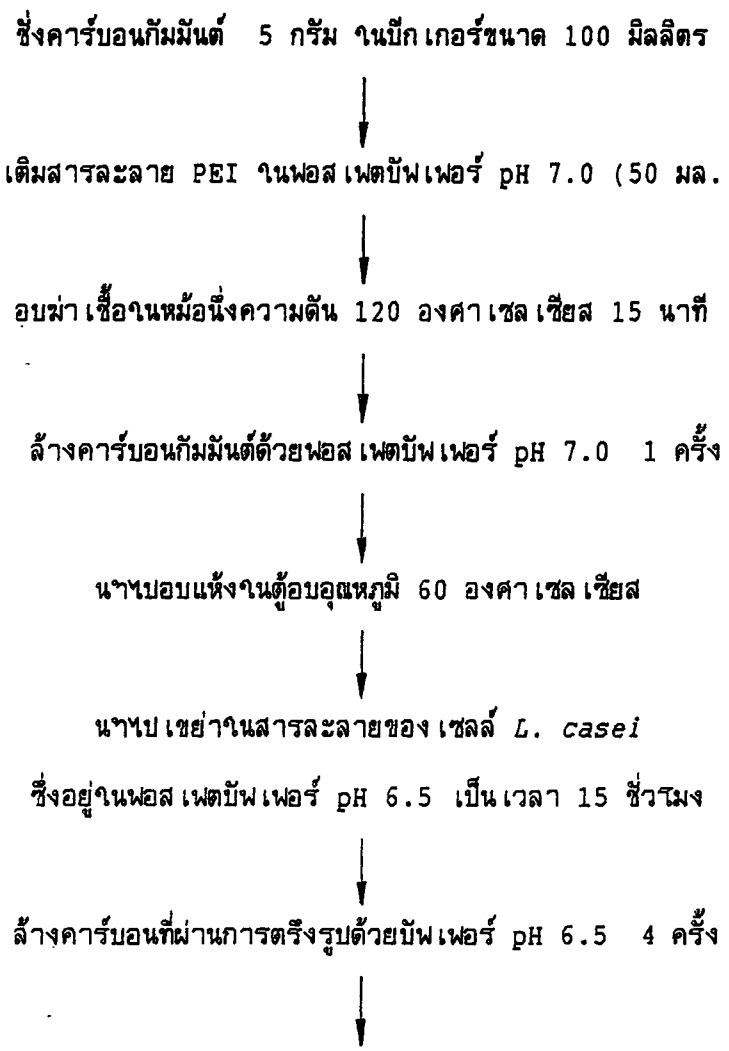
การตรึงรูป *L. casei* บนคาร์บอนกัมมันต์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ มีวิธีการดังนี้คือ ชั่งคาร์บอนกัมมันต์ 5 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย PEI ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างคาร์บอนกัมมันต์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 1 ครั้ง โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้จะต้องผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเช่นเดียวกัน นำคาร์บอนกัมมันต์ที่ผ่านการเคลือบด้วย PEI แล้วไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปใส่ในสารละลายเซลล์ *L. casei* ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ล้างคาร์บอนกัมมันต์ด้วยบัฟเฟอร์ pH 6.5 4 ครั้งจะได้เซลล์ *L. casei* สำหรับใช้ในการทดลอง ขั้นตอนการตรึงรูปแสดงได้ดังรูปที่ 3.2

3.2.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเซลล์ *L. casei* โดยวิธีดูดซับทางกายภาพ

3.2.4.1 ความเข้มข้นของ PEI ที่เหมาะสม

เตรียม *L. casei* ตรึงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.3 โดยแปรความเข้มข้นของ PEI 6 ระดับ คือ 0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 % น้ำหนักโดยปริมาตร และใช้ความเข้มข้นเซลล์เป็น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักเซลล์เปียก

เลือกความเข้มข้นของ PEI ที่เหมาะสม โดยวัดความขุ่นของสารละลายเซลล์ที่ลดลงในระหว่างการตรึงรูป ที่ 620 นาโนเมตร และนำ *L. casei*ตรึงรูปที่ได้ไปหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่เพิ่มปริมาณกลูโคสเป็น 5 % จากนั้นติดตามปริมาณกลูโคสที่ถูกใช้ไปในการหมักทุก 12 ชั่วโมง โดยใช้ Dinitrosalicylic reagent ตามวิธีในภาคผนวกข้อที่ 2 ทำการทดลองโดยใช้เซลล์ *L. casei* ตรึงรูปซ้ำ 1 ครั้ง



รูปที่ 3.2 แสดงขั้นตอนในการตรึงรูป *L. casei* บนคาร์บอนกัมมันต์ โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

3.2.4.2 ความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสม

เตรียม *L. casei* ตรึงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.3 โดยแปรความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ 5 ระดับ คือ 0.1,0.3,0.5,0.7,1.0 % โดยน้ำหนักเซลล์เปียก โดยใช้ความเข้มข้นของ PEI ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 3.2.4.1

เลือกภาวะที่เหมาะสมโดยการนำ *L. casei* ตรึงรูปที่ได้ไปหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่เพิ่มปริมาณกลูโคสเป็น 5 % และติดตามปริมาณกลูโคส

ที่ถูกใช้ไปในการหมักทุก 12 ชั่วโมง ตามวิธีในภาคผนวกข้อที่ 2

3.2.5 ศึกษาการใช้งานซ้ำของ *L. casei* ตรึงรูป

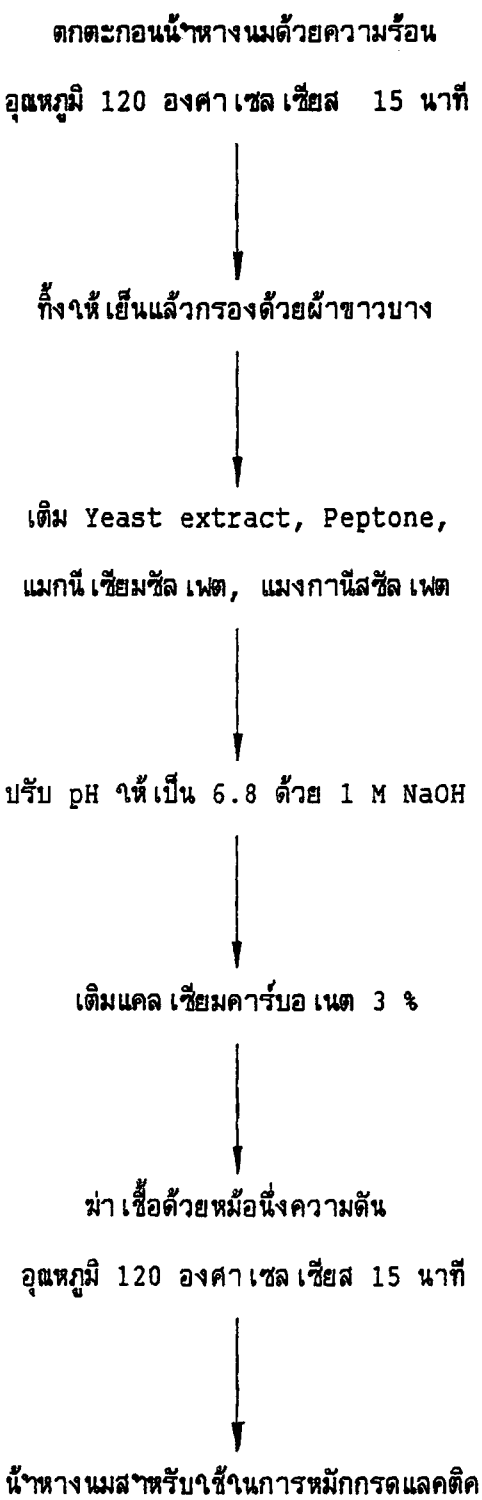
เตรียมเซลล์ตรึงรูปโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.4 จากนั้นถ่ายเซลล์ *L. casei* ตรึงรูป 5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ซึ่งเพิ่มปริมาณกลูโคสเป็น 5 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 110 รอบต่อนาที ทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสทุก 6 ชั่วโมง ตามวิธีในภาคผนวกข้อที่ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำเช่นเดียวกันนี้ 3 ครั้ง

3.2.6 ศึกษาการหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนมโดยใช้ *L. casei* ตรึงรูป

3.2.6.1 การเตรียมน้ำหางนมเริ่มต้น

(ดัดแปลงจากวิธีของ Rougus and Kozekidou,1991)

นำน้ำหางนมมาผ่านความร้อน เพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำส่วนใสที่ได้มาเติม Yeast extract 0.4 %, Peptone 0.02 %, แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.H_2O$) 0.02 %, แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) 0.0074 % นำไปปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย 1 M NaOH เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) 3 % หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จะได้น้ำหางนมสำหรับใช้ในกระบวนการหมักกรดแลคติค ดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนในการเตรียมน้ำหางนมสำหรับใช้ในการหมักกรดแลคติค

3.2.6.2 ศึกษาการหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนมโดยใช้ *L. casei* ตรึงรูป

ทดลองหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนม ที่เตรียมได้จากการทดลองข้อ 3.2.6.1 โดยใช้ *L. casei* ตรึงรูป โดยบรรจุน้ำหางนมปริมาณ 500 มิลลิลิตร ลงในขวดหมักขนาด 1000 มิลลิลิตร เติม *L. casei* ตรึงรูปในปริมาณต่างกัน คือ 10,20 และ 30 กรัม จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบปริมาณแลคโตสในน้ำหางนมทุก ๆ 6 ชั่วโมง ตามวิธีในภาคผนวกข้อที่ 3

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลคติคที่เกิดขึ้น กับเวลาในการหมัก

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม *L. casei* ตรึงรูปโดยการดูดซับทางกายภาพ

4.1.1 ความเข้มข้นของ PEI ที่เหมาะสม

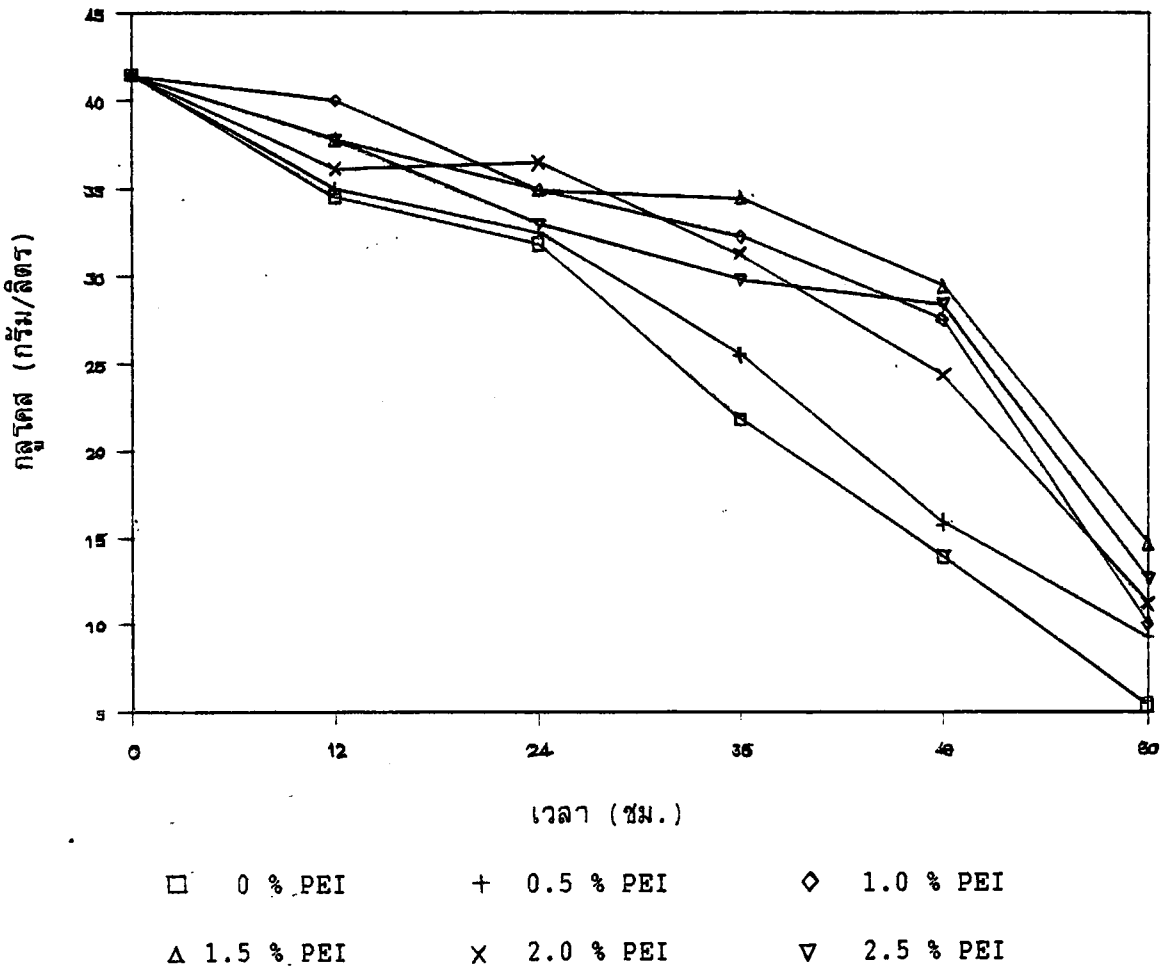
จากการเตรียม *L. casei* ตรึงรูปตามวิธีทดลองข้อ 3.2.2 โดยแปรความเข้มข้นของ PEI 6 ระดับ คือ 0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 % น้ำหนักโดยปริมาตร ติดตามความขุ่นของสารละลายเซลล์ที่ลดลงระหว่างการตรึงรูปที่ 620 นาโนเมตร ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1 และวัดปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ของสารละลายเซลล์ในขั้นตอนการตรึงรูป *L. casei* เมื่อใช้ความเข้มข้นของ PEI ที่ระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้น PEI (% w/v)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร	
	ก่อนตรึง	หลังตรึง
0.0	1.386	1.644
0.5	1.368	1.532
1.0	1.342	1.402
1.5	1.426	1.432
2.0	1.342	1.392
2.5	1.423	1.623

ตารางที่ 4.2 ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หมักด้วย *L. casei* ตรึงรูป โดยใช้ความเข้มข้นของ PEI ที่ระดับต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น PEI (% w/v)	ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัม/ลิตร)					
	ระยะเวลาในการหมัก (ชม.)					
	0	12	24	36	48	60
0.0	41.43	34.52	31.85	21.80	13.90	5.38
0.5	41.43	35.05	32.47	25.56	19.58	9.28
1.0	41.43	39.96	34.90	32.29	27.44	10.08
1.5	41.43	37.78	34.96	34.46	29.41	14.69
2.0	41.43	36.14	36.49	31.23	24.36	11.11
2.5	41.43	37.72	32.94	29.76	28.32	12.63

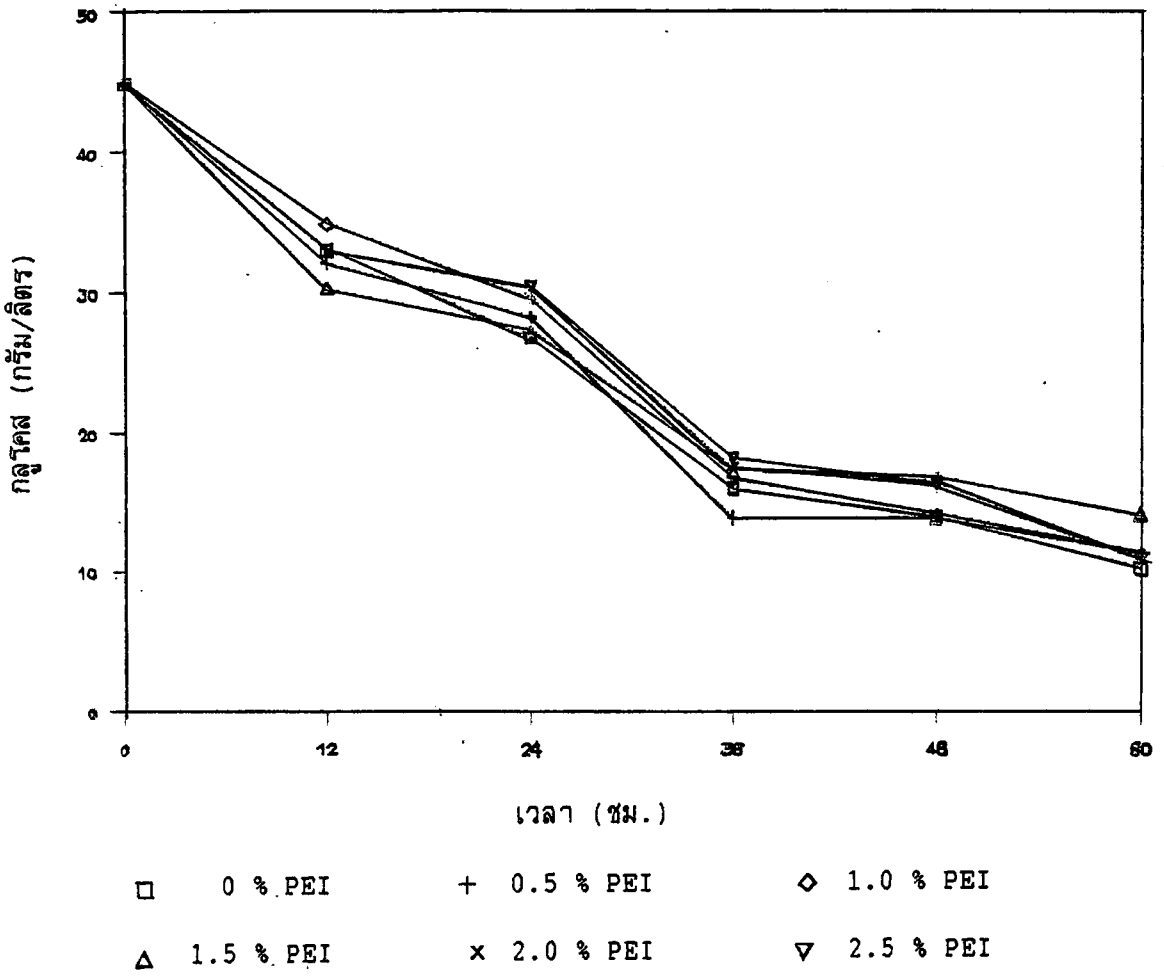


รูปที่ 4.1 กราฟแสดงปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หมักด้วย *L. casei* ตรึงรูป เมื่อใช้ความเข้มข้นของ PEI ที่ระดับต่าง ๆ กัน

หลังจากนำ *L. casei* ตรึงรูปมาใช้ในการหมักซ้ำ ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 ปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อนำ *L. casei* ตรึงรูปมาใช้ซ้ำ โดย มีความเข้มข้นของ PEI ที่ระดับต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น PEI (% w/v)	ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัม/ลิตร)					
	ระยะเวลาในการหมัก (ชม.)					
	0	12	24	36	48	60
0.0	44.89	33.05	26.77	16.04	13.96	10.20
0.5	44.89	32.08	28.18	13.90	13.93	11.31
1.0	44.89	34.90	29.48	16.72	14.28	11.37
1.5	44.89	30.23	27.24	17.33	16.92	14.07
2.0	44.89	32.94	30.26	17.42	16.48	10.99
2.5	44.89	32.99	30.35	18.19	16.22	10.87



รูปที่ 4.2 ปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อนำ *L. casei* ตรึงรูปมาใช้ซ้ำ โดยมีความเข้มข้นของ PEI ที่ระดับต่าง ๆกัน

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ของสารละลายเซลล์หลังจากผ่านขั้นตอนการตรึงรูปที่ใช้ความเข้มข้นของ PEI เท่ากับ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มีค่าไม่แตกต่างจากเริ่มต้นมากนัก ซึ่งในการทดลองสังเกตเห็นว่าสารละลายเซลล์หลังจากตรึงรูปมีสีเข้มและมีตะกอนสีดำของผงคาร์บอน เนื่องมาจากการแตกหักของคาร์บอนกัมมันต์ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จึงยังคงมีค่าสูง ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการตรึงรูปของเซลล์

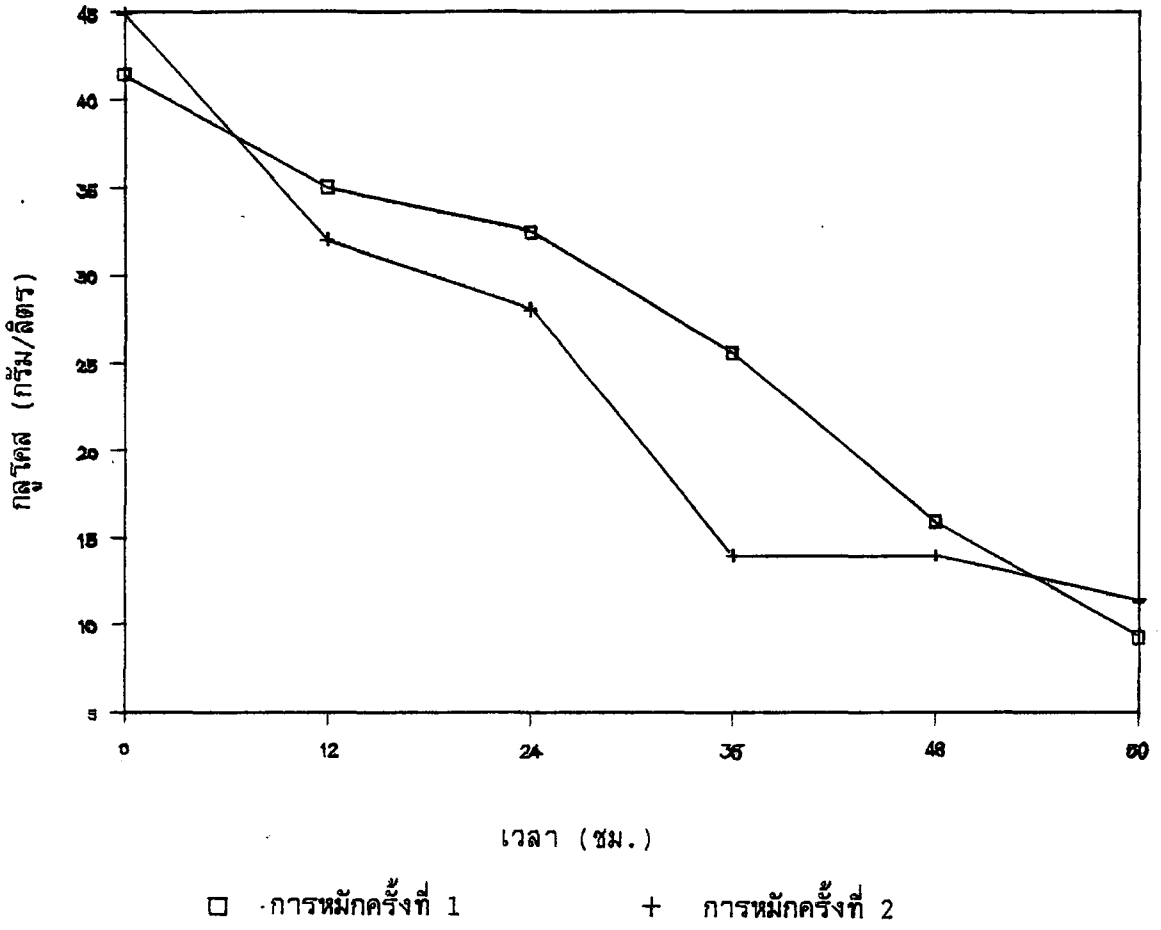
จากตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่า ในช่วงแรกของการหมักปริมาณกลูโคส

จะลดลงค่อนข้างช้า เนื่องจากเป็นระยะปรับตัว(lag phase) ของเซลล์ หลังจากการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง ปริมาณกลูโคสในทุกระดับความเข้มข้นของ PEI จะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยเซลล์ *L. casei* ที่ไม่เคลือบคาร์บอนกัมมันต์ด้วย PEI จะมีแนวโน้มการลดลงของกลูโคสมากที่สุด รองลงมาคือ ความเข้มข้น PEI เป็น 0.5 % แต่คาร์บอนกัมมันต์ที่ไม่เคลือบด้วย PEI จะมีการแตกหักมากที่สุด โดยสังเกตได้จากความขุ่น เนื่องจากผงคาร์บอนในอาหารที่ใช้หมัก

เมื่อนำ *L. casei* ตรึงรูปไปหมักในอาหาร GYP ซ้ำครั้งที่ 2 พบว่า การลดลงของปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อในกล้าเคียงกันที่ทุกระดับความเข้มข้นของ PEI แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2 แต่มีอัตราการลดลงของปริมาณกลูโคสสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ *L. casei* ตรึงรูปในการหมักครั้งที่ 1

ดังนั้นความเข้มข้นของ PEI ที่เลือกใช้คือ 0.5 % เนื่องจาก PEI ช่วยให้เกิดการแตกหักของคาร์บอนกัมมันต์ลดลง ซึ่ง Bahulekar และคณะ (1991) ได้รายงานไว้ว่า PEI สามารถช่วยให้สารพาหะมีความคงทน ไม่แตกหักได้ง่าย

จากรูปที่ 4.3 ซึ่งแสดงปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อหมักด้วย *L. casei* ตรึงรูป โดยใช้ความเข้มข้น PEI 0.5 % ในการหมักครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 จะเห็นว่าอัตราการลดลงของปริมาณกลูโคสในการหมักครั้งที่ 2 สูงกว่าการหมักครั้งที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Guoqiang และคณะ (1992)



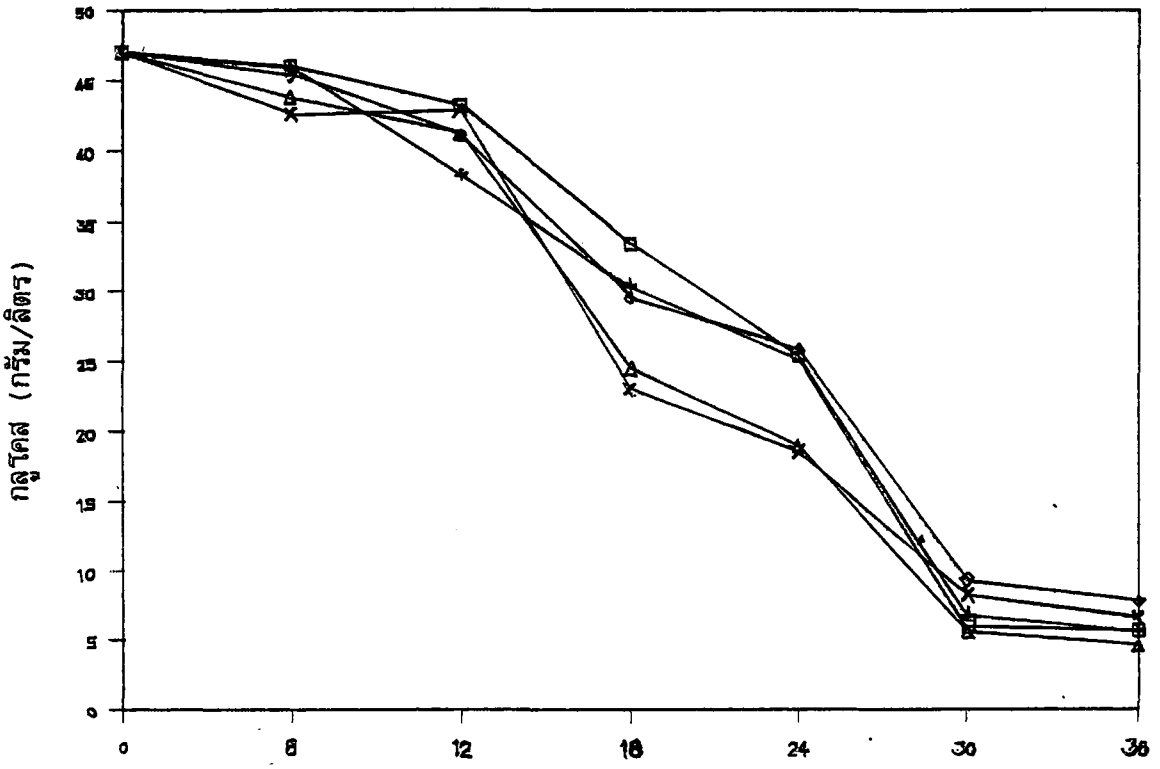
รูปที่ 4.3 ปริมาณกลูโคสในอาหาร เมื่อใช้เซลล์ *L. casei* ตรึงรูปในการหมักครั้งที่ 1 และในการหมักครั้งที่ 2 เมื่อใช้ความเข้มข้นของ PEI 0.5 %

4.1.2 ความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสม

จากการเตรียมเซลล์ *L. casei* ตรึงรูป โดยใช้ความเข้มข้นของ PEI ที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 4.2.1 โดยแปรความเข้มข้นของเซลล์ 5 ระดับคือ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 % โดยน้ำหนักเปียก ติดตามประสิทธิภาพการหมักของเซลล์ *L. casei* ตรึงรูปที่ได้ จากการลดลงของกลูโคสในอาหาร โดยวิธี DNS Method ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หมักด้วย *L. casei* ตรึงรูป โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ระดับต่าง ๆกัน

ความเข้มข้นเซลล์ (% น้ำหนักเปียก)	ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัม/ลิตร)						
	ระยะเวลาในการหมัก (ชม.)						
	0	6	12	18	24	30	36
0.1	47.01	45.98	43.19	33.35	25.27	5.96	5.73
0.3	47.01	45.83	38.25	30.20	25.12	6.73	5.64
0.5	47.01	45.39	41.19	29.44	25.83	9.28	7.79
0.7	47.01	43.78	41.19	24.47	11.92	5.61	4.64
1.0	47.01	42.60	42.90	22.98	18.51	8.29	6.52



รูปที่ 4.4 ปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หมักด้วย *L. casei* ตรึงรูป โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ระดับต่าง ๆกัน

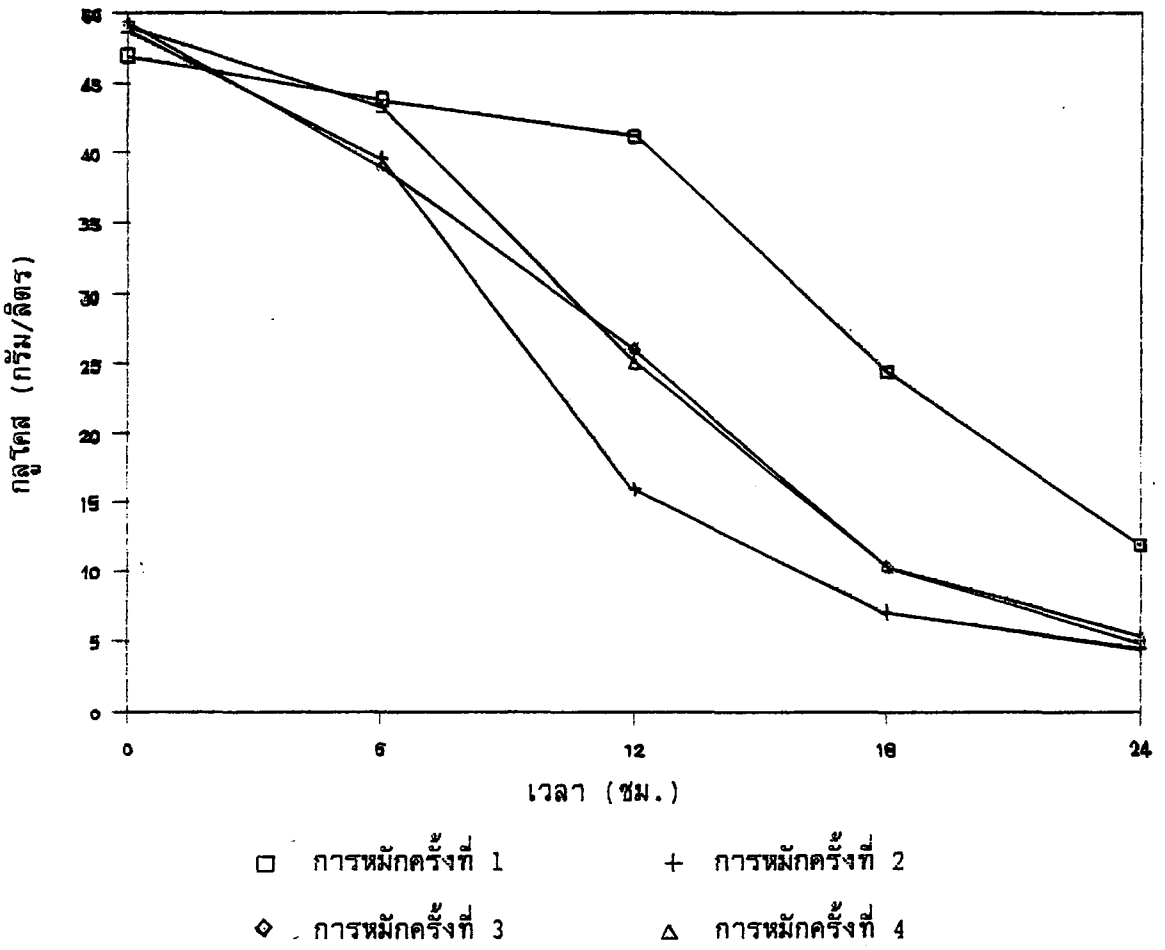
จากตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของเซลล์ *L. casei* 0.7 % มีแนวโน้มการลดลงลงของปริมาณกลูโคสในอาหารมากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ 0.7 % โดยน้ำหนักเปียก

4.1.3 การใช้งานซ้ำของ *L. casei* ตรึงรูป

เมื่อนำเซลล์ *L. casei* ตรึงรูป มาใช้งานซ้ำ 3 ครั้ง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำ *L. casei* ตรึงรูปมาใช้งานซ้ำ

การใช้งาน (ครั้งที่)	ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัม/ลิตร)				
	ระยะเวลาในการหมัก (ชม.)				
	0	6	12	18	24
1	47.01	43.78	41.19	24.47	11.92
2	48.62	39.56	15.84	7.05	4.52
3	49.30	38.99	25.94	10.37	4.76
4	49.15	43.34	25.06	10.37	5.41



รูปที่ 4.5 ปริมาณกลูโคสที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำ *L. casei* ตรึงรูปมาใช้งานซ้ำ

ในการใช้ *L. casei* ตรึงรูปซ้ำจะเห็นว่าในการใช้งานครั้งที่ 1 ปริมาณกลูโคสในอาหารจะลดลงค่อนข้างช้า แต่เมื่อนำ *L. casei* มาใช้งานซ้ำเป็นครั้งที่ 2 อัตราการลดลงของกลูโคสจะลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อใช้ซ้ำในครั้งที่ 3 และ 4 พบว่า อัตราการลดลงของกลูโคสจะใกล้เคียงกัน โดยปริมาณกลูโคสในการใช้งานครั้งที่ 4 จะลดลงช้ากว่าการใช้ในครั้งที่ 3 แสดงให้เห็นว่า เซลล์ตรึงรูปมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น เมื่อนำมาใช้งานซ้ำ อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง ประสิทธิภาพในการหมักจะลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าในการใช้งานครั้งแรกนั้น เซลล์ยังคงอยู่ในระยะปรับตัว (lag phase) เพื่อให้เหมาะกับสภาพแวดล้อม จึงทำให้ปริมาณกลูโคสในอาหารลดลงในอัตราที่ช้ากว่าการใช้งานครั้งที่ 2 เมื่อนำ *L. casei*

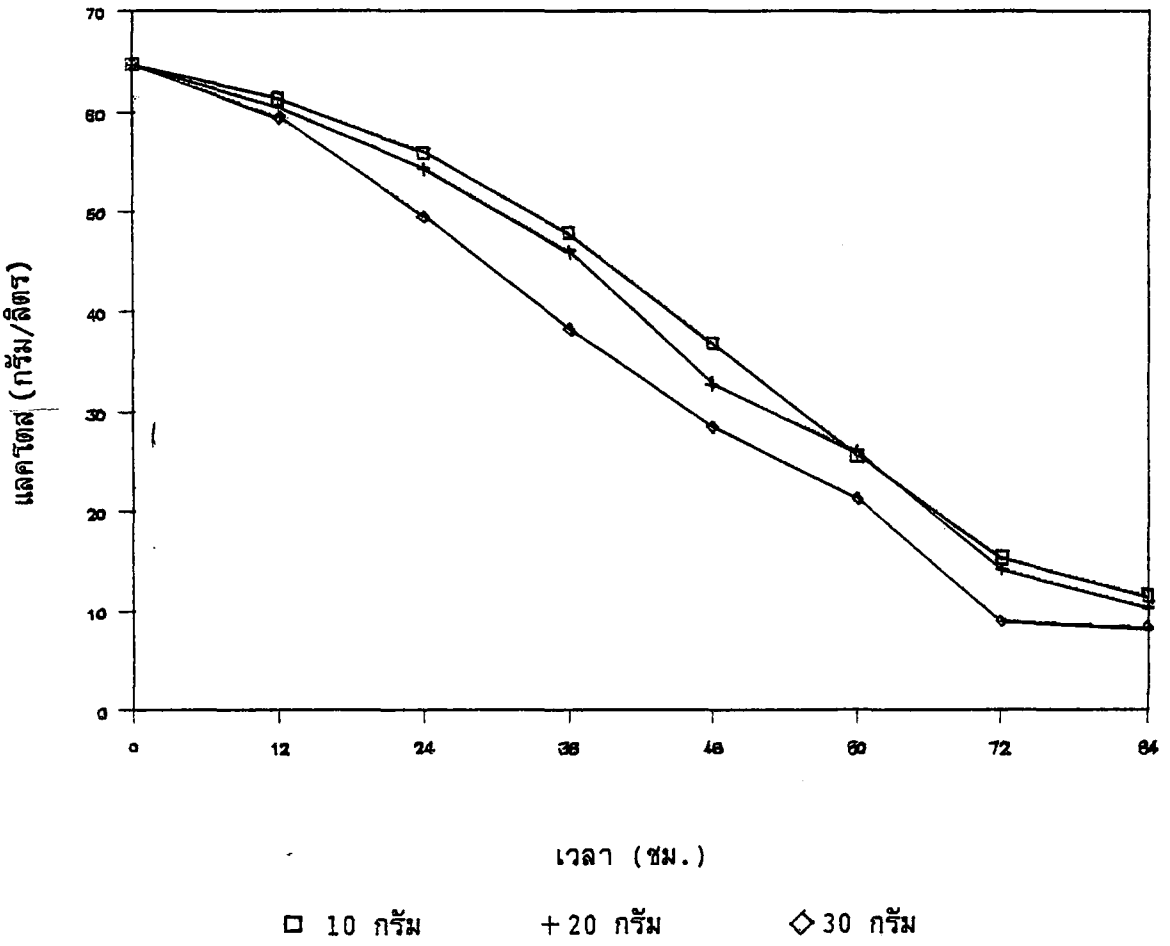
มาใช้ซ้ำในครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 อัตราการลดลงของปริมาณกลูโคสมีแนวโน้มช้าลง ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์บางส่วนหลุด (leak) ออกจากสารพาหะและเซลล์บางส่วนตายไป ทำให้อัตราการหมักลดลง

4.2 ผลการศึกษาการหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนมโดยใช้ *L. casei* ตรึงรูป

จากการทดลองหมักน้ำหางนม โดยแปรปริมาณเซลล์ *L. casei* ตรึงรูป 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 กรัม ตามวิธีทดลองข้อ 3.2.6 จากนั้นสิเคราะห์ปริมาณแลคโตสในน้ำหางนมทุก ๆ 6 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ปริมาณแลคโตสที่ลดลงในน้ำหางนม เมื่อหมักด้วยเซลล์ *L. casei* ตรึงรูปในปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูป (กรัม)	ปริมาณแลคโตสในน้ำหางนม (กรัม/ลิตร)							
	ระยะเวลาในการหมัก (ชม.)							
	0	12	24	36	48	60	72	84
10	64.72	61.25	55.85	47.84	36.80	25.69	15.28	11.44
20	64.72	60.49	54.25	45.94	32.70	26.06	14.15	10.35
30	64.72	59.42	49.54	38.27	28.46	21.32	8.91	8.41



รูปที่ 4.6 ปริมาณแลคโตสที่ลดลงในน้ำหางนม เมื่อหมักด้วย เซลล์ *L. casei* ตรึงรูปในปริมาณต่าง ๆ กัน

จากตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.6 พบว่า เมื่อใช้ปริมาณ *L. casei* ตรึงรูปมากขึ้น จะทำให้อัตราการลดลงของปริมาณแลคโตสในน้ำหางนม เพิ่มขึ้น และพบว่า เมื่อใช้ เซลล์ตรึงรูป 10,20 และ 30 กรัม ปริมาณแลคโตสลดลงจาก 64.72 กรัม/ลิตร เป็น 11.84,10.30 และ 8.41 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยใช้ระยะ เวลาในการหมัก 84 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูป *Lactobacillus casei* ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบนสารพาหะประเภทคาร์บอนกัมมันต์โดยใช้ Polyethyleneimine (PEI) เป็นสารช่วยในการยึดติดเซลล์กับสารพาหะ พบว่าภาวะที่มีแนวโน้มให้ผลการตรึงรูปที่ดี คือ เคลือบผิวคาร์บอนกัมมันต์โดยใช้สารละลาย PEI ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นอกจากนี้ยังพบว่า PEI มีส่วนช่วยเสริมความแข็งแรงของสารพาหะด้วย โดยทำให้คาร์บอนกัมมันต์เกิดการแตกหักน้อยลง ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ที่เหมาะสมในการตรึงรูปเท่ากับ 0.7 % โดยน้ำหนักเซลล์เปียก

เมื่อนำ *L. casei* ตรึงรูปไปหมักในอาหาร GYP ที่เพิ่มปริมาณกลูโคสเป็น 5 % พบว่าในการหมักซ้ำ 4 ครั้ง *L. casei* ยังคงมีประสิทธิภาพในการหมักที่ดี โดยมีประสิทธิภาพในการหมักเพิ่มขึ้นในการใช้ซ้ำครั้งที่ 2 และประสิทธิภาพการหมักมีแนวโน้มลดลงสำหรับการใช้ซ้ำในครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4

จากการทดลองหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนมที่มีการเติมสารอาหารต่าง ๆ คือ 0.4 % yeast extract, 0.02 % peptone, 0 .04 % $MgSO_4.7H_2O$, 0.0074 % $MnSO_4.H_2O$ และ 3 % $CaCO_3$ โดยใช้ *L. casei* ตรึงรูป 10,20 และ 30 กรัม ต่อน้ำหางนม 500 มิลลิลิตร พลว่าปริมาณแลคโตสในน้ำหางนมลดลงจาก 64.72 กรัม/ลิตร เป็น 11.84, 10.34 และ 8.41 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในช่วงระยะเวลาการหมัก 84 ชั่วโมง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำ *L. casei* ตรึงรูปมาใช้ในการหมักกรดแลคติคจากน้ำหางนม

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการทดลองพบว่าคาร์บอนกัมมันต์ เปราะและแตกหักได้ง่าย ดังนั้นควรทำการศึกษาต่อไปในเรื่องการนำสารพาหะชนิดอื่น ๆ มาใช้แทนคาร์บอนกัมมันต์ เช่น glass bead, ceramic bead

5.2.2 ศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับปริมาณสารอาหารที่ใช้เติมในน้ำหางนม เนื่องจากสารอาหารเหล่านี้มีราคาค่อนข้างแพง และปริมาณสารอาหารเหล่านี้อาจจะมีผลต่ออัตราการหมักกรดแลคติคด้วย

5.2.3 ควรมีการศึกษาต่อไปในเรื่องการนำ *L. casei* ตรึงรูปมาใช้ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง เพราะการหมักแบบต่อเนื่องมีข้อดีหลายประการคือ สามารถลดขนาดของเครื่องมือที่ใช้ ใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยลง สามารถควบคุมกระบวนการหมักได้ดี นอกจากนี้ยังให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

พิเชษฐ์ สมผดุง และอัญชลี วรพงศ์พัฒน์. 2534. การตรึงรูปเซลล์ยีสต์สำหรับใช้ในการผลิตไวน์. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 56 หน้า.

พิเชษฐ์ สมผดุง. 2534. สัมมนาเรื่อง การผลิตกรดแลคติคโดยใช้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูป. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2531. การตรึงเอนไซม์และเซลล์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 211 หน้า.

Aeschlimann, A., Stasi, L. D. and Stockar, U. 1990. Continuous Production of Lactic Acid from Whey Permeate by *Lactobacillus helveticus* in Two Chemostats in Series. Enzyme Microb. Technol. 12: 926-932.

Bahulekar, R., Ayyangar, N. R. and Ponrathnam, S. 1991. Polyethyleneimine in Immobilization of Biocatalysts. Enzyme Microb. Technol. 13: 858-868.

Davison, B. H. and Scott, C.D. 1992. A Proposed Biparticle Fluidized-Bed for Lactic Acid Fermentation and Simultaneous Adsorption. Biotechnol. and Bioeng. 39(3): 365-368.

D' Souza, S. D. and Kamath, N. 1988. Cloth Bioreactor Containing Yeast Cells Immobilized on Cotton Cloth using Polyethylenimine. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 136-140.

Green, J. H. and Kramer, A. 1985. Food Processing Waste Management. Conn: AVI. pub. Co. 583 pp.

Guoqiang, D., Kaul,R. and Mattiasson, B. 1991. Evaluation of Alginate-Immobilized *Lactobacillus casei* for Lactate Production. Appl.

Microbiol. Biotechnol. 36: 309-314.

Guoqiang, D., Kaul,R. and Mattiasson, B. 1992. Immobilization of *Lactobacillus casei* Cells to Ceramic Material Pretreated with Polyethylenimine. Appl. Microbial. Biotechnol. 37: 305-310.

Krischke, W., Schroder, M. and Trosch, W. 1991. Continuous Production of L-Lactic Acid from Whey Permeate by Immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 573-578.

Montelongo, J., Chassy, B. M. and McCORD, J. D. 1993. *Lactobacillus salivarius* for Conversion of Soy Molasses into Lactic Acid. J. of Food Sci. 58(4): 863-866.

Roukas, T. and Kotzekidou, P. 1991. Production of Lactic Acid from Deproteinized Whey by Coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* Cells. Enzyme Microb. Technol. 13: 33-37.

Tipayang, P. and Kozaki, M. 1982. Lactic Acid Production by a New *Lactobacillus casei* sp., *lactobacillus vaccinostercus* Kozaki and Okada sp. Nov., Immobilized in Calcium Alginate. J. Fermentation Technol. 60: 595-598.

ภาคผนวก

1. วิธีเตรียม Dinitrosalicylic reagent (DNS reagent)

- ละลาย 3,5 - dinitrosalicylic acid 10 กรัม ใน 2 N NaOH 200 มล.
- เติมน้ำกลั่น 500 มล. คนให้ละลาย
- เติม Potassium sodium tartrate 300 กรัม คนให้ละลาย
- ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.ด้วยน้ำกลั่น

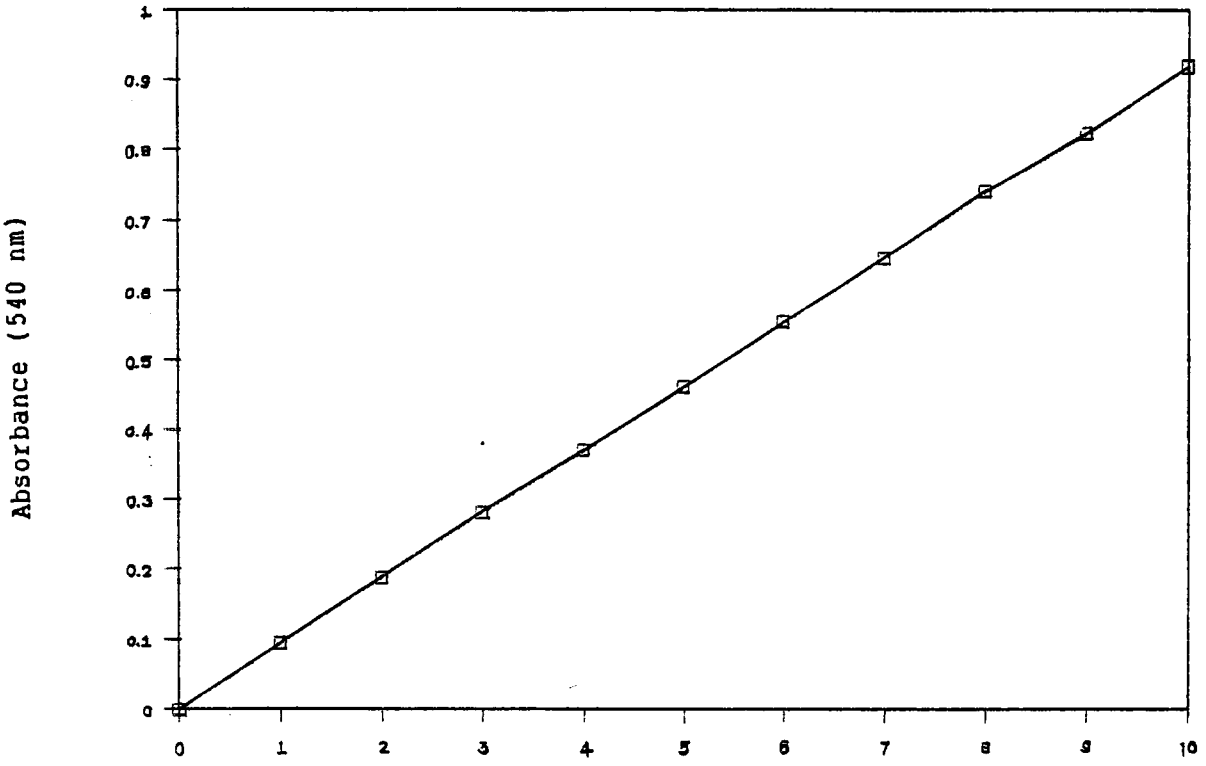
2. การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

- เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 10 μmole/ml. โดยละลายกลูโคสแอนไฮดรัส 0.1802 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

- ปิเปตสารละลายกลูโคสที่เตรียมได้ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 ใส่หลอดทดลอง 11 หลอด เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรในแต่ละหลอดเท่ากับ 1 มิลลิลิตร - เติม DNS-reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร แช่หลอดทดลองในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็นทันที เมื่อเย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้ว เติมน้ำกลั่น หลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

- นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

- เขียนกราฟระหว่างค่าที่อ่านได้กับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส จากการทดลองกราฟมาตรฐานกลูโคสแสดงดังรูป



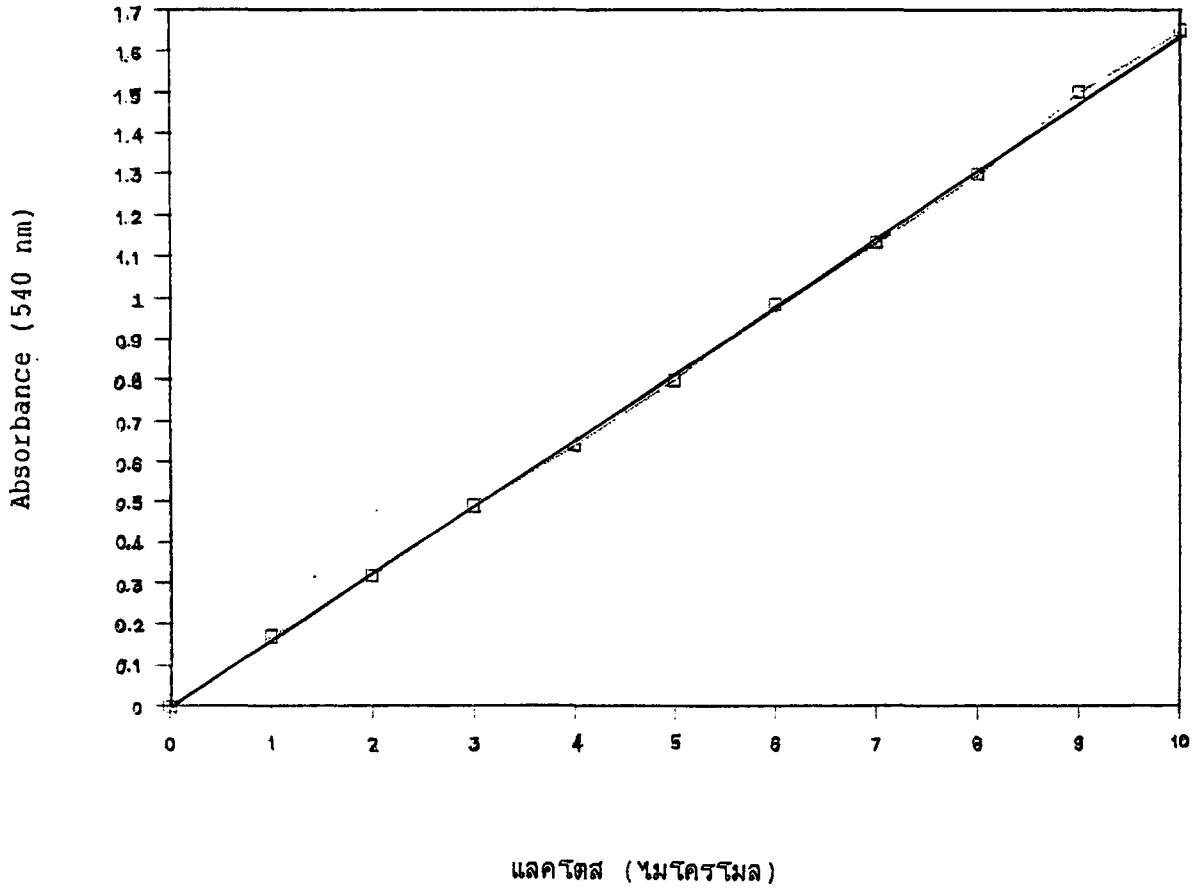
รูปที่ ก. กราฟมาตรฐานของกลูโคส

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานแลคโตส

- เตรียมสารละลายแลคโตสมาตรฐาน 5 umole/ml. โดยละลายแลคโตส 0.1802 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิตร

- ปิเปตสารละลายแลคโตสที่เตรียมได้ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 ใส่หลอดทดลอง 11 หลอด เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรในแต่ละหลอดเท่ากับ 1 มิลลิลิตร - เติม DNS-reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตรแช่หลอดทดลองในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็นทันที เมื่อ เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้ว เติมน้ำกลั่น หลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

- นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
- เขียนกราฟระหว่างค่าที่อ่านได้กับความเข้มข้นของสารละลายแลคโตส จากการทดลองกราฟมาตรฐานแลคโตสแสดงดังรูป



รูปที่ ข. กราฟมาตรฐานของแลคโตส

4. Glucose Yeast extract Peptone (GYP) media

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ มีส่วนประกอบดังนี้

GYP - Sodium acetate mineral salt media

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Sodium acetate	10.0	กรัม
**Solution B	5.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

Solution B

$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	10.0	มิลลิกรัม
$MnSO_4.4H_2O$	10.0	มิลลิกรัม
NaCl	10.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

**ปรับ pH เป็น 6.8 ก่อนนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน

อาหารที่ใช้ในการหมักกรดแลคติก มีส่วนประกอบดังนี้

GYP media

Glucose	50.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Calcium carbonate	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

**ปรับ pH เป็น 6.8 ก่อนนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน

5. การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

- เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (1) และสารละลายไดโซเดียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟต (2) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

- นำไปปรับ pH เป็น 6.5 และ 7.0 โดยค่อย ๆ เทสารละลาย (1) ลงในสารละลาย (2)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอภิรดี ศรีธัญลักษณา เกิด เมื่อวันที่ 17 ธันวาคม พ.ศ. 2516 ณ จังหวัดกรุง เทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจาก โรง เรียน เตรียมอุดมศึกษา พัฒนาการ ในปี พ.ศ.2533 และได้ เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรีที่ภาควิชาอุตสาหกรรม เกษตร คณะ เทคโนโลยีการ เกษตร สถาบัน เทคโนโลยีพระจอม เกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปี การศึกษา 2533

นางสาวอรสุม ศิริรัตน์ เกิด เมื่อวันที่ 24 ตุลาคม พ.ศ. 2515 ณ จังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจาก โรง เรียนสตรีวิทยา ในปี พ.ศ.2533 และได้ เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรี ที่ภาควิชาอุตสาหกรรม เกษตร คณะ เทคโนโลยีการ เกษตร สถาบัน เทคโนโลยีพระจอม เกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2533