



วิทยานิพนธ์

การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus*

ATCC 10863

THE PRODUCTION OF LACTIC ACID WITH IMMOBILIZED

Lactobacillus rhamnosus ATCC 10863

นางสาวชลดา ศิริเสตสุวรรณ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863
The Production of Lactic Acid with Immobilized *Lactobacillus rhamnosus*
ATCC 10863

นางผู้วิจัย นางสาวชลลดา ศิริเสตสุวรรณ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล, Dr.rer.nat.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจกสุขสถิตย์, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์วิเชียร กิจปรีชาวนิช, Dr.Eng.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุนัย นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

The Production of Lactic Acid with Immobilized

Lactobacillus rhamnosus ATCC 10863

โดย

นางสาวชลลดา ศิริเสตสุวรรณ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2551

ชลดา ศิริเสตสุวรรณ 2551: การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล, Dr.rer.nat. 171 หน้า

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญ มีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร หรือที่เกี่ยวข้องกับอาหาร ตลอดจนใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพอลิแลกเตต ซึ่งเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนากรรมวิธีการผลิตกรดแลกติก โดยมีการคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกประกอบด้วย (ต่อลิตร) น้ำตาลกลูโคส 10 กรัม Yeast extract 15 กรัม $MgSO_4$ 0.2 กรัม $MnSO_4$ 0.03 กรัม Sodium citrate 0.5 กรัม $FeSO_4$ 0.03 กรัม KH_2PO_4 2.5 กรัม NH_4Cl 5 กรัม และ H_2SO_4 0.015 มิลลิลิตร มีอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 0.53 กรัม/ลิตร ชั่วโมง

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงโดยอาศัยวิธีการทางสถิติในการออกแบบการทดลอง โดยมีการแปรผันปัจจัย 4 ปัจจัยแบบ $L_9(2^1 \times 3^3)$ orthogonal array ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ปริมาตรเมล็ดเซลล์ตรึง 46.825 มิลลิลิตร, ปริมาตรอาหาร 93.75 มิลลิลิตร, พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 5.7 และขนาดพลาสติก 500 มิลลิลิตร พบว่าทุกปัจจัยมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรเท่ากับ 5.56 กรัม/ลิตร และ 0.93 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จ แบบครึ่งคราว และแบบเบ็ดเสร็จด้วยระบบแยกกรดแลกติกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจเวียนกลับน้ำหมักด้วยอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเมล็ดเซลล์ตรึงและน้ำหมักเท่ากับ 250/750 พบว่าการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยระบบแยกกรดแลกติก มีปริมาณกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 36.50 กรัม และ 1.141 กรัม/ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จ และแบบครึ่งคราว ส่วนการผลิตกรดแลกติกแบบครึ่งคราวมีประสิทธิภาพในการใช้กลูโคสสูง ทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จที่ความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคสเท่ากัน

Chollada Sirisatesuwon 2008: The Production of Lactic Acid with Immobilized *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Sarote Sirisansaneeyakul, Dr.rer.nat. 171 pages.

Lactic acid is an essential organic acid, due to its widely used in food and food-related industries, and its role for the production of biodegradable plastic. This study improved lactic acid fermentation process by selecting culture medium for *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. The result showed that the optimal media consisted of (l^{-1}): glucose 10 g, yeast extract 15 g, $MgSO_4$ 0.2 g, $MnSO_4$ 0.03 g, sodium citrate 0.5 g, $FeSO_4$ 0.03 g, KH_2PO_4 2.5 g, NH_4Cl 5 g and H_2SO_4 0.015 ml. This optimal media gave the highest volumetric lactic acid productivity of $0.53\text{ g l}^{-1}\text{ h}^{-1}$.

Taguchi experimental design was used to optimize the production of lactic acid with immobilized *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 and the 4 factors of L_9 ($2^1 \times 3^3$) orthogonal array were selected. The following conditions were obtained: 46.825 ml volume of beads, 93.75 volume of medium, 5.7 pH of medium and 500 ml size of flask. All these factors were found to be significant on lactic acid concentration and volumetric lactic acid productivity. At this optimal condition, lactic acid concentration and volumetric lactic acid productivity were 5.56 g l^{-1} and $0.93\text{ g l}^{-1}\text{ h}^{-1}$, respectively.

Batch, fed batch and batch with lactic acid recovery system in packed bed reactor with broth recycle were used to produce lactic acid. The beads/broth ratio of immobilized *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 was 250/750. The batch with lactic acid recovery system gave the highest lactic acid and volumetric lactic acid productivity of 36.50 g and 1.14 g h^{-1} , respectively, which is higher than batch and fed batch production of lactic acid. Also, fed batch production of lactic acid showed the higher glucose consumption than batch production at the same initial glucose concentration.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สาโรจน์ ศิริสันตนิยกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาเสียสละเวลาให้โอกาสและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย และการศึกษาในระดับปริญญาโท ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประมุข กระจกสุขสถิตย์ กรรมการที่ปรึกษา วิชาเอก และรองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ที่กรุณาให้ คำปรึกษาเพิ่มเติมในการทำวิจัย และ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย รศ. สมบัติ ขอทวีวัฒนา ที่ได้กรุณาให้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2549 จากบัณฑิตวิทยาลัย ขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว และน้องชายที่ได้ให้กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาของ ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และคณะอุตสาหกรรมเกษตร สำหรับความช่วยเหลือ คำปรึกษา กำลังใจและมิตรภาพที่ดีในการศึกษา ระดับปริญญาโท รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ธุรการ ที่อำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัยเป็นอย่างดีมาตลอด

ประโยชน์ และความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ และ คณาจารย์ทุกท่านที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอน และให้ความรู้ มาจนถึงปัจจุบัน

ชลลดา ศิริเสตสุวรรณ

เมษายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(7)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(11)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
ผลและวิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	94
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	98
ภาคผนวก	108
ภาคผนวก ก ข้อมูลการทดลอง	109
ภาคผนวก ข การประมาณค่าพารามิเตอร์	121
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์	129
ภาคผนวก ง การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์	137
ภาคผนวก จ การประมาณค่าพารามิเตอร์ด้วยโปรแกรม MATLAB™	145
ภาคผนวก ฉ สรุปผลการเตรียมเซลล์ตรึงไคโตซาน	159
ภาคผนวก ช ข้อมูลและรายละเอียดคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ	167
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	171

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของกรดแลกติก	5
2	ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการหมัก	13
3	ตัวอย่างของสัทธิบัติที่เกี่ยวกับการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในอุตสาหกรรม	19
4	L-4 (2^3) Orthogonal array	21
5	สูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 10863	28
6	ปัจจัย และระดับแต่ละปัจจัยในการทดลองการผลิตกรดแลกติกระดับพลาสติก	31
7	L-9 ($2^1 \times 3^3$) orthogonal array	32
8	ปัจจัยและระดับต่าง ๆ ในการทดลองการผลิตกรดแลกติกระดับพลาสติก	32
9	การเปรียบเทียบผลการผลิตกรดแลกติกโดย <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ระดับ พลาสติกในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร	46
10	สรุปผลการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงแบบเบ็ดเสร็จระดับพลาสติกภายใต้สภาวะการทดลองที่แปรผัน 4 ปัจจัย (9 ชุดการทดลอง)	53
11	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความเข้มข้นของกรดแลกติก (C_p)	55
12	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/S}$)	56
13	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p)	57
14	สรุปค่าอัตราส่วน S/N จำนวนโดยอาศัยความเข้มข้นของกรดแลกติก (C_p) ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/S}$) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) จากผลการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง	60
15	การวิเคราะห์อิทธิพลหลักของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยอาศัยค่าอัตราส่วน S/N ของแต่ละระดับปัจจัยของปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัย	62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	สรุปสถานะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาस्कที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทางกฐิ โดยพิจารณาจากความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร	66
17	สรุปการประมาณค่าความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร ภายใต้สถานะที่เหมาะสมด้วยวิธีการทางกฐิ	67
18	สรุปผลการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงระดับฟลาस्क ภายใต้สถานะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการทางกฐิ	70
19	การเปรียบเทียบค่าประมาณและผลจากการทดลองของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงระดับฟลาस्क ภายใต้สถานะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการทางกฐิ	71
20	การเปรียบเทียบผลการทดลองการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงระดับฟลาस्क ระหว่างชุดการทดลองจากการหาสถานะที่เหมาะสม (ชุดการทดลอง C และ H) กับชุดการทดลองการยืนยันภายใต้สถานะที่เหมาะสม (ชุดการทดลอง A และ B)	72
21	ผลการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยระบบถังหมักปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดระดับปฏิบัติการ	78
22	เปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ในถังหมักแพ็กเบดระดับปฏิบัติการด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750	81
23	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์แพ็กเบดเวียนกลับน้ำหมักระหว่างการผลิตแบบเบ็ดเสร็จ และการผลิตแบบครั้งคราว	84
24	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์แพ็กเบดที่มี และไม่มีระบบแยกกรดแลกติกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ	87
25	พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 แบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์แพ็กเบด	89

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
26	พารามิเตอร์ทางจุลณพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 แบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์แพ็กเบด	92
27	สรุปผลการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจุลณพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลก-ติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดเวียนกลับน้ำหมัก	92
ตารางผนวกที่		
ก1	น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติกกับเวลาที่เพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 5 สูตร	110
ก2	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากูชิ ครั้งที่ 1	111
ก3	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากูชิ ครั้งที่ 2	112
ก4	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากูชิ จากความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร	113
ก5	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากูชิ จากผลได้ของกรดแลกติก	113
ก6	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 (อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก เท่ากับ 125/750)	114
ก7	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 (อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก เท่ากับ 250/750)	114

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก8	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 (อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก เท่ากับ 500/750)	116
ก9	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคส 23.54 กรัม/ลิตร	117
ก10	การผลิตกรดแลกติกแบบครึ่งคราวเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคส 27.36 กรัม/ลิตร	118
ก11	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ด้วยระบบแยกกรดแลกติก ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคส 51.14 กรัม/ลิตร	119
ก12	ความเข้มข้นกรดแลกติกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ	120
ค1	การเตรียมสารละลายน้ำตาลเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน	131
ค2	การเตรียมสารละลายลิเทียมแลกเตตเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานลิเทียมแลกเตต	134
จ1	ไฟล์ “BatchEstim250.m”	149
จ2	ไฟล์ “ExpFitEval.m”	151
จ3	ไฟล์ “BatchFcn.m”	151
จ4	ไฟล์ “BatchEstim125.m”	152
จ5	ไฟล์ “ExpFitEval.m”	154
จ6	ไฟล์ “BatchFcn.m”	154
จ7	ไฟล์ “BatchEtim500.m”	155
จ8	ไฟล์ “ExpFitEval.m”	157
จ9	ไฟล์ “BatchFunc.m”	157
ฉ1	การคำนวณความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงในการทดลองที่ 2	162
ฉ2	การวัดขนาดของเม็ดเจลเซลล์ตรึงในการทดลองที่ 2	162

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า	
น3	การคำนวณความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงไคโตซานในการศึกษาการแปรผันอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก	163
น4	การวัดขนาดของเม็ดเจลเซลล์ตรึงในการศึกษาการแปรผันอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก	163
น5	การคำนวณความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงไคโตซานในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 23.54 กรัม/ลิตร	164
น6	การวัดขนาดของเม็ดเจลเซลล์ตรึงในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 23.54 กรัม/ลิตร	164
น7	การคำนวณความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงไคโตซานในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจที่มีอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750	165
น8	การวัดขนาดของเม็ดเจลเซลล์ตรึงในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจที่มีอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750	165
น9	การคำนวณความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงไคโตซานในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจที่มีระบบแยกกรดแลกติกโดยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ	166
น10	การวัดขนาดของเม็ดเจลเซลล์ตรึงในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจที่มีระบบแยกกรดแลกติกโดยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ	166
ข1	คุณสมบัติ และข้อกำหนดของแอมเบอร์ไลต์ ไออาร์เอ-67	168

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตร โครงสร้างกรดแลกติก	4
2	กลไกการเกิดกรดแลกติกจากกรดไพรูวิก	5
3	วิธีการสร้างกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติก	10
4	โครงสร้างของไคโตซาน	17
5	การเกิดปฏิกิริยาไอออนิก อินเตอร์แอกชันระหว่างไคโตซาน กับสารละลายโซเดียมไตรฟอสเฟต ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$)	17
6	ขั้นตอนการเตรียมเม็ดเจลเซลล์ตรึง	30
7	สรุปวิธีการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ	33
8	ถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และส่วนสูงเท่ากับ 6.6x27.5 เซนติเมตร	35
9	รูปแบบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจ	35
10	แสดงระบบควบคุมการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแบบแพ็คเกจ	36
11	คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchange colume) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และ ส่วนสูงเท่ากับ 4.6 x 20 เซนติเมตร	38
12	รูปแบบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจด้วยระบบแยกกรดแลกติก	39
13	การผลิตกรดแลกติกโดย <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 โดยมีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.48 กรัม/ลิตร	41
14	การผลิตกรดแลกติกโดย <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 โดยมีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 11.38 กรัม/ลิตร	42
15	การผลิตกรดแลกติกโดย <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 โดยมีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.90 กรัม/ลิตร	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	การผลิตกรดแลกติกโดย <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 4 โดยมีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.64 กรัม/ลิตร	44
17	การผลิตกรดแลกติกโดย <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 5 โดยมีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 10.59 กรัม/ลิตร	45
18	การผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง A (2 ชั่วโมง)	48
19	การผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง B (2 ชั่วโมง)	49
20	การผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง C (2 ชั่วโมง)	49
21	การผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง D (2 ชั่วโมง)	50
22	การผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง E (2 ชั่วโมง)	50
23	การผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง F (2 ชั่วโมง)	51
24	การผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง G (2 ชั่วโมง)	51
25	การผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง H (2 ชั่วโมง)	52
26	การผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง I (2 ชั่วโมง)	52
27	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกรดแลกติก ในการผลิตกรด แลกติกด้วยเซลล์ตรึง	64
28	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อผลได้ของกรดแลกติก ในการผลิตกรด แลกติกด้วยเซลล์ตรึง	64
29	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร ในการ ผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง	65
30	การผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีการทางกษิ ภายใต้สภาวะชุดการทดลอง A (ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง 46.825 มล. ปริมาตร อาหาร 93.75 มล. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 5.7 และขนาดพลาสติก 500 มล.)	68
31	การผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีการทางกษิ ภายใต้สภาวะชุดการทดลอง B (ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง 15.625 มล. ปริมาตร อาหาร 281.125 มล. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6.0 และขนาดพลาสติก 500 มล.)	69

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
32	การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ด้วยอัตราส่วน $V_B/V_M=125/750$ ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 50.46 กรัม/ลิตร	75
33	การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ด้วยอัตราส่วน $V_B/V_M=250/750$ ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 51.87 กรัม/ลิตร	76
34	การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ด้วยอัตราส่วน $V_B/V_M=500/750$ ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 43.66กรัม/ลิตร	77
35	ความสัมพันธ์อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเมล็ดเซลล์ตรึงและน้ำหมัก (V_B/V_M) กับความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p , ▲) ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/S}$, ■) และ อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p , ●)	79
36	การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึงด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 23.54 กรัม/ลิตร	80
37	การผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึงด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 27.36 กรัม/ลิตร	83
38	การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึงด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 51.14 กรัม/ลิตร	86
39	เปรียบเทียบผลการทดลองแสดงความเข้มข้นของกลูโคส (o) และกรดแลกติก (□) กับ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (เส้น) โดยมีอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเมล็ดเซลล์ตรึงและน้ำหมักเท่ากับ 125/750	89
40	เปรียบเทียบผลการทดลองแสดงความเข้มข้นของกลูโคส (o) และกรดแลกติก (□) กับ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (เส้น) โดยอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเมล็ดเซลล์ตรึงและปริมาตรน้ำหมักดังนี้ (a) 250/750 และ (b) 500/750 ตามลำดับ	91

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
41 เปรียบเทียบค่า effectiveness factor (η) ของน้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติกระหว่างอัตราส่วนต่าง ๆ ของปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและปริมาตรน้ำหมัก	93
ภาพผนวกที่	
ก1 การชะคอัลมัน์แลกเปลี่ยนประจุด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มัล	120
ข1 การหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)	122
ข2 การหาผลได้เซลล์ ($Y_{x/s}$)	123
ข3 การหาผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$)	124
ค1 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส	132
ค2 กราฟมาตรฐานสารละลายลิเทียมแลกเตต	134
ง1 อัตราการเปลี่ยนแปลงของกลูโคสและกรดแลกติกในน้ำหมักและเม็ดเจลไคโตซาน (chitosan-bead)	138

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำอธิบายสัญลักษณ์

F	อัตราการไหล (ลิตร/ชั่วโมง)
F1	อัตราการไหลของน้ำหมักจากถังพักน้ำหมักเข้าสู่ถังปฏิกรณ์เซลล์ครึ่ง (ลิตร/ชั่วโมง)
F2	อัตราการไหลของน้ำหมักออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ครึ่งเข้าสู่ถังพักน้ำหมัก (ลิตร/ชั่วโมง)
F3	อัตราการไหลของน้ำหมักจากถังพักน้ำหมักเข้าสู่คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ (มิลลิลิตร/นาที่)
F4	อัตราการไหลของน้ำหมักออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุเข้าสู่ถังพักน้ำหมัก (มิลลิลิตร/นาที่)
L	จำนวนระดับของปัจจัย
N	จำนวนการทดลอง
r	จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง
y	ผลการทดลอง
$\bar{y}$	ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง
y_0	ผลการทดลองที่กำหนด
T	เวลาในการผลิต (ชั่วโมง)
T_f	เวลาในการผลิตที่ให้กรดแลกติกสูงสุด (ชั่วโมง)
C_{Xi}	ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น (กรัม/ลิตร)
C_{Si}	ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)
C_{Sf}	ความเข้มข้นกลูโคสที่ให้กรดแลกติกสูงสุด (กรัม/ลิตร)
C_P	ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัม/ลิตร)
C_P^m	ความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุด (กรัม/ลิตร)
q_s	อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (กรัม/กรัม ชั่วโมง)
q_p	อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (กรัม/กรัม ชั่วโมง)
Q_s	อัตราการใช้กลูโคส (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)
Q_P	อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)
V_M	ปริมาตรของน้ำหมัก (ลิตร)
V_B	ปริมาตรของเบดเจลเซลล์ครึ่ง (ลิตร)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

คำอธิบายสัญลักษณ์

$Y_{p/s}$ ผลได้ของกรดแลกติก (กรัม/กรัม)

$Y_{x/s}$ ผลได้เซลล์ (กรัม/กรัม)

ตัวอักษรกรีก

μ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง⁻¹)

η effectiveness factor

การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

The Production of Lactic Acid with Immobilized

Lactobacillus rhamnosus ATCC 10863

คำนำ

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญ มีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตทั้งหมด มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนใหญ่จะใช้กรดแลกติกเป็นส่วนประกอบของอาหารโดยตรง (ศิวาพร, 2535; Vickroy, 1985) แบคทีเรียกรดแลกติก *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ให้ผลได้ของกรดแลกติกสูง ($Y_{p/s}=0.84$) และมีความโดดเด่นกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ คือ มีความสามารถในการใช้สับสเตรตเริ่มต้นในความเข้มข้นสูง (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 80 กรัม/ลิตร) ในขณะเดียวกันก็สามารถผลิตกรดแลกติกที่มีความเข้มข้นสูง (67 กรัม/ลิตร) เช่นกัน (Berry, 1999)

ปัจจุบันการผลิตกรดแลกติกมีอยู่ประมาณ 80,000 ตันต่อปี โดยประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของกรดแลกติกที่ผลิตนั้น ผลิตมาจากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ และอีก 10 เปอร์เซ็นต์ได้มาจากการหมักโดยกระบวนการทางเคมี เนื่องจากการหมักกรดแลกติกโดยเชื้อจุลินทรีย์ดีกว่า เพราะสามารถเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกที่เป็นไอโซเมอร์ที่ต้องการเพียงชนิดเดียวได้ ส่วนการผลิตโดยกระบวนการทางเคมีนั้นจะผลิตกรดแลกติกได้เป็น racemic mixture คือ มีทั้ง L(+)-lactic acid และ D(-)-lactic acid ผสมกัน จึงต้องเสียค่าใช้จ่ายในการแยกให้บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นค่าใช้จ่ายที่สำคัญต่อต้นทุนการผลิตกรดแลกติก ทำให้กระบวนการผลิตกรดแลกติกมีต้นทุนสูงเป็นอุปสรรคในการนำกรดแลกติกไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ

การปรับปรุงการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการตรึงเซลล์จึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ เนื่องจากการใช้เซลล์ตรึงมีข้อดีกว่าเซลล์อิสระ คือ สามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ได้ใหม่ เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความคงตัวกว่าเซลล์อิสระ ดังนั้นในการใช้ซ้ำในกรรมวิธีการผลิตแบบเบ็ดเสร็จ (batch process) หรือการผลิตแบบต่อเนื่อง (continuous process) จึงทำได้ง่ายกว่า และการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นมีโอกาสน้อยลง นอกจากนี้ การเก็บเกี่ยวผลผลิตในระบบที่ใช้เซลล์ตรึงนั้นสามารถทำได้ง่ายกว่าการใช้เซลล์อิสระ (ภาวิณี, 2531) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาพื้นฐานทางด้านจลนพลศาสตร์การหมัก

ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวเสียก่อน และนำไปพัฒนากระบวนการหมักโดยใช้เทคนิคการตรึงเซลล์เข้าร่วมด้วย ซึ่งเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ และสามารถ

นำผลจากการวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการหมักในขนาดใหญ่ได้

การศึกษานี้มุ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactococcus rhamnosus* ATCC 10863 โดยการคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงโดยวิธีการทากูชิ และศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จ แบบครึ่งคราว และแบบเบ็ดเสร็จที่มีระบบแยกกรดแลกติกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ

วัตถุประสงค์

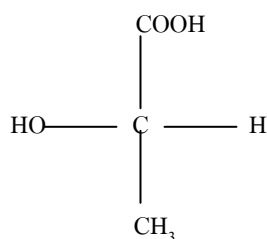
1. ศึกษาอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์อิสระ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863
2. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 โดยโคโตซานในระดับฟลาสก์ โดยวิธีการทางกุ่มิ
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์ แพ็กเบดเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 โดยโคโตซานในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

การตรวจเอกสาร

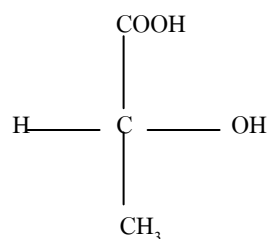
กรดแลกติก

กรดแลกติกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid เป็นกรดอินทรีย์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในร่างกายของมนุษย์ สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ กรดแลกติกถูกตรวจพบ และแยกได้เป็นครั้งแรกจากนมเปรี้ยวโดยนักเคมีชาวสวีเดนในปี ค.ศ. 1780 ส่วนการผลิตกรดแลกติกเกิดขึ้นเป็นครั้งแรก ณ ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1881 โดยนายเอเวอร์แห่งเมืองลิตเทิลตัน (Littleton) เพื่อผลิตเกลือแคลเซียมแลกเตตมาใช้ทดแทนการนำเข้าเกลือทราเทตที่เป็นส่วนผสมของผงฟูในขณะนั้น แต่ยังไม่เป็นผลสำเร็จในการผลิตเชิงพาณิชย์ ต่อมาในปี ค.ศ. 1895 บริษัทโบริงเจอร์ แห่งเมืองอินเกลไฮม์ ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี สามารถประสบความสำเร็จในการสร้างโรงงานขึ้น เพื่อผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมได้ (Buchta, 1983 อ้างโดย สารโรจน์, 2544; Vickroy, 1985)

กรดแลกติกมีสูตรโมเลกุลคือ $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ โดยในธรรมชาติจะพบกรดแลกติกในรูปของ L(+)-lactic acid และ D(-)-lactic acid ซึ่งต่างเป็นไอโซเมอร์ซึ่งกันและกัน (ภาพที่ 1) หรืออาจจะพบรวมกันในรูปแบบ DL-lactic acid ส่วนในร่างกายคน และสัตว์พบเพียง L(+)-lactic acid เพราะในร่างกายของคน และสัตว์มีเพียงเอนไซม์ L-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส (ภาพที่ 2) เท่านั้น ดังนั้น การที่คนบริโภค D(-)-lactic acid และ DL-lactic acid จะทำให้ในร่างกายมี D(-)-lactic acid ในปริมาณที่สูง ส่งผลให้เกิดภาวะความเป็นกรดสูงในปัสสาวะได้



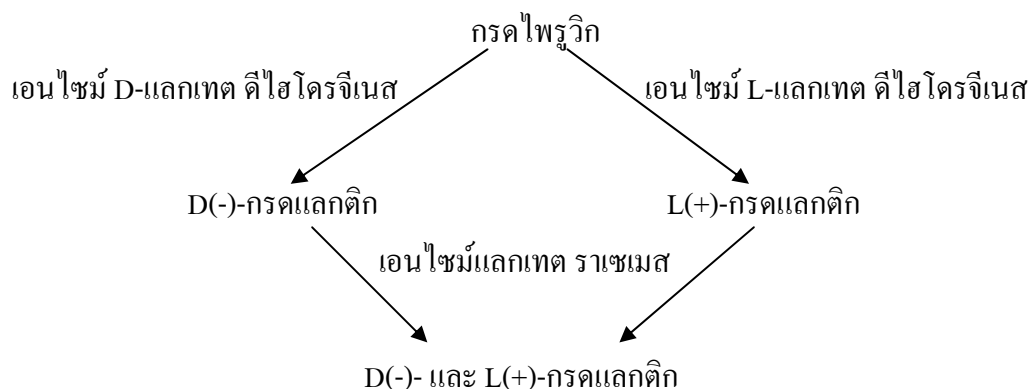
L (+)-lactic acid



D (-)-lactic acid

ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างกรดแลกติก

ที่มา: Buchta (1983) อ้างโดยเกสร (2545)



ภาพที่ 2 กลไกการเกิดกรดแลกติกจากกรดไพรูวิก

ที่มา: สารวจน์ (2547)

คุณสมบัติดังตารางที่ 1 กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงสามารถเกิดผลึกแบบ monoclinic ที่ไม่มีสีได้ กรดแลกติกสามารถละลายน้ำได้ทุกอัตราส่วน และระเหยได้ยาก โดยสารละลายที่มีกรดแลกติกตั้งแต่ 20 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปจะเกิดปฏิกิริยา self-esterification ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คาร์บอกซิลได้

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

Properties	Lactic acid
Molecular weight	90.8
Melting point D(-) or L(+)	52.8-54.0 °C
Boiling point DL	82 °C at 0.5 mmHg 122 °C at 14 mmHg
Dissociation constant (Ka at 25 °C)	1.37×10^{-4}
Heat of combustion	1,361 kJ mol ⁻¹
Specific heat (Cp at 20 °C)	190 J mol ⁻¹ °C

ที่มา: Vickroy (1985)

ความสำคัญของกรดแลกติก

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญ มีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตทั้งหมด มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนใหญ่จะใช้กรดแลกติกเป็นส่วนประกอบของอาหารโดยตรง โดยใช้เป็นตัวปรับความเป็นกรดของอาหาร เติมแต่งในอาหาร และเครื่องดื่มน้ำเพื่อปรุงแต่งกลิ่นรสให้มีรสชาติเปรี้ยวที่พึงประสงค์ กรดแลกติกจะให้ความเปรี้ยวเล็กน้อย มีกลิ่นไม่รุนแรง ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิต stearyl-2-lactylates ซึ่งใช้ปรับปรุงคุณลักษณะของแป้ง และใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ในผลิตภัณฑ์ขนมอบต่าง ๆ กรดแลกติกยังใช้เป็นสารป้องกันการเสื่อมเสียของอาหาร ในการถนอมอาหารอีกด้วย บางครั้งอาจใช้ร่วมกับกรดชนิดอื่น ๆ เช่น กรดโพรพิโอนิก และกรดแอซิติก เป็นต้น นิยมใช้กรดแลกติกในผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เพราะข้อดีประการหนึ่งของกรดแลกติก คือ การที่เคลือบแล็กเทตสามารถละลายน้ำได้ดี ทั้งนี้เนื่องมาจากส่วนประกอบอื่น ๆ ของผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เช่น ผลไม้ กัม หรือน้ำที่ใช่มักมีเคลือบเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย และเคลือบเหล่านี้จะเกิดการตกตะกอนถ้าหากผลิตภัณฑ์นั้นใช้กรดซิตริก แต่การใช้กรดแลกติกจะช่วยป้องกันปัญหาดังกล่าวได้ (ศิวาพร, 2535; Vickroy, 1985; Tejayadi and Cheryan, 1995)

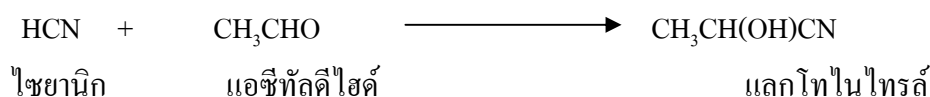
นอกจากนี้สามารถนำกรดแลกติกไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้แก่ การใช้กรดแลกติกเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ในอุตสาหกรรมยาใช้กรดแลกติกเป็นสารตัวกลางในการผลิตยาต่าง ๆ ส่วนกรดแลกติกในรูปเอทิลแล็กเทต (ethyl lactate) ใช้เป็นสารหล่อลื่นในยาเม็ด และการผลิตยาแก้อักเสบ (anti-inflammatory) หรือยาแก้สิว (antiacne) บางชนิด ในอุตสาหกรรมสิ่งทอใช้กรดแลกติกในการพิมพ์สีผ้า กระดาษ และการย้อมผ้า ซึ่งช่วยให้เกิดความเงาของผ้าไหม และผ้าไหมสังเคราะห์ ในอุตสาหกรรมพอลิเมอร์ใช้กรดแลกติกเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตพอลิแล็กเทต (polylactate) ซึ่งเป็นเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) ที่มีความแข็งแรงสูง และสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymer) โดยพอลิแล็กเทตสามารถใช้ทดแทนพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีที่ย่อยสลายได้ยาก ซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (สาโรจน์, 2544; Isihzaki, 2001) หรือใช้สำหรับการต่อกระดูก หรือเป็นไหมเย็บแผลที่สลายได้ในทางการแพทย์ (Akerberg *et al.*, 1998; Hofvendahl *et al.*, 1999) และยังสามารถนำมาผสมกับแป้งเพื่อผลิตเป็นวัสดุภัณฑ์ต่าง ๆ

การผลิตกรดแลกติก

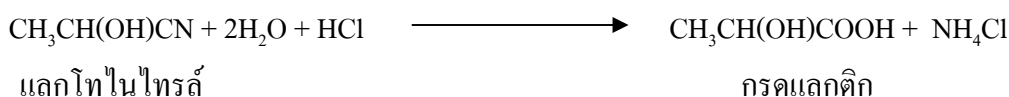
กรดแลกติกได้จากกระบวนการผลิต 2 วิธี คือ กระบวนการทางเคมี และกระบวนการหมัก โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้

1. การผลิตกรดแลกติกโดยการสังเคราะห์ทางเคมี (Vickroy, 1985) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนได้แก่

ขั้นที่ 1 นำกรดไซยานิกมาทำปฏิกิริยากับแอซีทัลดีไฮด์ได้เป็นแลกโทโนไทรล์ ดังสมการ

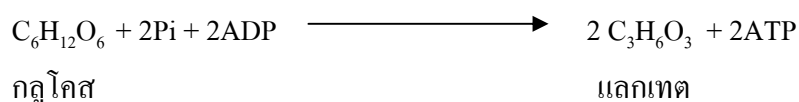


ขั้นที่ 2 นำแลกโทโนไทรล์ที่ได้มาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับกรดไฮโดรคลอริกได้เป็นกรดแลกติก และแอมโมเนียมคลอไรด์ ดังสมการ



2. การผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ (อรพิน, 2523; สาทโรจน์, 2544; Vickroy, 1985) เป็นการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติก ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 แบบ ตามลักษณะการผลิตกรดแลกติกของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

2.1 โฮโมเฟอร์เมนเทชัน (Homofermentation) เป็นการผลิตกรดแลกติกโดยจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกร้อยละ 80 ขึ้นไป ด้วยวิธีไกลโคไลซิส (ภาพที่ 3) โดยน้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไพรูเวต แล้วถูกเอนไซม์แลกเตตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) เปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแลกเตต โดยน้ำตาลกลูโคส 1 โมล จะเปลี่ยนไปเป็นแลกเตตได้ 2 โมล ดังสมการ



แลกติกเท่ากับ 0.88 และ 0.51 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และสามารถใส่สับสเตรตได้หมด และให้ผลได้ของกรดแลกติกเท่ากับ 1 กรัมกรดแลกติก/กรัมสับสเตรต เมื่อทำการหมักโดยการผสมกันของแบคทีเรียทั้งสองชนิด

2. แหล่งอาหารไนโตรเจน

แหล่งอาหารไนโตรเจนมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการหมักเช่นกัน Hujanen และ Linko (อ้างโดย มีชัย, 2546) ได้ศึกษาถึงการใช้น้ำยาสกัดร่วมกับยีสต์สกัด และใช้มอลต์ร่วมกับยีสต์สกัดเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนในการผลิตกรดแลกติกโดย *Lactobacillus casei* B- 441 พบว่าชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจน และปริมาณความเข้มข้นมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

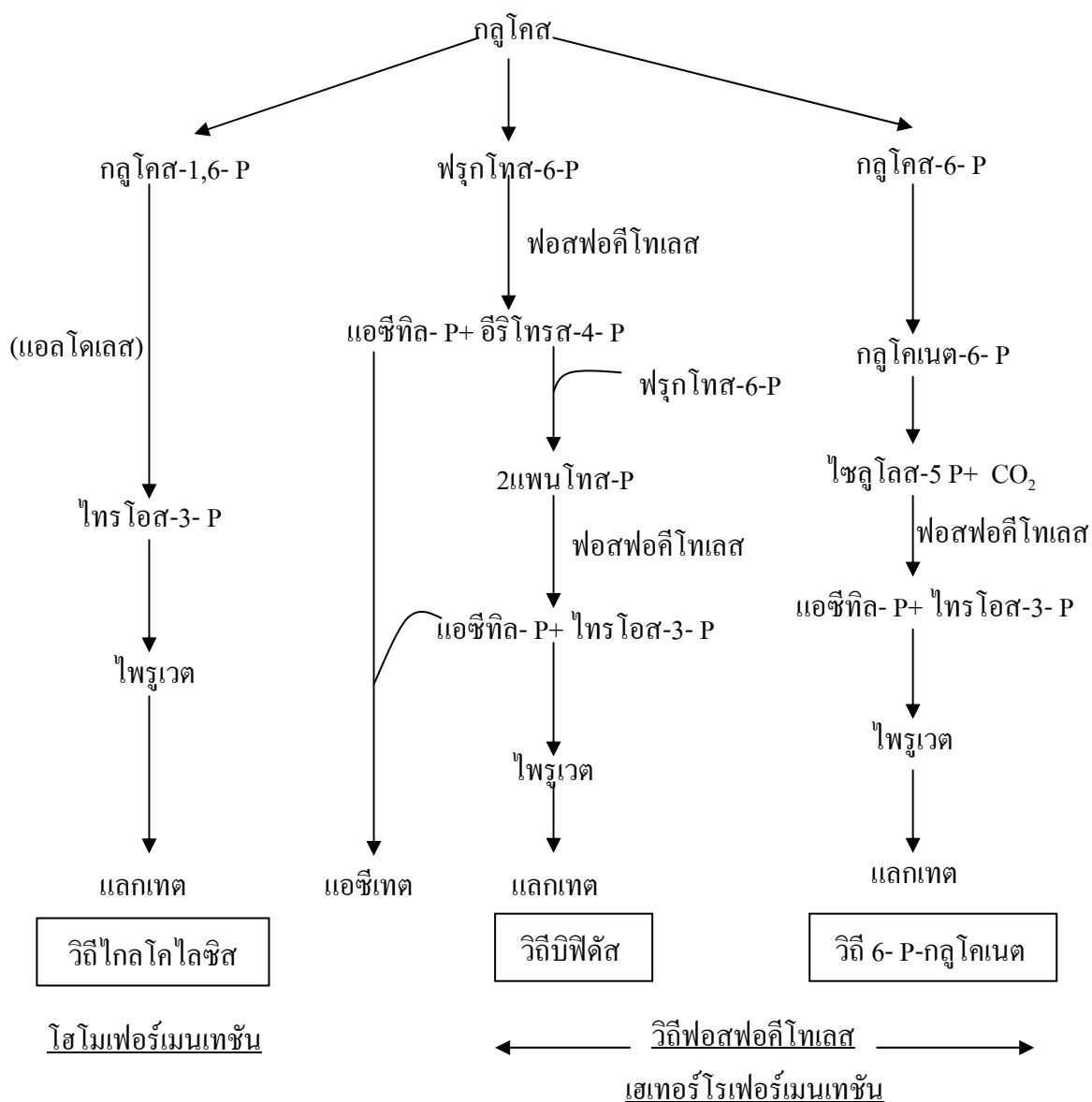
Rivas *et al.* (2004) ได้ทดลองผลิตกรดแลกติกโดย *Lactobacillus rhamnosus* CECT-288 ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เซลล์ยีสต์ *Debaryomyces hansenii* จากการผลิตไซลิทอล และน้ำย่อยข้าวโพดแทนการใช้น้ำยาสกัด และเปปโตเน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีในระดับเดียวกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อบริบูรณ์

3. อุณหภูมิและพีเอช

อุณหภูมิจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิห้อง

Hujanen และ Linko (อ้างโดย มีชัย, 2546) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactobacillus casei* พบว่า อัตราการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลกติกสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Goncalves *et al.* (1997) ศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรเจนไอออน (H^+) กรดแลกติกที่ไม่แตกตัว (undissociate lactic acid) และความเข้มข้นแลกเทต โดยเพาะเลี้ยง *Lactobacillus rhamnosus* แบบเบ็ดเสร็จที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ พบว่าที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 และ 5.5 จุลินทรีย์ดังกล่าวมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากันที่ความเข้มข้นกรดแลกติกไม่แตกตัวเท่ากัน นอกจากนั้นยังพบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และความเข้มข้นกรดแลกติกที่ไม่แตกตัวลดลง เมื่อความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 6.0



ภาพที่ 3 วิธีการสร้างกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติก

ที่มา : สารวจน์ (2547)

4. การยับยั้งการเจริญเติบโต

สับสเทรตที่มีอยู่อย่างเหลือเฟือเพื่อทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หยุดชะงัก และผลผลิตบางชนิดจากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เอง เช่น เอทานอล กรดแลกติก และกรดแอซิติก เป็นต้น

Goncalves *et al.* (1991) ศึกษาผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโต พบว่าเมื่อความเข้มข้นกลูโคสเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5 เป็น 33 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำให้เวลาในระยะปรับตัว (lag phase) เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดลดลงจาก 0.55 เป็น 0.18 ชั่วโมง⁻¹

การพัฒนาการผลิตกรดแลกติก

ในการผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการหมักนั้นมีต้นทุนในการผลิตสูง โดยต้นทุนการผลิตส่วนใหญ่มาจากที่วัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ ซึ่งได้แก่ สารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน หรือสับสเตรต เช่น น้ำตาลกลูโคส และแลคโทส และสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น ยีสต์สกัด และเปปโตน เป็นต้น ต้นทุนอีกส่วนมาจากขั้นตอนการทำกรดแลกติกให้บริสุทธิ์ (Ishizaki *et al.*, 1999; Youssef *et al.*, 2000) และถ้าในกระบวนการผลิตกรดแลกติกได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ จะทำให้สับสเตรตเหลืออยู่ในปริมาณมากจึงทำให้กระบวนการแยกกรดแลกติกให้บริสุทธิ์มีต้นทุนสูงขึ้น ดังนั้นการพัฒนาการผลิตกรดแลกติกให้มีต้นทุนการผลิตต่ำจึงเป็นสิ่งที่มีความจำเป็น โดยแนวทางหลัก ๆ ในการพัฒนามีอยู่ 3 แนวทาง คือ การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการใช้สับสเตรตได้ดี และผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่สูง การใช้วัตถุดิบที่หาง่าย ราคาถูก และการพัฒนากระบวนการผลิตกรดแลกติกให้มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกสูง

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้นั้นมีอยู่หลายชนิด แต่แบคทีเรียที่มีบทบาทมากในปัจจุบันคือ แบคทีเรียกรดแลกติก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ทนต่อสภาพความเป็นกรดได้สูง

สามารถอยู่ได้ในสภาพที่พีเอชเท่ากับ 5 หรือต่ำกว่า ซึ่งช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการปนเปื้อนจาก เชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ รวมทั้งยังเป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อย ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายจากการให้ออกซิเจน การที่จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงนั้น พิจารณาได้จากค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมัก คือ ผลได้ของกรดแลกติก อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการผลิตกรดแลกติก นอกเหนือจากการได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพแล้ว การใช้วัตถุดิบที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตดี และมีราคาถูกก็เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง กลูโคสจัดเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถใช้ได้ดี แต่มีราคาสูงจึงต้องหาแหล่งอาหารคาร์บอนชนิดอื่น ๆ ที่มีราคาถูกกว่ามาทดแทน เช่น กากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล หางนมซึ่งเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมนม ไซโลสไฮโดรไลสได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร นอกจากนี้แหล่งอาหารไนโตรเจนก็เป็น

สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และมีส่วนสำคัญต่อต้นทุนการผลิตเช่นกัน รวมทั้งการพัฒนากระบวนการหมักก็มีความจำเป็น และมีส่วนสำคัญในการลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากกระบวนการหมักที่แตกต่างกันจะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกแตกต่างกันด้วย โดยพบว่ากระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จจะมีปัญหาเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญเติบโตจากการสะสมของกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นในถังหมัก จึงได้มีการพัฒนาระบบการหมักแบบต่อเนื่องขึ้นมาเพื่อแก้ปัญหานี้ เพราะฉะนั้นทั้งสามแนวทางจึงเป็นหัวข้อในการศึกษา และพัฒนาที่ควบคู่ไปด้วยกัน

ลักษณะทั่วไปของ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Lactobacillus rhamnosus ATCC 10863 เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในนม ผลิตภัณฑ์จากนม ผลิตภัณฑ์หมักดอง ในช่องปาก ลำไส้ อุจจาระ และช่องคลอดของมนุษย์ เป็น facultative anaerobe รูปร่างเป็นท่อน (rod) ต่อกันเป็นสาย ไม่มี flagella จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยตัวเอง เมื่อ pour plate ได้โคโลนีเรียบ มีสีขาวค่อนข้างโปร่งเหลือง เป็นแบคทีเรียชนิดโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ (homofermentative) ผลิตเฉพาะ L(+)-lactic acid สามารถทนต่อความเป็นกรดได้สูง โดยสามารถมีชีวิตรอดได้ที่พีเอชเท่ากับ 5 หรือต่ำกว่า และยังพบว่า *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 เจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง คือ 15-40 องศาเซลเซียส และสามารถใช้สับเทรตเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งจะทำให้สามารถผลิตกรดแลกติกได้คราวละมาก ๆ จึงเป็นข้อได้เปรียบของจุลินทรีย์ชนิดนี้ (ตารางที่ 2)

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงหมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขต หรือสถานที่ทางกายภาพให้อยู่ในบริเวณซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (Abbott, 1977)

การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงได้มีการศึกษามานานแล้วโดยในปี ค.ศ.1823 Schuetzenbach ได้ทำการผลิตน้ำส้มสายชูด้วยฟิล์มเชื้อที่ติดบนจี้เกลียว (Abbott, 1977) ต่อมาในปี ค.ศ. 1960 Hattori และ Furusaka ได้ทำการตรึงเซลล์ที่มีชีวิตของ *Escherichia coli* และ *Azotobacter agile* โดยยัดไว้บนไดเวกซ์-1 พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงนี้สามารถออกซิไดส์กลูโคส และกรดซัคซินิกได้ ต่อมาในปี

ค.ศ. 1973 มีการใช้ *Escherichia coli* ที่ถูกตรึงด้วยสาร polyacrylamide มาผลิต L-aspartic acid ในระบบอุตสาหกรรมเป็นแห่งแรก (Chibata *et al.*, 1974)

ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในระดับอุตสาหกรรมในการผลิตชีวภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ฟรุกโทส (Bucke, 1982), เอทานอล (Gilson and Thomas, 1995), กรดมาลิก (L-malic acid) (Olivira and Costa, 1994) เป็นต้น

ตารางที่ 2 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการหมัก

Microorganisms	Carbon sources	Fermentation System	Conditions					Lactic acid (g l ⁻¹)	Yield (g g ⁻¹)	Volumetric productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)	References
			pH	Temp (°C)	Agitation (rpm)	Substrate conc. (g l ⁻¹)	Dilution rate (h ⁻¹)				
<i>L. lactis</i> IO-1 ⁽¹⁾	Sago starch hydrolysate	Batch	6.0	37	400	9.4*	-	7.63	0.96	1.38	Sirisansaneeyakul <i>et al.</i> (1998)
	Cassava starch hydrolysate	Batch	6.0	37	400	25.04*	-	25.09	0.99	3.24	Sirisansaneeyakul <i>et al.</i> (2000)
	Cassava starch hydrolysate	Continuous stage	6.0	37	400	S ₀ = 8.85	0.81	5.46	0.88	4.42	Sirisansaneeyakul <i>et al.</i> (2003)
	Cassava starch hydrolysate	Continuous stags + CR	6.0	37	400	S ₀ = 31.99 (X=2.45)	0.87 (B=0.50)	12.75	0.89	11.09	Sirisansaneeyakul <i>et al.</i> (2004)
	Glucose	Continuous stags + CR	6.0	37	400	S ₀ = 23.02 (X=4.06)	0.96 (B=0.25)	13.94	0.93	13.39	“
	Glucose	Continuous stage	6.0	37	400	S ₀ = 44.75	D ₁ = 0.60 D ₂ = 0.60 (B=0.50)	21.29	0.83	6.39	“
	Glucose	Continuous stags + CR (X ₂ =3.61)	6.0	37	400	S ₀ = 29.93	D ₁ = 0.80 D ₂ = 0.30 (B=0.50)	25.97	0.89	6.42	“
	Glucose	Continuous stags + CR (X ₂ =4.02)	6.0	37	400	S ₀ = 39.51	D ₁ = 0.80 D ₂ = 0.30 (B=0.50)	30.78	0.91	7.33	“

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Microorganisms	Carbon sources	Fermentation System	Conditions					Lactic acid (g l ⁻¹)	Yield (g g ⁻¹)	Volumetric productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)	References
			pH	Temp (°C)	Agitation (rpm)	Substrate conc. (g l ⁻¹)	Dilution rate (h ⁻¹)				
<i>L. lactis</i> IO-1 ⁽¹⁾	Glucose	Continuous 1-stags + CR (X ₂ =15)	6.0	37	400	S ₀ = 53	1.1	30.1	0.91	33.1	Nolasco-Hipolito <i>et al.</i> (2002)
<i>Lb. rhamnosus</i> ⁽²⁾	Glucose	Batch	5.5	40	100	80.0*	-	67	0.84	2.48	Berry <i>et al.</i> (1999)
<i>Lb. rhamnosus</i> ⁽²⁾ ATCC 10863	Glucose	Continuous 2-stags + CR (X ₂ =120)	6.0	42	N/A	S ₀ = 110	0.62 (B=0.053)	92		57	Kwon <i>et al.</i> (2001)
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> ⁽²⁾	Glucose	Batch	6.0	45	N/A	30.0*	-	27.8	0.89	2.78	Siebold <i>et al.</i> (1995)
<i>Lb. delbrueckii</i> ⁽²⁾	Glucose	Immobilized continuous	6.3	42	N/A	100.0*	0.39	51.4	0.76	20.1	Goncalves <i>et al.</i> (1992)
<i>Lb. helveticus</i> ⁽²⁾	Whey permeate	Continuous + CR	5.5	42	500	60.0**	1.05	N/A	0.88	15.8	Aeschlimann and Stockar. (1991)
<i>Lb. bulgaricus</i> ⁽²⁾	Cheese whey permeate	Continuous + CR	5.6	45	N/A	100.0**	0.25	89	0.89	22.5	Tejayadi and Cheryan. (1995)
<i>Lb. delbrueckii</i> ⁽²⁾	Glucose	Continuous + CR	6.3	42	N/A	100.0*	0.4	90	0.82	36	Xavier <i>et al.</i> (1995)

หมายเหตุ CR cell recycle, N/A ไม่มีข้อมูล, ⁽¹⁾ L. หมายถึง *Lactococcus*, ⁽²⁾ Lb. หมายถึง *Lactobacillus*, * glucose และ ** lactose

1. การพิจารณาคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

คุณสมบัติของสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์โดยทั่วไปพิจารณาจาก (ภาวิณี, 2531)

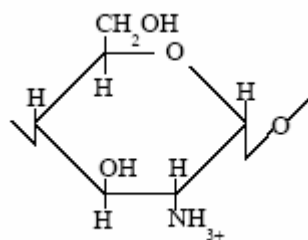
- 1.1 ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ และสิ่งแวดล้อม
- 1.2 ไม่กระทบกระเทือนต่อระบบเมแทบอลิซึม
- 1.3 ความจุของสารพาหะ และการตรึง
- 1.4 การตรึงเซลล์ในสภาวะปลอดเชื้อ จะต้องเลือกสารพาหะที่ทนต่อความร้อนได้สูง เนื่องจากต้องทำให้สารพาหะนั้นปลอดเชื้อซึ่งต้องใช้อุณหภูมิ และความดันสูง
- 1.5 การตรึงเซลล์ปริมาณมากควรจะใช้สารพาหะที่มีรูปพรุนขนาดใหญ่ เพื่อช่วยให้สารอาหารผ่านได้ดีขึ้น
- 1.6 เป็นสารพาหะที่มีราคาถูก และสามารถนำกลับมาใช้ได้

ในปัจจุบันมีรายงานการทดลองเกี่ยวกับการใช้สารชนิดต่าง ๆ ในการตรึงเซลล์ ได้แก่ แคลเซียมแอลจีเนต (calcium alginate) และไคโตซาน (chitosan)

2. ไคโตซาน (chitosan)

เป็นสารพาหะที่ค่อนข้างใหม่ และเป็นสารที่น่าสนใจ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเกิดเจลได้ดี ราคาไม่แพง วิธีการเตรียมสามารถเตรียมได้ที่อุณหภูมิห้อง เซลล์ภายหลังการตรึงยังคงมีชีวิต สามารถเจริญเติบโต และแบ่งตัวได้ภายในเจล (Vorlop and Klein, 1987)

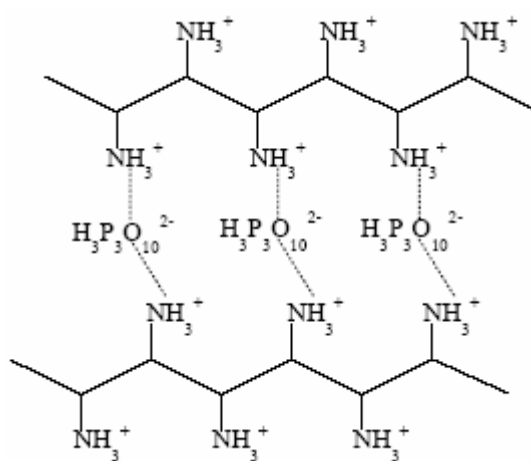
ไคโตซาน (ภาพที่ 4) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งประกอบด้วยอนุภาคของไคติน (chitin) ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างไคติน กับด่างเข้มข้น และสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ เช่น กรด แอซีติก การเกิดเจลจะเกิดขึ้นเมื่อมีไอออนที่สัมพันธ์ได้กับกลุ่มฟังก์ชันของเซลล์ ไอออนดังกล่าวได้แก่ ferricyanide, ferrocyanide และ polyaldehydohydrocarbonic acid เป็นต้น (Vorlop and Klein, 1987)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของไคโตซาน

3. การตรึงเซลล์ด้วยวิธี Entrapment

วิธี Entrapment เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ตรึงเซลล์ได้ดี (ภาวิณี, 2531) และเป็นวิธีที่ใช้อย่างกว้างขวางกับเซลล์จุลินทรีย์ (Shuler and Kargi, 2002) โดยเซลล์จะเข้าไปอยู่ในโครงร่างตาข่ายของไคโตซาน ซึ่งต้องมีโครงสร้างที่หนาแน่นพอที่จะป้องกันการรั่วออกมาของเซลล์ ขณะเดียวกันสภาวะและผลิตภัณฑ์จะต้องสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้เป็นอย่างดี รวมถึงเซลล์ที่อยู่ภายในโครงร่างตาข่ายนั้น สามารถที่จะมีชีวิตและเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ แสดงการตรึงเซลล์ด้วยไคโตซานดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การเกิดปฏิกิริยาอินเตอร์เอกชันระหว่างไคโตซาน กับสารละลายโซเดียมไตรฟอสเฟต ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$)

4. การเปรียบเทียบข้อดี และข้อเสียของระบบเซลล์ตรึง (ภาวิณี, 2531)

4.1 ข้อดี

4.1.1 เซลล์ที่ถูกตรึงเจริญเติบโตได้ และสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ต้องการโดยที่ไม่
มีปฏิกิริยาอื่นแทรกซ้อน จึงทำให้ระบบเซลล์ตรึงผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ

4.1.2 ในระบบเซลล์ตรึงนั้น สามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ได้ง่าย สะดวก และ
สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยการใช้สารละลายอาหารเจือจางซึ่งทำให้มีความ
สะดวกในการเตรียมสารละลายอาหาร และการใช้งาน

4.1.3 การผลิตสารจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์อาจเกิดขึ้นควบคู่กับ
การเจริญเติบโต หรือระหว่างการหยุดพักการเจริญเติบโตของเซลล์

4.1.4 เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความคงตัวกว่าเซลล์อิสระ ดังนั้นในการใช้ซ้ำในระบบ
เบตช์เรจ (batch process) หรือการใช้ในระบบต่อเนื่อง (continuous process) จึงทำได้ง่ายกว่า และ
การปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นมีโอกาสน้อยลง

4.1.5 การเก็บเกี่ยวผลผลิตในระบบที่ใช้เซลล์ตรึงนั้นสามารถทำได้ง่ายกว่าการใช้
เซลล์อิสระ

4.2 ข้อเสีย

4.2.1 การแพร่กระจายของสารละลายอาหารไม่ดี จะทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ไม่
สามารถทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ

4.2.2 ค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์สูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงใน
อุตสาหกรรม ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง โดยวิธี
ต่าง ๆ และวัตถุประสงค์ในการใช้เซลล์ตรึง เช่น การใช้เซลล์ตรึงเพื่อผลิต D-lactic acid และ
L-lactamide ด้วยวิธี entrapment และการนำเซลล์ตรึงแบบที่เรียกว่าวิธี encapsulation มาผสมใน
โยเกิร์ต เป็นต้น

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในอุตสาหกรรม

ปี ค.ศ.	หัวข้อเรื่อง	ผู้ประดิษฐ์	สิทธิบัตร	รายละเอียด/หมายเหตุ
1985	Production by immobilized microorganism	Hiroaki, H. and K. Keiichi.	Jpn. Patent 60006196	N/A
1994	Bioreactor with immobilized lactic acid bacteria and the use there	Heikki, L. <i>et al.</i>	Z.A. Patent 9308823	N/A
1995	Production of D-lactic acid and L-lactamide	Eiji, S. <i>et al.</i>	Jpn. Patent 7327693	กระบวนการผลิต D-lactic acid และ L-lactamide ด้วยการตรึงเซลล์แบคทีเรีย โดยวิธี entrapment และเติม DL- lactamide ลงไปในเซลล์ตรึง
2002	Liquid yogurt with encapsulated lactic acid bacteria and method for producing the same	Young-Sup, S. <i>et al.</i>	U.S. Patent 6447823	N/A
2002	Yogurt with encapsulated lactic acid bacteria and method for producing same	Young-Sup, S. <i>et al.</i>	T.W. Patent 501913B	กระบวนการผลิต โยเกิร์ตที่ผสมเซลล์ตรึงแบคทีเรียแลกติกในรูปของแคปซูล
2003	Improved NURUK (Malted Rice) containing active dried-yeasts and encapsulated lactic acid bacteria and method for manufacturing traditional rice wine using the same	Bong, C.G. <i>et al.</i>	K.R. Patent 085954	N/A
2003	Method for obtaining food, predominantly, lactic acid production (variants)	Zenovich, S.M.	R.U. Patent 2213460	กระบวนการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง
2004	Encapsulated crystalline lactic acid	Andre, C.D.M. and B.E. Willem.	U.S. Patent 115315	กระบวนการตรึงกรดแลกติกที่อยู่ในรูปของ crystalline เพื่อใช้เป็นอาหาร

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก ด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบด

การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของกระบวนการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จจากกลูโคสด้วยการตรึงเซลล์ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์สร้างขึ้นอาศัยสมการที่เกี่ยวข้องกับภาวะจำกัดของการแพร่ในเซลล์ตรึง (Shuler and Kargi, 2002) ได้ตั้งสมการ (ภาคผนวก จ)

1. สมการอนุพันธ์แสดงการเปลี่ยนแปลงกลูโคสโดยการตรึงเซลล์ดังนี้

$$\frac{dC_{glu}^{ex}}{dt} = -\eta_{glu} \left(\frac{q_{glu}^m}{K_{glu}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} \frac{V_B}{V_M}$$

2. สมการอนุพันธ์แสดงการเปลี่ยนแปลงกรดแลกติกโดยการตรึงเซลล์ดังนี้

$$\frac{dC_{lac}^{ex}}{dt} = \eta_{lac} \left(\frac{q_{lac}^m}{K_{lac}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} \frac{V_B}{V_M}$$

หมายเหตุ คู่มืออธิบายสัญลักษณ์ในภาคผนวก ง การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทาคุชิ (Taguchi Method)

การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทาคุชิถูกพัฒนาโดย Dr. Genichi Taguchi เมื่อปี ค.ศ. 1980 ซึ่งเป็นเทคนิค หรือกลไกทางวิทยาศาสตร์สำหรับการกำหนดค่า และการปรับปรุงเครื่องมือ กระบวนการ และวัตถุดิบที่เกี่ยวข้องกับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ให้ง่าย หรือสะดวกขึ้น การปรับปรุงนี้มีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงลักษณะ และลดจำนวนของความผิดพลาดลงพร้อม ๆ กัน โดยศึกษาถึงการควบคุมตัวแปรหลักในกระบวนการ และการหาสภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง หรือการออกแบบการทดลองเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด (Madhav, 1989) วิธีการทาคุชิออกแบบการทดลอง โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ fractional factorial ร่วมกับ orthogonal array (OA) (Box *et al.*, 1988) ซึ่งเป็นตารางที่ประกอบไปด้วยการทดลอง และระดับของปัจจัยในแต่ละการทดลอง มีหลาย

ประเภทขึ้นกับจำนวนปัจจัยและระดับของปัจจัยนั้น โดย OA จะมีจำนวนน้อยที่สุดเท่ากับ L_4 (Lochner and Matar, 1990) แสดงตัวอย่าง OA (L_4) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 $L_4 (2^3)$ Orthogonal array

ชุดการทดลอง	ปัจจัย		
	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

ที่มา: Roy (2001)

ซึ่งเทคนิคนี้ประกอบด้วย 8 ขั้นตอน และในขั้นตอนทั้งหมดสามารถจัดกลุ่มใหญ่ ๆ ออกได้ 3 กลุ่ม (Madhav, 1989) คือ

1. การออกแบบการทดลอง (Designing of experiment : DOE)

- 1.1 บ่งชี้หน้าที่หลัก ผลข้างเคียง และแบบ หรือชนิดของความผิดพลาด
- 1.2 บ่งชี้ปัจจัยรบกวน และสถานะที่ใช้ในการทดสอบสำหรับการคำนวณการเสื่อมคุณภาพ
- 1.3 บ่งชี้ลักษณะของคุณภาพที่สังเกตได้ และหาสถานะที่เหมาะสมของกระบวนการทดลอง
- 1.4 บ่งชี้ปัจจัยควบคุม และระดับต่าง ๆ ของปัจจัย
- 1.5 ออกแบบการทดลองแบบเมทริกซ์ และการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง

2. การทำการทดลอง (Conducting experiment)

ทำการทดลองโดยใช้การทดลองแบบเมทริกซ์

3. การวิเคราะห์ และการยืนยันผลการทดลอง (Analyzing and confirming predicted result)

3.1 การวิเคราะห์ข้อมูล ทำนายระดับที่เหมาะสมของปัจจัยควบคุม และทำนายการทดลอง ภายใต้ระดับเหล่านี้

3.2 ยืนยันผลการทำนาย และออกแบบการทดลองต่อไป

การวัดค่าในวิธีการทางสถิติจะแสดงในรูปของอัตราส่วน Signal/Noise (อัตราส่วน S/N) ซึ่งถูกใช้เพื่อวัดอิทธิพลของ noise factor (ตัวแปรที่ไม่สามารถควบคุมได้ในกระบวนการ) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ หรือกระบวนการ โดยอาศัยการวัดลักษณะของคุณภาพ (quality characteristic, QC) ซึ่งสามารถแสดงถึงความต้องการการเปลี่ยนแปลงของผลการทดลองที่ต้องการต่างกันออกไปประกอบด้วย 3 รูปแบบ ดังนี้ 1. QC = B (Bigger is better) 2. QC = S (Smaller is better) และ 3. QC = N (Nominal is best)

นอกจากนี้ วิธีการทางสถิติยังนำเอาการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) มาใช้เพื่อพิจารณาอิทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่อการทดลองที่ได้

4. ข้อดีของการออกแบบการทดลองโดยอาศัยวิธีการทางสถิติ

4.1 เป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้ได้ง่าย และใช้ได้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการสื่อสาร และโทรคมนาคม เป็นต้น

4.2 ช่วยลดจำนวนของการทดลอง ทำให้ประหยัดเวลา และต้นทุนในการทดลอง

4.3 ช่วยให้การทำการทดลองง่าย และสะดวกขึ้น

4.4 ให้ผลลัพธ์ที่น่าเชื่อถือได้ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง

และจากการศึกษาค้นคว้างานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการประยุกต์ใช้วิธีการทางสถิติในการผลิตกรดแลกติก ปรากฏงานวิจัยที่มีการประยุกต์ใช้วิธีดังกล่าวเกี่ยวกับกระบวนการผลิตกรดแลกติกดังนี้

ดิยะภรณ์ (2549) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 โดยวิธีการทางสถิติ โดยมีการแปรผันปัจจัยทั้งหมด 8 ปัจจัย แบบ $L_{18}(2^1 \times 3^7)$ orthogonal array ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ชนิดของการตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจินต(encapsulation) ความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงที่ใช้ 5.28 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคส 45 กรัม/ลิตร

ความเข้มข้นยีสต์สกัด 10 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นบีฟสกัด 10 กรัม/ลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.85 ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 10 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นเปปโตน 7.5 กรัม/ลิตร โดยพบว่าทุกปัจจัยมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นสุดท้ายของกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรของการผลิตกรดแลกติกอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 10.94 กรัม/ลิตร และ 1.82 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

Nagarjun *et al.* (2005) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกด้วย *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 โดยอาศัยวิธี Taguchi ในการออกแบบการทดลองซึ่งประกอบด้วย 8 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ, พีเอช, ปริมาณกลูตาเชื้อ, ปริมาณความชื้น, ปริมาณยีสต์สกัด, ปริมาณ แมกนีเซียมซัลเฟต, ปริมาณ Tween 80 และปริมาณ corn steep liquor โดยอาศัย $L_{18} (2^1 \times 3^7)$ orthogonal array พบว่า การผลิตกรดแลกติกภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้ผลได้กรดแลกติกสูงขึ้น เท่ากับ 93.50 เปอร์เซ็นต์

Acharya (2004) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกด้วยวิธี Solid state fermentation (SSF) โดยเซลล์ *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 ซึ่งในการทดลองใช้วิธีการทางสถิติในการออกแบบการทดลอง (DOE) ซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 8 ปัจจัย โดยที่ 7 ปัจจัยมี 3 ระดับ และ 1 ปัจจัยมี 2 ระดับ ซึ่งใช้ $L_{18} (2^1 \times 3^7)$ orthogonal array ดังนั้นการทดลองทั้งหมดจึงมี 18 การทดลอง และจากการทดลอง พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ได้แก่ อุณหภูมิ (40 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น (14 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาณของ yeast extract (3 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร/น้ำหนัก) $MgSO_4 \cdot H_2O$ (0.15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร/น้ำหนัก) และ Tween 80 (0.15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร/น้ำหนัก)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

- 1.1 ถังหมัก (fermenter); (ยี่ห้อ B. Braun Biotech International รุ่น Biostat B, Germany) ขนาด 2 ลิตร พร้อมระบบควบคุมการกวน การให้อากาศ พิเอชและอุณหภูมิ
- 1.2 เครื่องสูบลม (pump); (ยี่ห้อ Swan รุ่น DR-115, Taiwan)
- 1.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge); (ยี่ห้อ B. Braun International รุ่น SIGMA 203, Germany)
- 1.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer); (ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV1201-, Japan)
- 1.5 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง(pH meter); (ยี่ห้อ Horiba รุ่น M-11, Japan)
- 1.6 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator); (ยี่ห้อ Memmert, Germany)
- 1.7 เครื่องชั่งแบบละเอียด (Balance); (ยี่ห้อ Sartorial รุ่น 1615MP, USA.)
- 1.8 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave); (ยี่ห้อ Sanyo รุ่น Labo Autoclave, Japan)
- 1.9 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ; (ยี่ห้อ New Brunswick Scientific รุ่น G-25, USA.)
- 1.10 เครื่องกวน (Magnetic stirrer); (ยี่ห้อ Scott รุ่น CAT-M6, Germany)
- 1.11 เครื่องสูบลม (Peristaltic pump); (ยี่ห้อ atto รุ่น model AT-2105, Japan)
- 1.12 หม้อแปลงไฟฟ้า; (ยี่ห้อ Tron รุ่น AUTO-03)
- 1.13 หัวเข็มฉีดยา; (ยี่ห้อ Nipro, Japan) ขนาด 20-G (0.9 มิลลิเมตร)
- 1.14 สายยางซิลิโคน; (ยี่ห้อ Dura) ขนาด 4x7 มิลลิเมตร
- 1.15 เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์อื่น ๆ
- 1.16 เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์

2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกคือ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 สั่งซื้อจาก American Type Culture Collection และเก็บรักษาไว้ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยมีรหัสของการเก็บรักษาสายพันธุ์ คือ TISTR 108

3. สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.1 สารเคมี

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ใช้เป็น stock culture medium และใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อ โดยมีส่วนประกอบดังนี้

Glucose	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
MgSO ₄	0.2	กรัม
MnSO ₄	0.2	กรัม
Sodium citrate	5	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
K ₂ HPO ₄	2	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร

3.2 วิธีการ

3.2.1 ละลายส่วนประกอบทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.2 ปรับพีเอชเท่ากับ 5.7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

3.2.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

3.2.4 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

4. สารเคมี

4.1 การเตรียมเม็ดยาล้างจาน

- ไคโตซาน (T.C. union global public company limited, Thailand)

- โซเดียมไตรฟอสเฟต ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) (T-5883, Sigma, USA.)

4.2 การแยกกรดแลกติก

- แอมเบอร์ไลต์ ไออาร์เอ-67 (Amberlite IRA-67) (Supleco, USA.)

วิธีการ

1. การคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกระดับฟลาस्क

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงโดยถ่ายกล้าเชื้อ 250 ไมโครลิตร จาก stock culture ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 4.75 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด จำนวน 2 ขั้ว รวมทั้งหมด 5 ขวด เพื่อเตรียมเป็นกล้าเชื้อร้อยละ 5 ของปริมาตรการหมัก บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์อิสระระดับฟลาस्क

ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 1.1 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร โดยมีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 5) ปริมาตร 285 มิลลิลิตร จำนวน 10 ฟลาस्क (สูตรอาหารละ 2 ฟลาस्क) และทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างน้ำหมัก 10 มิลลิลิตร ทุกครึ่งชั่วโมงใน 2 ชั่วโมงแรก และเก็บทุก 2 ชั่วโมงในชั่วโมงถัดไป และยุติการเพาะเลี้ยงเมื่อการหมักอยู่ในระยะการเจริญเติบโตของเซลล์อิสระคงที่ หรือแหล่งอาหารคาร์บอนถูกใช้หมดไป เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติก

1.3 จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จ

นำผลการทดลองที่ได้จากข้อ 1.2 ไปคำนวณหาจลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกจากกลูโคส ดังวิธีการคำนวณในภาคผนวก ข การประมาณค่าพารามิเตอร์

ตารางที่ 5 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863

Medium Composition (g/l)	สูตร 1 (Kourkoutas <i>et al.</i> , 2005)	สูตร 2 (Kwon <i>et al.</i> , 2000)	สูตร 3 (Goncalves <i>et al.</i> , 1997)	สูตร 4 (Téllez-luis <i>et al.</i> , 2003)	สูตร 5 (สูตรอ้างอิง)
Glucose	10	10	10	10	10
Beef extract	-	-	-	-	10
Peptone	-	-	-	-	10
Yeast extract	5	15	15	-	5
Corn-Steep Liquor (CSL)	-	-	-	10	-
MgSO ₄	5	0.2	0.1	-	0.2
MnSO ₄	-	0.03	0.03	-	0.2
Sodium citrate	-	0.5	-	-	5
Ammonium citrate	-	-	-	-	2
K ₂ HPO ₄	1	-	0.1	-	2
Tween 80 (ml/l)	-	-	-	-	1
FeSO ₄	-	0.03	-	0.05	-
KH ₂ PO ₄	-	2.5	0.2	-	-
Sulfuric acid (ml/l)	-	0.015	-	-	-
NH ₄ Cl	-	5	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	-	-	-	-

2. ศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงระดับพลาสติก

2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงด้วยวิธีการทางภูมิ

2.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อและเซลล์

ถ่ายเชื้อ 250 ไมโครลิตร จาก stock culture ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 4.75 มิลลิตร จำนวน 3 หลอด จำนวน 2 ชุด เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อร้อยละ 5 ของ ปริมาตรการผลิต โดยบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่าย กล้าเชื้อที่ได้ปริมาตร 15 มิลลิตร ลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้ออยู่ 285 มิลลิตร จำนวน 2 พลาสติก และทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และอัตราการ เขย่า 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และนำไปเหวี่ยงแยกที่ 9,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศเชื้อ 2 ครั้ง เก็บเซลล์ที่แยกได้เพื่อศึกษาในการ ตรึงเซลล์ต่อไป

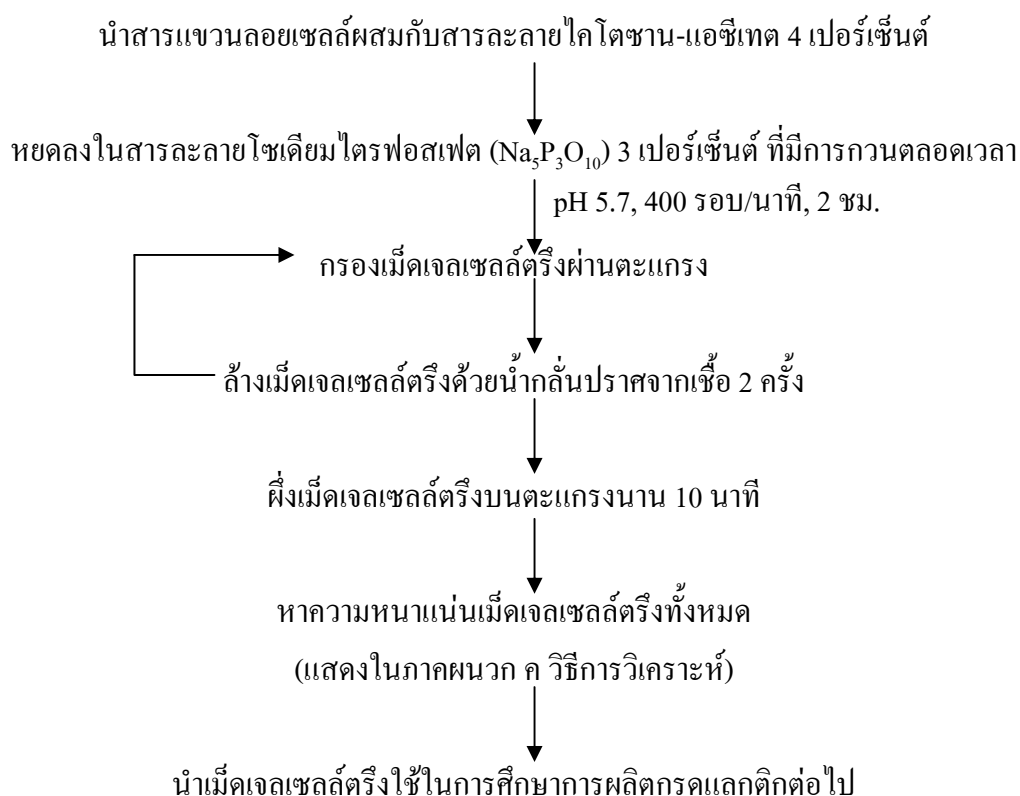
2.1.2 การเตรียมสารละลายไคโตซาน-แอซิเทต 4 เปอร์เซนต์ (ดัดแปลงจาก Freeman and Shemen, 1996)

ชั่งไคโตซาน 5 กรัม ใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิตร ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 108.35 มิลลิตร และเติมกรดแอซิกเข้มข้น (glacial acetic acid) 1.65 มิลลิตร ผสมให้ เข้ากันโดยการกวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เก็บสารละลายไคโตซานที่ได้เพื่อศึกษาในการตรึง เซลล์ต่อไป

2.1.3 การตรึงเซลล์ด้วยสารละลายไคโตซาน (ดัดแปลงจาก Vorlop and Klein, 1987; Freeman and Dror, 1994)

นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.1.1 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเท่ากับ 15 มิลลิตร และเติมลงในสารละลายไคโตซาน 4 เปอร์เซนต์ ที่เตรียมได้ในข้อ 2.1.2 ปริมาตรรวม ทั้งหมดเท่ากับ 125 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วค่อย ๆ หยดลงในพลาสติกขนาด 1 ลิตร ที่มี สารละลายโซเดียมไตรฟอสเฟต ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$) 3 เปอร์เซนต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 700

มิลลิลิตร พีเอช 5.7 และมีการกววน 400 รอบ/นาที โดยใช้สายยางซิลิโคนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4x7 มิลลิเมตร และเข็มฉีดยาเบอร์ 20G ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.9 มิลลิเมตร โดยการใช้ปั๊ม (AT-2105, Perista[®] midi pump, Atto, Japan) ควบคุมอัตราการไหลคงที่เท่ากับ 1.43 มิลลิลิตร/นาที เมื่อหยดเสร็จจึงทำการกววนต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความแข็งแรงของเม็ดยาล หลังจากนั้นนำเม็ดยาลมาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง และกรองเม็ดยาลเซลล์ตรึงที่ได้ผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที นำเม็ดยาลเซลล์ตรึงที่ได้ไปหาความหนาแน่น เม็ดยาลเซลล์ตรึงที่ได้ทั้งหมด แสดงในภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์ โดยทุกขั้นตอนทำภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ และเก็บเม็ดยาลเซลล์ตรึงโคโคซานไว้เพื่อใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกต่อไป แสดงขั้นตอนการเตรียมเม็ดยาลเซลล์ตรึงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการเตรียมเม็ดยาลเซลล์ตรึง (ภาคผนวก ก: สรุปผลการเตรียมเซลล์ตรึงไคโตซาน)

2.1.4 การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากูชิ

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ซึ่งมีทั้งหมด 4 ปัจจัย คือ ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง ปริมาตรอาหาร พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดฟลาสก์ โดยแบ่งเป็น 1 ปัจจัยที่มี 2 ระดับ และ 3 ปัจจัยที่มี 3 ระดับ ใช้ Orthogonal array (OAs) แบบ L-9 ($2^1 \times 3^3$) ดังนั้นจึงได้การทดลองทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง ประกอบด้วยจำนวนการทดลองที่ขึ้นอยู่กับระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งขนาดฟลาสก์ถูกกำหนดไว้ 2 ระดับ ดังนั้นจึงมีระดับที่ 1 อยู่ 6 ชุดการทดลอง และระดับที่ 2 อยู่ 3 ชุดการทดลอง ในขณะที่ปัจจัยอื่น ๆ อีก 3 ปัจจัยซึ่งแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ ดังนั้นปัจจัยเหล่านี้จะมีระดับที่ 1 2 และ 3 อย่างละ 3 ชุดการทดลอง ตารางที่ 7 แสดงภาพรวมของ L-9 ($2^1 \times 3^3$) orthogonal array ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้

ตารางที่ 6 ปัจจัย และระดับแต่ละปัจจัยในการทดลองการผลิตกรดแลกติกระดับฟลาสก์

ปัจจัย	ระดับ		
	1	2	3
A: ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง (มล.)	15.625	31.25	46.825
B: ปริมาตรอาหาร (มล.)	93.75	187.50	281.125
C: พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	5.7	6.0	6.3
D: ขนาดฟลาสก์ (มล.)	500	1000	-

2.1.5 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ระดับฟลาสก์

ทำการทดลองโดยมีปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง ปริมาตรอาหาร พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดฟลาสก์ ตามตารางที่ 8 โดยมีสถานะในการผลิตดังนี้ อัตราการเขย่า 100 รอบ/นาที และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ทุกชั่วโมง ตลอดการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติก จากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลองตามวิธีการทากูชิ เพื่อสรุปผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมที่สุดของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จในระดับฟลาสก์ สามารถสรุปวิธีการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากูชิ แสดงดังภาพที่ 7

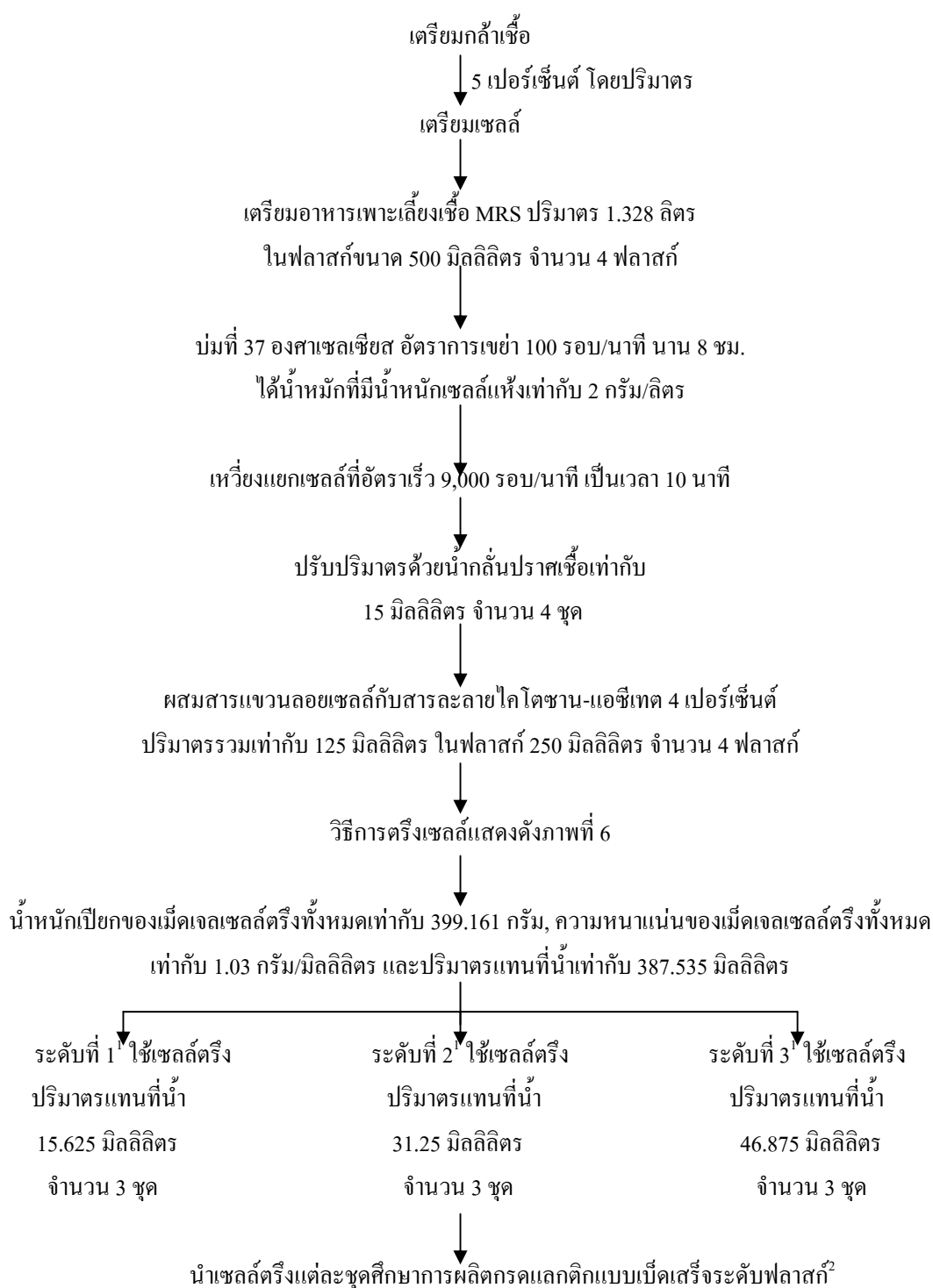
ตารางที่ 7 L-9 ($2^1 \times 3^3$) Orthogonal Array

ชุดการทดลอง	คอลัมน์			
	1	2	3	4
A	1	1	1	1
B	1	2	2	2
C	1	3	3	1
D	2	1	2	1
E	2	2	3	1
F	2	3	1	2
G	3	1	3	2
H	3	2	1	1
I	3	3	2	1

ที่มา: Ranjit (2001)

ตารางที่ 8 ปัจจัย และระดับต่าง ๆ ในการทดลองการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จระดับพลาสติก

ชุดการทดลอง	ปัจจัยการทดลอง			ขนาดของพลาสติก (มล.)
	ปริมาตรเมล็ดเชื้อเซลล์ตรึง (มล.)	ปริมาณอาหาร (มล.)	พีเอชเริ่มของต้นอาหาร	
A	15.625	93.750	5.7	500
B	15.625	187.500	6.0	1000
C	15.625	281.125	6.3	500
D	31.250	93.750	6.0	500
E	31.250	187.500	6.3	500
F	31.250	281.125	5.7	1000
G	46.825	93.750	6.3	1000
H	46.825	187.500	5.7	500
I	46.825	281.125	6.0	500



ภาพที่ 7 สรุปวิธีการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ
หมายเหตุ ¹ และ ² ระดับและสภาวะของการทดลองแสดงในตารางที่ 7 และ 8

2.1.6 การยืนยันการผลิตรวดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมระดับฟลาสก์

หลังจากการวิเคราะห์ข้อมูลการผลิตรวดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงระดับฟลาสก์ตามวิธีการทางจุลินทรีย์แล้วทำการทดลองยืนยันการผลิตรวดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่ได้จากข้อ 2.1.5 ที่ศึกษามาทั้งหมด และนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.5 โดยทำซ้ำ 2 ชุด เพื่อยืนยันผลการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว

3. การผลิตรวดแลกติกด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบด

3.1 การผลิตรวดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก

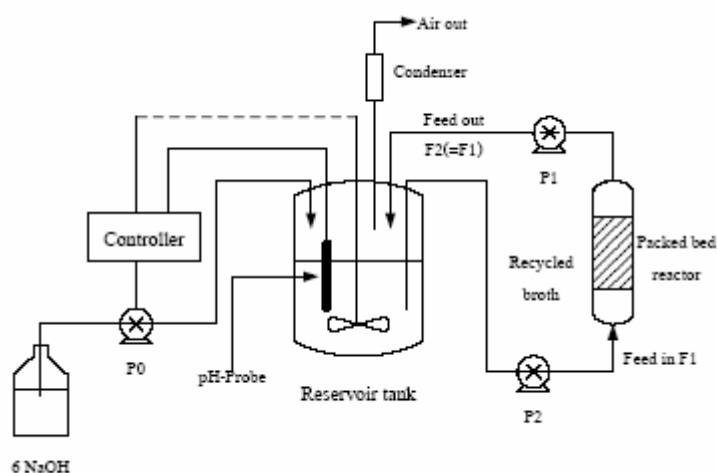
3.1.1 การแปรผันอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก

นำเซลล์ตรึงที่มีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2 ปริมาตร 125 250 และ 500 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ฉ: สรุปผลการเตรียมเซลล์ตรึงไคโตซาน ดังตารางผนวกที่ ฉ3 และ ฉ4 ตามลำดับ) ใส่ในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงไคโตซานปริมาตร 500 มิลลิลิตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและส่วนสูงเท่ากับ 6.6x27.5 เซนติเมตร แสดงดังภาพที่ 8 ต่อเข้ากับถังหมักแบบกวนขนาด 2.5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 1 ปริมาตร 0.75 ลิตร ซึ่งทำหน้าที่เป็นถังพักน้ำหมักที่มีการหมุนเวียนกลับน้ำหมัก โดยมีปริมาตรการทำงานเท่ากับ 0.875, 1 และ 1.25 ลิตร ตามลำดับ (รวมปริมาตรของเซลล์ตรึง) โดยมีการเติมโซเดียมไตรฟอสเฟต ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$) 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการเพิ่มความแข็งแรงให้เซลล์ตรึงในระหว่างอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งมีสภาวะในการผลิตดังนี้ ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัม/ลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบ/นาที และพีเอช 5.7 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัลควบคุมพีเอช เริ่มการผลิตโดยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจากถังพักจะถูกปั๊มด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F1 เข้าสู่ถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงทางด้านล่าง และถูกปั๊มออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงด้านบนกลับเข้าสู่ถังพักด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F2 ($F2 = F1$) กำหนดให้มีอัตราการไหลเข้า (F1) และออก (F2) จากคอลัมน์ เท่ากับ 1.08 ลิตร/ชั่วโมง ตลอดเวลา รูปแบบการผลิตรวดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบด แสดงดังภาพที่ 9 และ 10 ตามลำดับ เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลาต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล และกรดแลกติก ที่เวลาต่าง ๆ โดยจะ

ทำการผลิตจนกว่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสหมด และวิเคราะห์หาอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมักที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

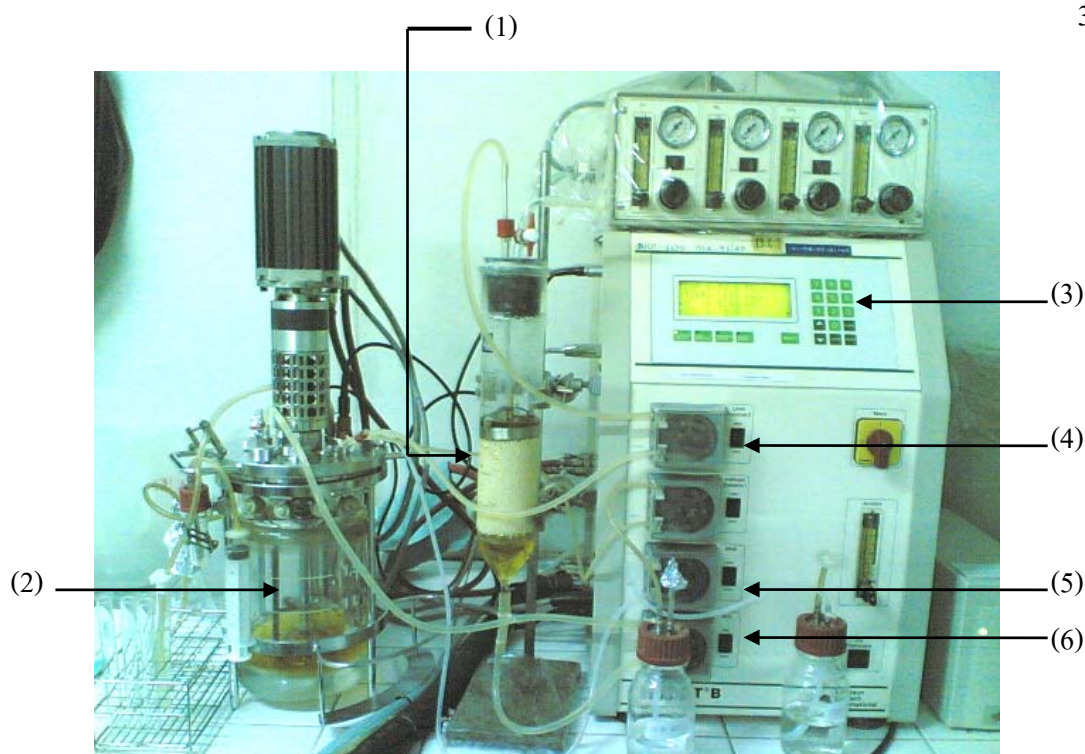


ภาพที่ 8 ถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และส่วนสูงเท่ากับ 6.6x27.5 เซนติเมตร



ภาพที่ 9 รูปแบบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์แพ็คเกจเซลล์ตรึง

หมายเหตุ F1 และ F2 อัตราการไหลเข้าและออกของน้ำหมักเวียนกลับของถังปฏิกรณ์แพ็คเกจเซลล์ตรึง P0, P1 และ P2 เครื่องสูบ (Perlistaltic pumps)



ภาพที่ 10 แสดงระบบควบคุมการผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ เซลล์ตรึงแบบแพ็กเบด

- (1) ถังปฏิกรณ์แบบแพ็กเบดบรรจุเม็ดเจลเซลล์ตรึง
- (2) ถังหมักแบบกวนที่ทำหน้าที่เป็นถังพักน้ำหมัก (Storage stirred tank) ควบคุมพีเอช และอุณหภูมิ
- (3) อุปกรณ์ควบคุมอัตโนมัติ
- (4) เครื่องสูบน้ำหมักออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงเวียนกลับสู่ถังพักน้ำหมัก ควบคุมอัตราการไหลออก (F2)
- (5) เครื่องสูบโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัล เพื่อควบคุมพีเอชในถังพักน้ำหมัก
- (6) เครื่องสูบน้ำหมักเข้าสู่ถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึง ควบคุมอัตราการไหลเข้า (F1)

3.1.2 การแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นน้ำตาลกลูโคส

ทำการทดลองโดยใช้อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมักที่ได้จากข้อ 3.1.1 และใช้สภาวะในการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 ยกเว้นความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองนี้เท่ากับ 25 และ 50 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเม็ดเจลเซลล์ตรึงที่ใช้มีความหนาแน่น และขนาดเท่ากับ 1.04 กรัม/มิลลิลิตร และ 0.322

มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาคผนวก ฉ: สรุปผลการเตรียมเซลล์ตรึงไคโตซาน ดังตารางผนวกที่ ๗5 และ ๗6 ตามลำดับ)

3.2 การผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวเวียนกลับน้ำหมัก

นำเซลล์ตรึง (ภาคผนวก ฉ: สรุปผลการเตรียมเซลล์ตรึงไคโตซาน ดังตารางผนวกที่ ๗7 และ ๗8 ตามลำดับ) ที่มีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2 โดยใช้อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมักที่ได้จากข้อ 3.1.1 โดยต่อถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงเข้ากับถังหมักแบบกวนขนาด 2.5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 1 ปริมาตร 0.75 ลิตร ซึ่งทำหน้าที่เป็นถังพักน้ำหมักที่มีการหมุนเวียนกลับน้ำหมัก ที่มีการเติมโซเดียมไตรฟอสเฟต ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการเพิ่มความแข็งแรงให้เซลล์ตรึงในระหว่างการเพาะเลี้ยง และทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะดังนี้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบ/นาที และพีเอช 5.7 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัลควบคุมพีเอช โดยมีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 25 กรัม/ลิตร เริ่มการผลิตโดยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจากถังพักจะถูกปั๊มด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F1 เข้าสู่ถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงทางด้านล่าง และถูกปั๊มออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงด้านบนกลับเข้าสู่ถังพักด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F2 ($F2 = F1$) กำหนดให้มีอัตราการไหลเข้า (F1) และออก (F2) จากคอลัมน์เท่ากับ 1.08 ลิตร/ชั่วโมง ตลอดเวลา โดยมีรูปแบบการผลิตเหมือนกับการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงเวียนกลับน้ำหมัก แสดงดังภาพที่ 9 และ 10 ตามลำดับ และเมื่อความเข้มข้นกลูโคสลดลงเหลือประมาณ 10 กรัม/ลิตร (ประมาณ 6-8 ชั่วโมง) จึงเติมน้ำตาลกลูโคสปริมาตร 25 มิลลิลิตร เพื่อรักษาอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมักให้คงที่ โดยให้ได้ความเข้มข้นกลูโคสสุดท้ายในถังหมักเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำหมัก เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล และกรดแลกติกที่เวลาต่าง ๆ โดยทำการผลิตจนกว่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสหมด หรือคงที่

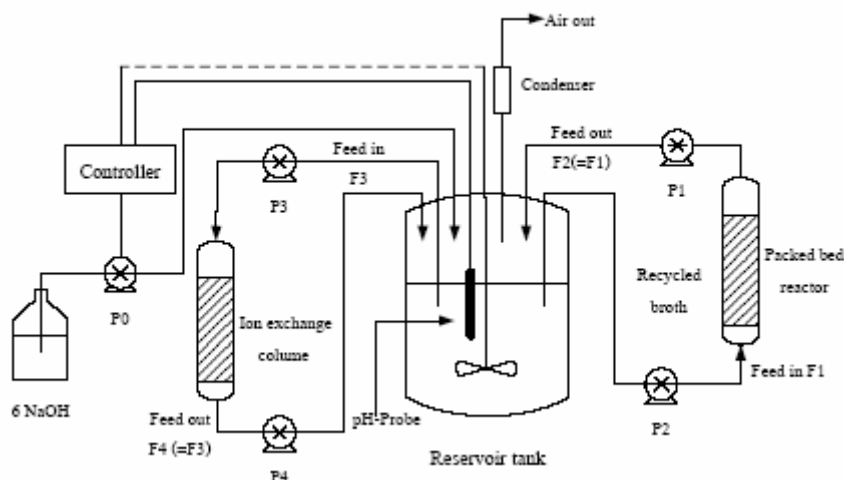
3.3 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงโดยระบบแยกกรดแลกติก

นำเซลล์ตรึง (ภาคผนวก ฉ: สรุปผลการเตรียมเซลล์ตรึงไคโตซาน ดังตารางผนวกที่ ๗9 และ ๗10 ตามลำดับ) ที่มีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2 โดยใช้อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมักที่ได้จากข้อ 3.1.1 โดยต่อถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงไคโตซาน และคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และส่วนสูงเท่ากับ 4.6x20 เซนติเมตร มีปริมาณเรซินเท่ากับ 232.75 กรัม (ภาคผนวก ช: ข้อมูลและรายละเอียดคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ) ดังแสดงใน

ภาพที่ 11 เข้ากับถังหมักแบบกวนขนาด 2.5 ลิตร ที่มีปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 1 ปริมาตร 0.75 ลิตร ซึ่งทำหน้าที่เป็นถังพักน้ำหมักที่มีการหมุนเวียนกลับน้ำหมัก ที่มีการเติมโซเดียม ไตรฟอสเฟต ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$) 3 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการเพิ่มความแข็งแรงให้ เซลล์ตรึงในระหว่างการเพาะเลี้ยง สภาพะในการผลิตดังนี้ ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 50 กรัม/ลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบ/นาที และพีเอช 5.7 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6 นอร์มัลควบคุมพีเอช เริ่มการผลิตโดยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจากถังพักจะถูกปั๊มด้วย อัตราการไหลเท่ากับ F1 เข้าสู่ถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงทางด้านล่าง และถูกปั๊มออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ ตรึงด้านบนกลับเข้าสู่ถังพักด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F2 ($F2 = F1$) กำหนดให้มีอัตราการไหลเข้า (F1) และออก (F2) จากคอลัมน์เท่ากับ 1.08 ลิตร/ชั่วโมง ตลอดเวลา และน้ำหมักจากถังพักจะถูกปั๊ม เข้าสู่คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุทางด้านบนด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F3 และถูกปั๊มออกจากคอลัมน์ แลกเปลี่ยนประจุด้านล่างกลับเข้าสู่ถังพักด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F4 ($F4 = F3$) กำหนดให้มีอัตรา การไหลเข้า (F3) และออก (F4) จากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุเท่ากับ 3.60 มิลลิลิตร/นาที) โดยมี รูปแบบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงโดยระบบแยกกรดแลกติกเวียนกลับน้ำหมัก แสดงดังภาพที่ 12 การเก็บตัวอย่างน้ำหมักทำการเก็บตัวอย่าง 2 ตำแหน่ง คือ บริเวณถังพักน้ำหมัก และส่วนที่ออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุด้านล่าง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล และกรดแลกติกที่ เวลาต่าง ๆ โดยจะทำการผลิตจนกว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสหมด



ภาพที่ 11 คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchange colum) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และส่วนสูง เท่ากับ 4.6 x 20 เซนติเมตร(ภาคผนวก ข: ข้อมูลและรายละเอียดคอลัมน์แลกเปลี่ยน ประจุ)



ภาพที่ 12 รูปแบบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์แพ็กเบด เซลล์ตรึงด้วยระบบแยกกรดแลกติก

หมายเหตุ F1, F2, F3 และ F4 คือ อัตราการไหลเข้าและออกของน้ำหมักเวียนกลับของถังปฏิกรณ์ แพ็กเบดเซลล์ตรึง และคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ ตามลำดับ P0, P1, P2, P3 และ P4 คือ เครื่องสูบ (Peristaltic pumps)

4. การวิเคราะห์

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสและกรดแลกติก

นำตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บในแต่ละเวลาของการผลิตมาเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปวิเคราะห์กลูโคส และกรดแลกติก โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (Miller, 1959) และวิธีของ Barker and Summerson (1941) ตามลำดับ แสดงในภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์

4.2 การชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ

ทำการชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มัล โดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 3.60 มิลลิลิตร/นาที เก็บตัวอย่างที่ถูกชะออกมาครั้งละ 20 มิลลิลิตร โดยมี ปริมาตรรวมเท่ากับ ปริมาตรของเรซิน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรรวม

เท่ากับ 3 เท่าของปริมาตรเรซิน และนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์

5. การประมาณค่าพารามิเตอร์และการเลียนแบบกระบวนการหมัก

การประมาณค่าพารามิเตอร์และการเลียนแบบกระบวนการหมักของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ครึ่งเพ็กเบด โดยวิธี Non-linear least square curve fit (Ordinary differential equation) ในโปรแกรม MATLABTM (ภาคผนวก จ: การประมาณค่าพารามิเตอร์ด้วยโปรแกรม MATLABTM) เปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดลองกับผลที่ได้จากการเลียนแบบกระบวนการหมัก เพื่อประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นมา

6. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

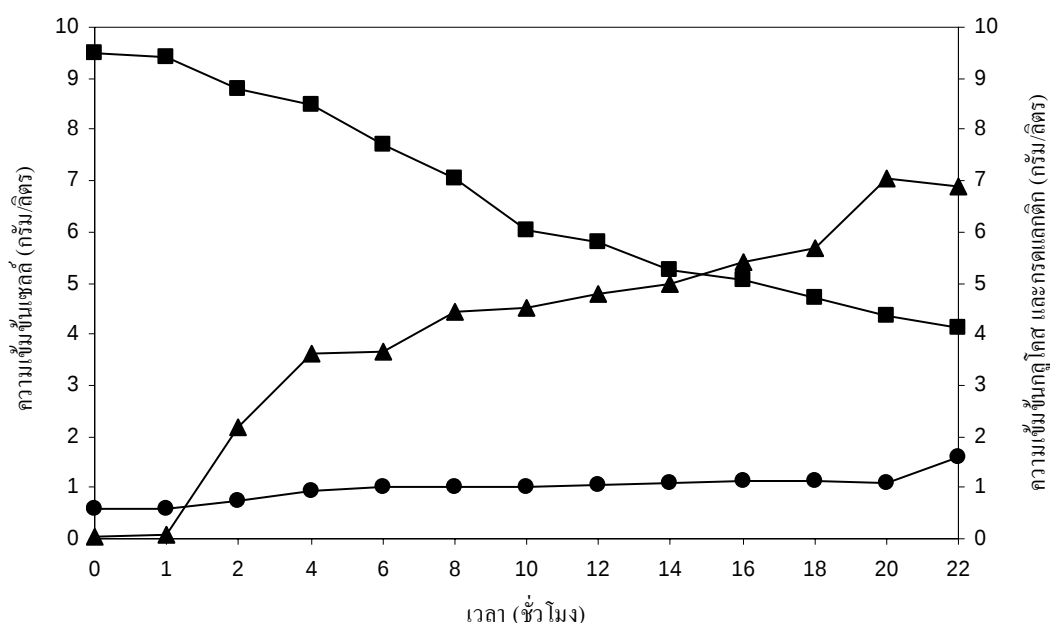
สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการวิจัย ระยะเวลาการวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนเมษายน 2548 ถึงเดือนเมษายน 2551

ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกระดับพลาสติก

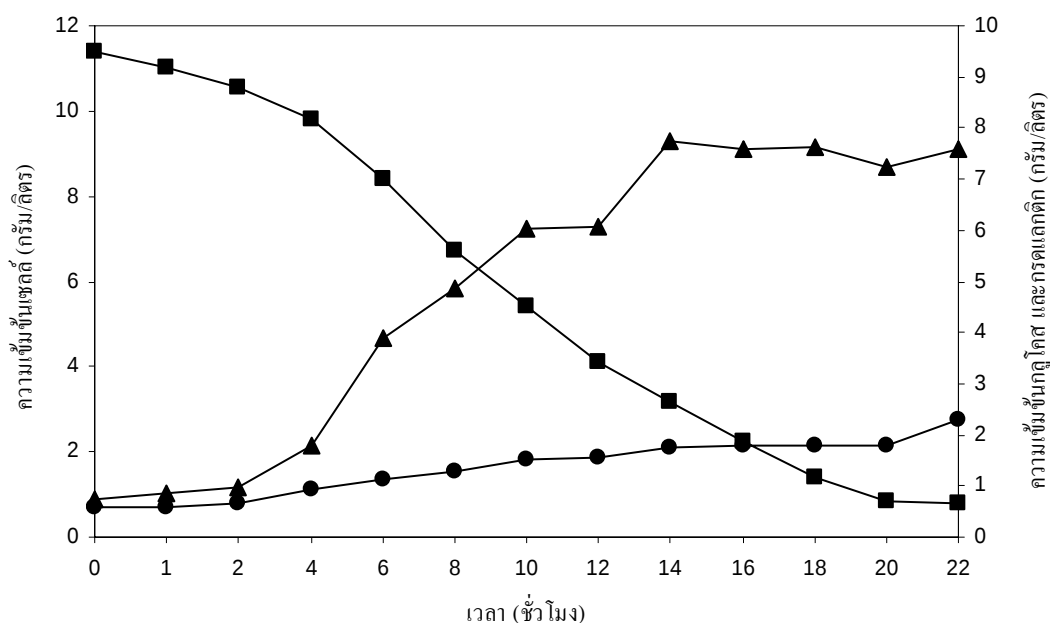
การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์อิสระ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ระดับพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรทำงาน 300 มิลลิลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร โดยมีสูตรอ้างอิง คือ อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่อธิบายไว้ในอุปกรณ์และวิธีการ: ตามตารางที่ 5 สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงครั้งนี้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบ/นาที และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.7 โดยใช้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ ร้อยละ 5 (ปริมาตร/ปริมาตร) สามารถสรุปผลการทดลองแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติก กับเวลาในการเพาะเลี้ยงของทั้ง 5 สูตร ดังภาพที่ 13 ถึง 17 และตารางที่ 9



ภาพที่ 13 การผลิตกรดแลกติกโดย *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.48 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ●, ■ และ ▲ ความเข้มข้นเซลล์, กลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

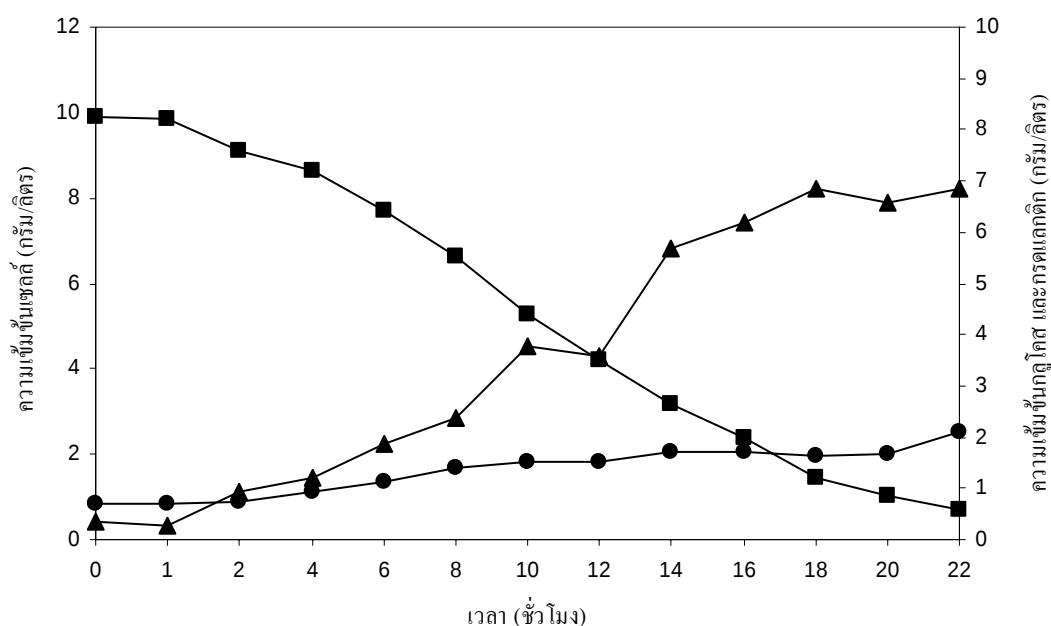
จากการผลิตกรดแลกติกด้วยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.48 กรัม/ลิตร ดังภาพที่ 13 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 เมื่อเริ่มการ

เพาะเลี้ยงภายใน 1 ชั่วโมงแรกเซลล์อยู่ในช่วงระยะของการปรับตัว โดยมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์และกรดแลกติกเพียงเล็กน้อย ในขณะที่เดียวกันมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงเล็กน้อย เมื่อเข้าสู่การเพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 2 เซลล์และกรดแลกติกเริ่มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว น้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่เซลล์เริ่มเข้าสู่สภาวะคงตัวที่ชั่วโมงที่ 10 เมื่อยุติการเพาะเลี้ยงที่เวลา 22 ชั่วโมง พบว่า มีความเข้มข้นเซลล์ กลูโคส และกรดแลกติกเท่ากับ 1.58, 4.11 และ 6.89 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1)



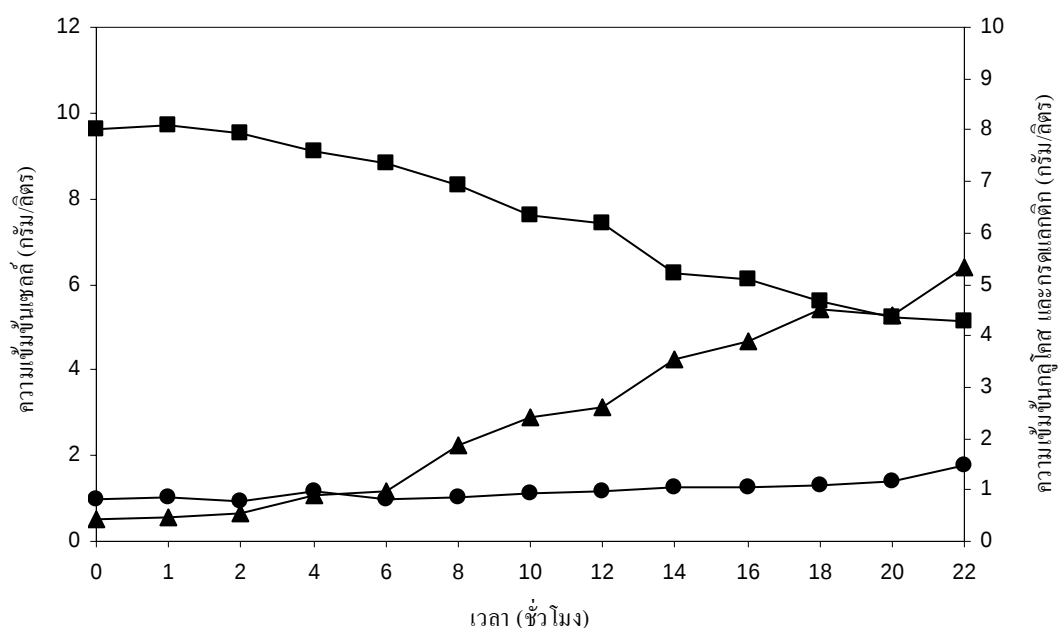
ภาพที่ 14 การผลิตกรดแลกติกโดย *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 11.38 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ●, ■ และ ▲ ความเข้มข้นเซลล์, กลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

ภาพที่ 14 แสดงการผลิตกรดแลกติกด้วยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 11.38 กรัม/ลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 เมื่อเริ่มการเพาะเลี้ยงพบว่า ใน 2 ชั่วโมงแรกเซลล์อยู่ในช่วงระยะของการปรับตัว โดยมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์และกรดแลกติกเพียงเล็กน้อย ในขณะที่เดียวกันมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงเล็กน้อย เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 4 เซลล์และกรดแลกติกเริ่มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่เซลล์เริ่มเข้าสู่สภาวะคงตัวที่ชั่วโมงที่ 14 จนกระทั่งสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในเวลา 22 ชั่วโมง พบว่า มีความเข้มข้นเซลล์ กลูโคส และกรดแลกติกเท่ากับ 2.76, 0.81 และ 7.57 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1)



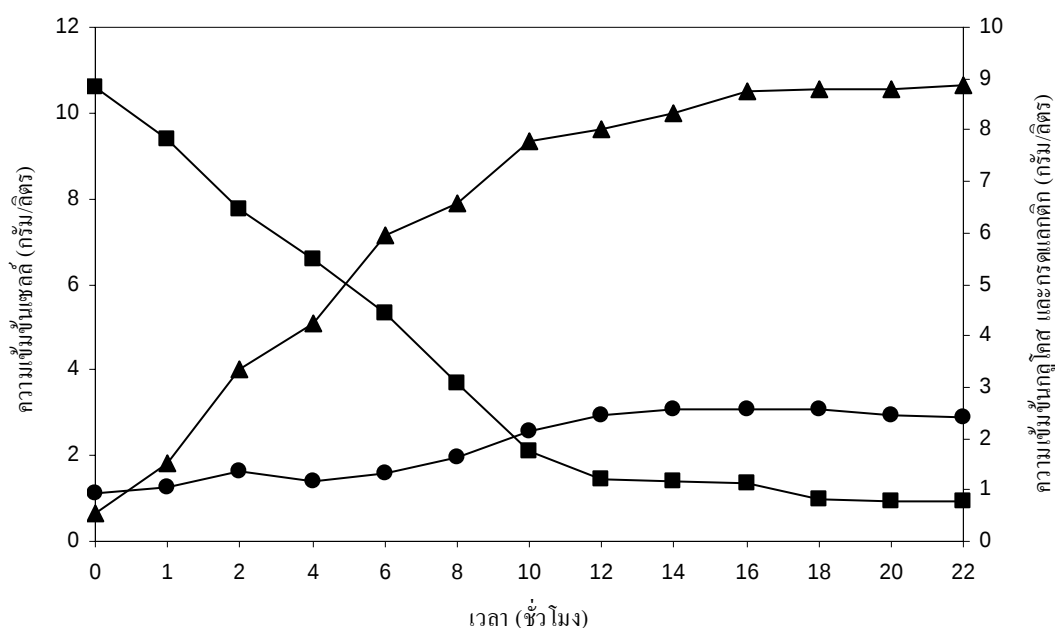
ภาพที่ 15 การผลิตกรดแลกติกโดย *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.90 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ●, ■ และ ▲ ความเข้มข้นเซลล์, กลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

ในการผลิตกรดแลกติกด้วยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.90 กรัม/ลิตร ดังแสดงในภาพที่ 15 ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ 3 เมื่อเริ่มการเพาะเลี้ยง พบว่าใน 2 ชั่วโมงแรก เซลล์อยู่ในช่วงระยะของการปรับตัว โดยมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์และกรดแลกติกเพียงเล็กน้อย ในขณะที่เดียวกันมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงเล็กน้อย เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 4 ความเข้มข้นเซลล์และกรดแลกติกเริ่มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่เซลล์เข้าสู่สภาวะคงตัวที่ชั่วโมงที่ 14 เมื่อยุติการเพาะเลี้ยงที่เวลา 22 ชั่วโมง พบว่ามีความเข้มข้นเซลล์ กลูโคส และกรดแลกติกเท่ากับ 2.54, 0.71 และ 6.86 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1)



ภาพที่ 16 การผลิตกรดแลกติกโดย *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.64 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ●, ■ และ ▲ ความเข้มข้นเซลล์, กลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

ภาพที่ 16 แสดงการผลิตกรดแลกติกด้วยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 โดยมีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.64 กรัม/ลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 เมื่อเริ่มการเพาะเลี้ยง พบว่าใน 2 ชั่วโมงแรกเซลล์อยู่ในช่วงระยะของการปรับตัว โดยมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์และกรดแลกติกเพียงเล็กน้อย ในขณะเดียวกันมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงเล็กน้อย เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 4 ความเข้มข้นเซลล์และกรดแลกติกเริ่มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่เซลล์เข้าสู่สภาวะคงตัวที่ชั่วโมงที่ 14 เมื่อยุติการเพาะเลี้ยงที่เวลา 22 ชั่วโมง พบว่ามีความเข้มข้นเซลล์ กลูโคส และกรดแลกติกเท่ากับ 1.76, 5.12 และ 5.31 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1)



ภาพที่ 17 การผลิตกรดแลกติกโดย *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 5 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 10.59 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ●, ■ และ ▲ ความเข้มข้นเซลล์, กลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

การผลิตแลกติกด้วยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 10.59 กรัม/ลิตร ดังแสดงในภาพที่ 17 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 5 เมื่อเริ่มการเพาะเลี้ยงใน 1 ชั่วโมงแรกเซลล์อยู่ในช่วงระยะของการปรับตัว โดยมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์และกรดแลกติกเพียงเล็กน้อย ในขณะที่เดียวกันมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงเล็กน้อย เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 2 ความเข้มข้นเซลล์และกรดแลกติกเริ่มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่เซลล์เข้าสู่สภาวะคงตัวที่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อยุติการเพาะเลี้ยงที่เวลา 22 ชั่วโมง พบว่า มีความเข้มข้นเซลล์ กลูโคส และกรดแลกติกเท่ากับ 2.91, 0.94 และ 8.86 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1)

จากผลการทดลองการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์อิสระ *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร จำนวนจนผลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติก สรุปได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สรุปผลการเปรียบเทียบผลการผลิตกรดแลกติกด้วย *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ระดับพลาสติกในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร

พารามิเตอร์	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5 (สูตรอ้างอิง)
μ^1 (h ⁻¹)	0.075	0.116	0.106	0.031	0.099
$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	0.18	0.18	0.30	0.11	0.30
$Y_{P/S}^2$ (g g ⁻¹)	1.06	0.85	0.75	0.99	0.84
q_s (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.30	0.42	0.25	0.15	0.22
q_p (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.41	0.36	0.17	0.16	0.19
Q_p^3 (g l ⁻¹ h ⁻¹)	0.35	0.50	0.30	0.22	0.38
C_p^4 (g l ⁻¹)	6.99	7.00	6.49	4.88	8.86
glucose utilization (%)	56.65	92.88	92.83	46.89	91.12
Production time (h)	20	14	22	22	22

หมายเหตุ ¹ การคำนวณโดยใช้ช่วงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงดังนี้ สูตร 1: 2-6 ชั่วโมง, สูตร 2: 2-10 ชั่วโมง, สูตร 3: 2-8 ชั่วโมง, สูตร 4: 6-14 ชั่วโมง และสูตร 5 อ้างอิง: 4-12 ชั่วโมง

² และ ³ การคำนวณโดยใช้ช่วงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงดังนี้ สูตร 1: 0-20 ชั่วโมง, สูตร 2: 0-14 ชั่วโมง, สูตร 3: 0-22 ชั่วโมง, สูตร 4: 0-22 ชั่วโมง และสูตร 5 อ้างอิง: 0-22 ชั่วโมง

⁴ การคำนวณโดยใช้ช่วงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงดังนี้ สูตร 1: 20 ชั่วโมง, สูตร 2: 14 ชั่วโมง, สูตร 3: 22 ชั่วโมง, สูตร 4: 22 ชั่วโมง และสูตร 5 อ้างอิง: 22 ชั่วโมง

ดูคำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่หน้า (11)

เมื่อพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ของการผลิตกรดแลกติกด้วย *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่า จากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตร 5 ที่เป็นสูตรอ้างอิง (MRS) มีความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 8.86 กรัม/ลิตร อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 มีผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) สูงสุดเท่ากับ 1.06 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) และการใช้น้ำตาลกลูโคส

(glucose utilization) เท่ากับ $0.116 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ $0.53 \text{ กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง}$ และ $92.88 \text{ เปอร์เซ็นต์}$ ตามลำดับ และมีระยะเวลาในการผลิตที่ให้กรดแลกติกสูงสุดสั้นที่สุดเท่ากับ 14 ชั่วโมง เนื่องจากวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือ เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดย *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 แสดงว่า สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจึงควรเป็นสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 แล้วสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณมาก และใช้น้ำตาลกลูโคสหมดได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งพารามิเตอร์ที่สำคัญต่อการพิจารณาในการศึกษาครั้งนี้ คือ ความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) และการใช้น้ำตาล (glucose utilization) ดังนั้นสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ สูตรที่ 2 เนื่องจากมีอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) และการใช้น้ำตาล (glucose utilization) สูงสุด ส่วนความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) มีค่าต่ำกว่าในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 5 เพียงเล็กน้อย และเมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ก็มีค่าสูงที่สุด และมีผลได้ของกรดแลกติก และอัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_s) สูงที่สุด เนื่องจากมีการใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดีที่สุด และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ให้กรดแลกติก (14 ชั่วโมง) สูงสุดสั้นกว่าอาหารเพาะเลี้ยงอีก 4 สูตร เมื่อพิจารณาถึงอัตราจำเพาะการเกิดกรดแลกติก (q_p) ของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 มีค่าสูงกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรอื่น ๆ ยกเว้นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 เนื่องจากมีปริมาณเซลล์มากกว่าโดยดูจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงกว่านั่นเอง

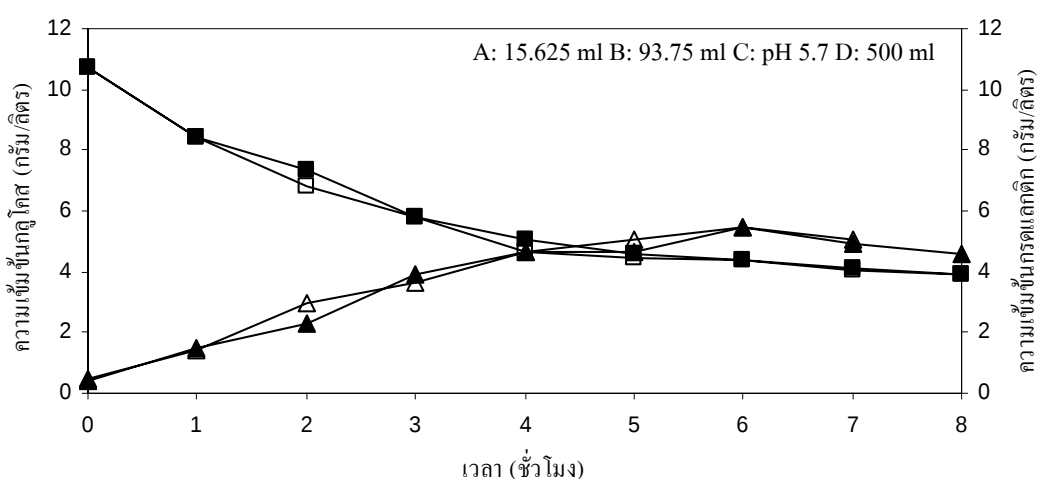
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบส่วนประกอบของอาหารระหว่างอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 สูตรที่ 2 และ 5 ซึ่งเป็นสูตรอ้างอิง ตามที่ได้อธิบายไว้ในอุปกรณ์ และวิธีการ: ตารางที่ 5 พบว่า อาหารสูตรที่ 2 ไม่มีการเติมบีฟัสกัต และเปปโตน จึงเป็นการลดต้นทุนในการผลิตกรดแลกติกได้ ในทางกลับกันมีการเพิ่มปริมาณของยีสต์สกัดจาก 5 กรัม/ลิตร (สูตรที่ 5) เป็น 15 กรัม/ลิตร (สูตรที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nagarjun *et al.* (2005) ที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในสับสเตรตที่เป็นของแข็งโดย *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 ที่อาศัยวิธี Taguchi ในการออกแบบการทดลอง พบว่า เปอร์เซ็นต์ของยีสต์สกัดมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อเปอร์เซ็นต์การผลิตกรดแลกติกมากที่สุด และผลการทดลองของดิยะภรณ์ และคณะ (2549) ที่ได้ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ *Lactococcus lactis* IO-1 โดยวิธีการทาคุชิเช่นกัน พบว่า ปริมาณของยีสต์สกัดมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ

2. การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงระดับพลาสติก

เตรียมเซลล์ตรึงไคโตซานดังวิธีการที่แสดงในภาพที่ 6 และภาคผนวก จ: สรุปการเตรียมเซลล์ตรึงไคโตซาน ได้น้ำหนักเปียกของเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 399.161 กรัม ปริมาตรแทนที่น้ำเท่ากับ 387.353 มิลลิลิตร และความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 1.03 กรัม/มิลลิลิตร (วิธีการคำนวณในภาคผนวก ค: วิธีการวิเคราะห์) และขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึงเฉลี่ยเท่ากับ 0.329 มิลลิเมตร และนำเม็ดเจลเซลล์ตรึงใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกต่อไป สรุปดังภาพที่ 7

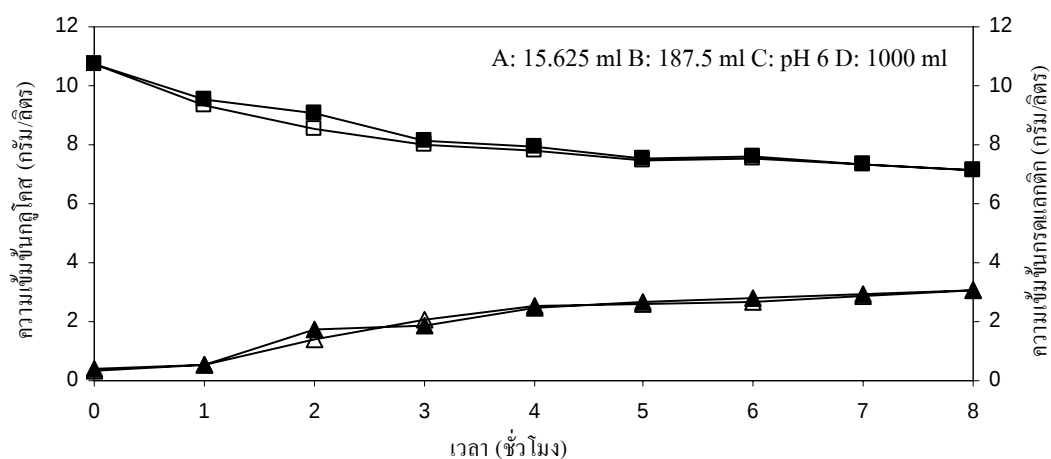
2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงโดยวิธีการทางจุลินทรีย์

การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ระดับพลาสติก อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบ/นาที ซึ่งอาศัยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทางจุลินทรีย์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ประกอบด้วย ปัจจัยการทดลองทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาตรเม็ดเจลเซลล์ตรึง (A) ปริมาตรอาหาร (B) พีเอชเริ่มต้นของอาหาร (C) และขนาดพลาสติก (D) ได้ทำการทดลองแบบ $L_9 (2^4 \times 3^1)$ มีทั้งหมด 9 การทดลอง (แสดงในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 7 และ 8) และทำการทดลอง 2 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 18 ถึง 26 และตารางที่ 10 (ข้อมูลการทดลองทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก2 และ ก3)

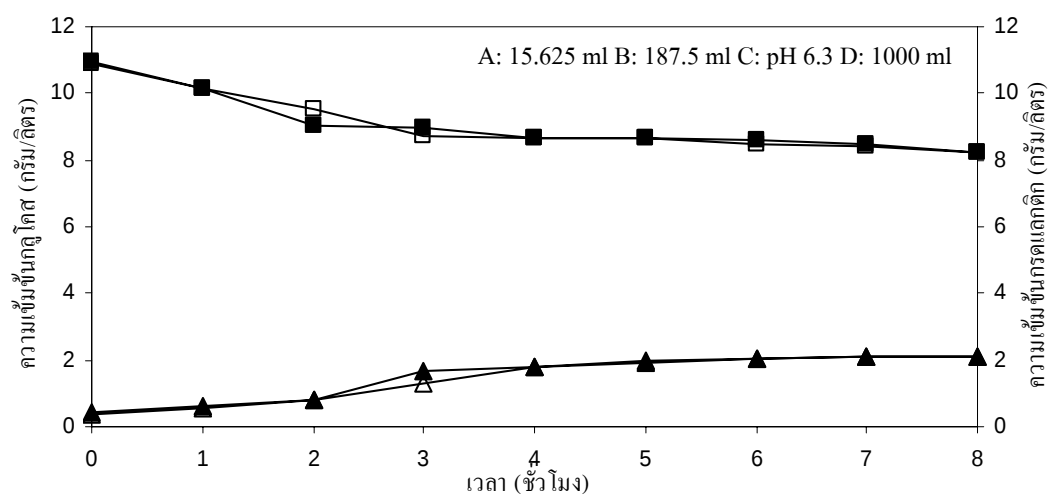


ภาพที่ 18 การผลิตกรดแลกติกระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง A (2 ชั่วโมง) (สัญลักษณ์

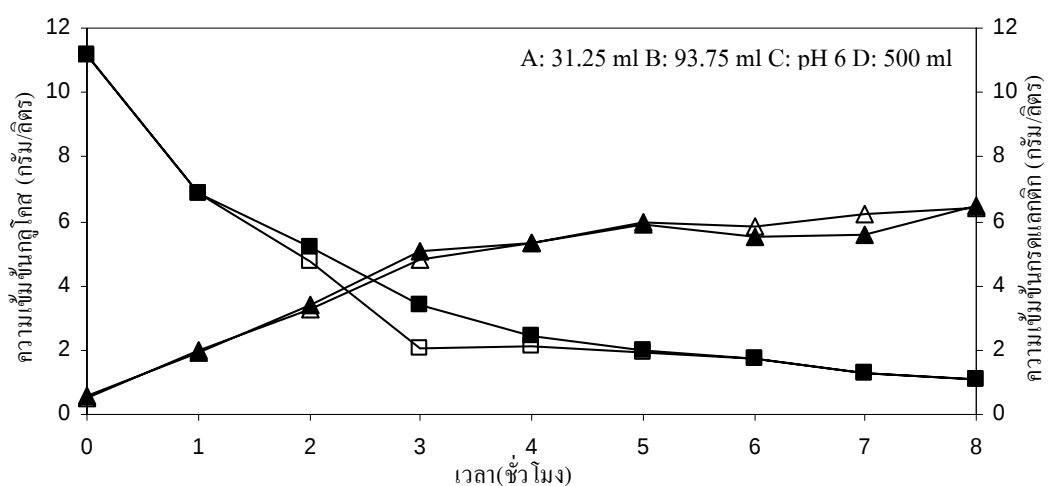
■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 1 และ □ และ Δ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 2 ตามลำดับ)



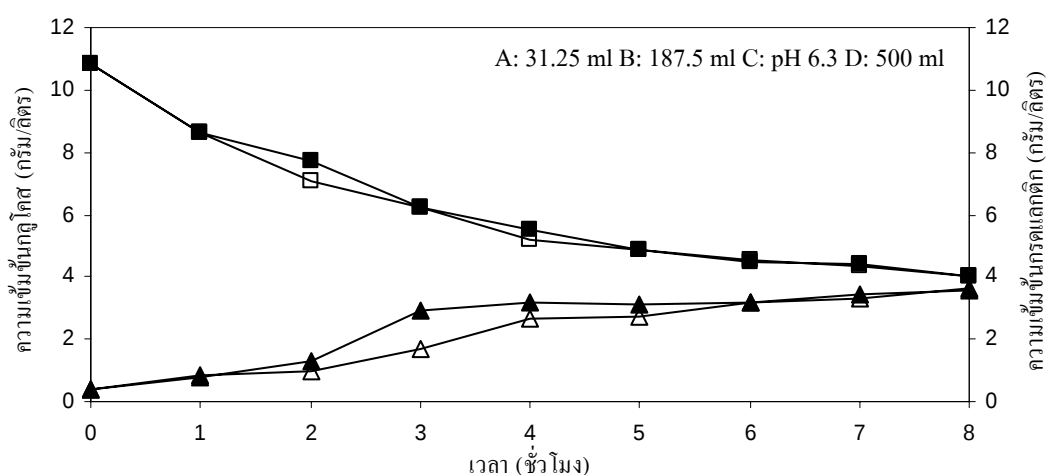
ภาพที่ 19 การผลิตกรดแลกติกระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง B (2 ชั่วโมง) (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และการลดกลูโคส ครั้งที่ 1 และ □ และ △ ความเข้มข้นกลูโคส และการลดกลูโคส ครั้งที่ 2 ตามลำดับ)



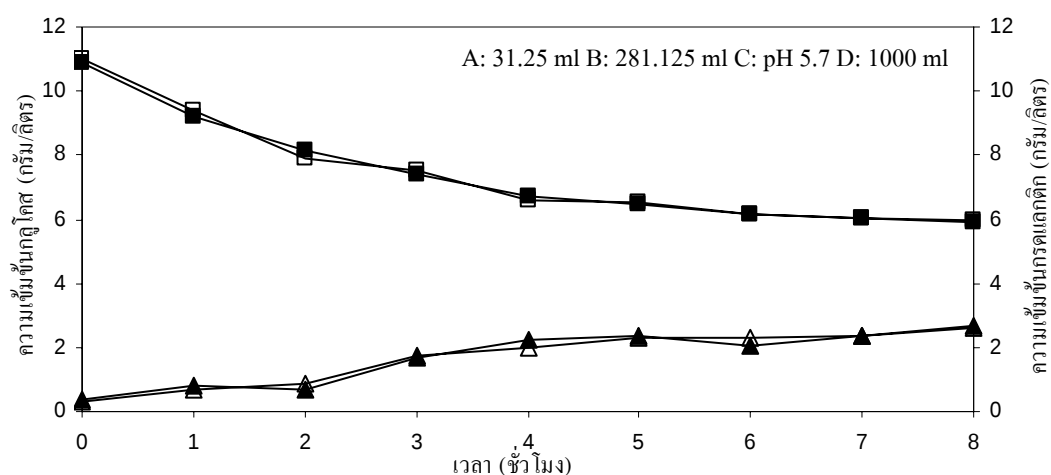
ภาพที่ 20 การผลิตกรดแลกติกระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง C (2 ชั่วโมง) (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และการลดกลูโคส ครั้งที่ 1 และ □ และ △ ความเข้มข้นกลูโคส และการลดกลูโคส ครั้งที่ 2 ตามลำดับ)



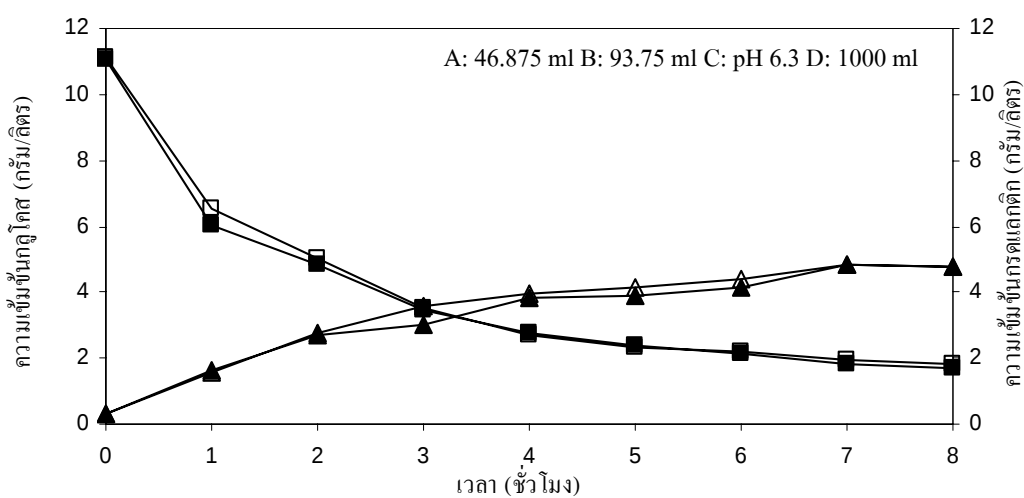
ภาพที่ 21 การผลิตกรดแลกติกระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง D (2 ชั่วโมง) (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 1 และ □ และ △ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 2 ตามลำดับ)



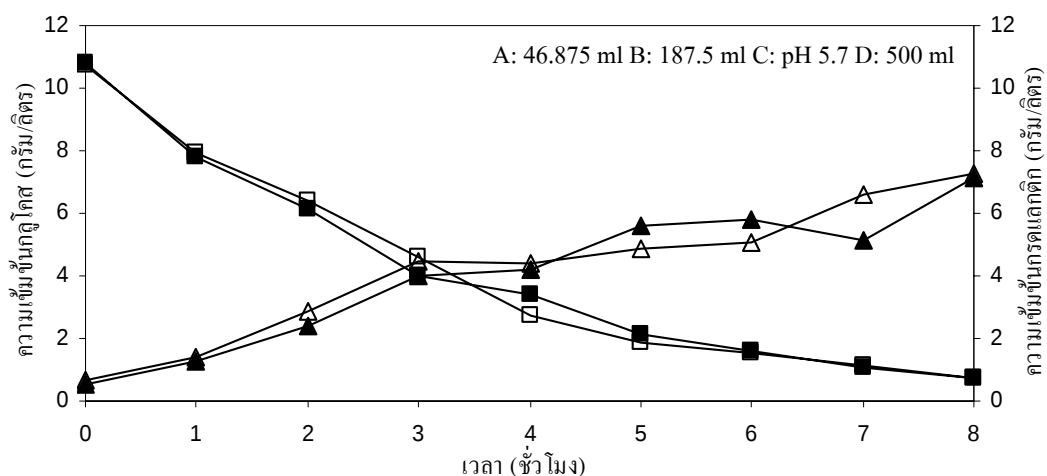
ภาพที่ 22 การผลิตกรดแลกติกระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง E (2 ชั่วโมง) (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 1 และ □ และ △ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 2 ตามลำดับ)



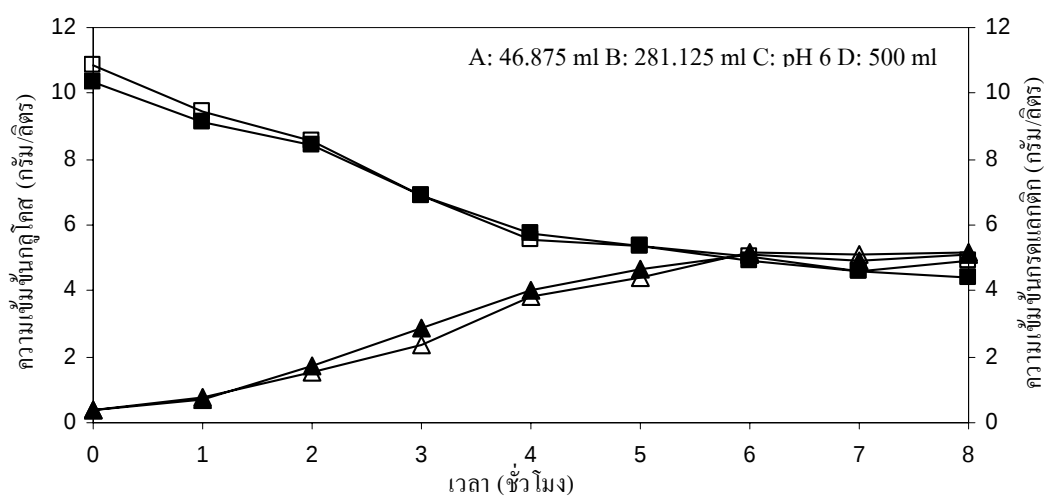
ภาพที่ 23 การผลิตกรดแลกติกระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง F (2 ซ้ำ) (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 1 และ □ และ △ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 2 ตามลำดับ)



ภาพที่ 24 การผลิตกรดแลกติกระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง G (2 ซ้ำ) (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 1 และ □ และ △ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 2 ตามลำดับ)



ภาพที่ 25 การผลิตกรดแลกติกระดับฟลask ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง H (2 ชั่วโมง) (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 1 และ □ และ Δ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 2 ตามลำดับ)



ภาพที่ 26 การผลิตกรดแลกติกระดับฟลask ภายใต้สภาวะของชุดการทดลอง I (2 ชั่วโมง) (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 1 และ □ และ Δ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ครั้งที่ 2 ตามลำดับ)

เมื่อนำผลการทดลองภายใต้สภาวะการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง คำนวณความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) ได้ผลสรุปดังตารางที่ 10 เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางชุดต่อไป

ตารางที่ 10 ผลการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863
ระดับพลาสติกภายใต้สภาวะการทดลองที่แปรผัน 4 ปัจจัย (9 ชุดการทดลอง)

ชุดการ ทดลอง	Lactic acid (C _p) (g l ⁻¹)		Y _{p/s} (g g ⁻¹)		Q _p (g l ⁻¹ h ⁻¹)	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
A	5.464	5.453	0.796	0.791	0.843	0.834
B	3.072	3.054	0.740	0.762	0.331	0.342
C	2.125	2.107	0.678	0.691	0.243	0.244
D	6.457	6.405	0.583	0.582	0.734	0.733
E	3.581	3.610	0.473	0.473	0.401	0.402
F	2.690	2.634	0.464	0.465	0.289	0.290
G	4.848	4.834	0.488	0.489	0.643	0.643
H	7.154	7.299	0.664	0.664	0.830	0.830
I	5.126	5.140	0.797	0.798	0.593	0.594

สรุปผลการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ระดับพลาสติกภายใต้สภาวะการทดลองที่แปรผัน 4 ปัจจัย (9 ชุดการทดลอง) แสดงดังตารางที่ 10 พบว่า ชุดการทดลอง H มีความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 7.15-7.30 กรัม/ลิตร ชุดการทดลอง I มีผลได้ของกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 0.80 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส และชุดการทดลอง A มีอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 0.84 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง โดยทั้ง 3 ชุดการทดลองมีระดับของแต่ละปัจจัยในการทดลองคือ ปริมาตรเมล็ดเซลล์ตรึง, ปริมาตรอาหาร, พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดพลาสติก ชุดการทดลอง H เท่ากับ 46.875 มิลลิลิตร, 187.5 มิลลิลิตร, 5.7 และ 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ ชุดการทดลอง I เท่ากับ 46.875 มิลลิลิตร, 281.125 มิลลิลิตร, 6 และ 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ และชุดการทดลอง A เท่ากับ 15.625 มิลลิลิตร, 93.75 มิลลิลิตร, 5.7 และ 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ

2.2 การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยหลักการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ทั้ง 9 ชุดการทดลอง จะอาศัยความเข้มข้นกรดแลกติก ผลได้ของกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร เป็นพารามิเตอร์หลัก ซึ่งการวิเคราะห์แบ่งเป็น 3 หัวข้อหลักดังนี้

1. การหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติก
2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก
3. การประมาณค่าความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) ที่ได้จากการผลิตกรดแลกติกด้วยสภาวะที่เหมาะสม

2.2.1 การหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติก

การหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยการทดลองที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก สามารถหาได้จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร โดยจะแสดงถึงร้อยละอิทธิพลของปัจจัยการทดลอง (Percent contribution) ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ซึ่งเป็นค่าที่สามารถบอกได้ว่าปัจจัยที่ใช้ในการทดลองใดมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกบ้าง และมีอิทธิพลมากหรือน้อย นอกจากนี้การวิเคราะห์ความแปรปรวนยังสามารถบอกได้ถึงระดับความเชื่อมั่นของปัจจัยการทดลองที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก ได้ผลการวิเคราะห์สรุปดังตารางที่ 11, 12 และ 13

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p)

Factors	DOF ¹	Sum of Sqrs. ¹	Variance ¹	F-Ratio ¹	Percent contribution	Confidence ¹ (%)	Significant
A	2	15.03	7.515	88.051	30.264	100.000	*****
B	2	15.643	7.821	91.64	31.512	100.000	*****
C	2	8.912	4.456	52.211	17.804	99.999	*****
D	1	8.66	8.66	101.465	17.463	100.000	*****
Error	10	0.853	0.085		2.957		
Total	17	49.1			100		

หมายเหตุ คำอธิบายปัจจัย

A, B, C, และ D หมายถึง ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง, ปริมาตรอาหาร, พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดพลาสติก ตามลำดับ

คำอธิบายนัยสำคัญ

*****, ***, **, * หมายถึง $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.025$, $p < 0.05$ และ $p < 0.1$ ตามลำดับ

¹ ดูการคำนวณได้จากภาคผนวก ข

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/S}$)

Factors	DOF ¹	Sum of Sqs. ¹	Variance ¹	F-Ratio ¹	Percent contribution	Confidence ¹ (%)	Significant
A	2	0.17	0.085	136.334	57.061	100.000	*****
B	2	0.002	0.001	1.905	0.381	80.092	-
C	2	0.078	0.039	63.246	26.245	100.000	*****
D	1	0.038	0.038	61.372	12.727	99.999	*****
Error	10	0.005	0		3.586		
Total	17	0.295			100		

หมายเหตุ คำอธิบายปัจจัย

A, B, C, และ D หมายถึง ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง, ปริมาตรอาหาร, พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดฟลasks ตามลำดับ

คำอธิบายนัยสำคัญ

*****, ***, **, * หมายถึง $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.025$, $p < 0.05$ และ $p < 0.1$ ตามลำดับ

¹ ดูการคำนวณได้จากภาคผนวก ข

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p)

Factors	DOF ¹	Sum of Sqr. ¹	Variance ¹	F-Ratio ¹	Percent contribution	Confidence ¹ (%)	Significant
A	2	0.183	0.091	2399.561	20.961	100.000	*****
B	2	0.403	0.201	5268.139	46.031	100.000	*****
C	2	0.152	0.076	1990.338	17.385	100.000	*****
D	1	0.136	0.136	3558.858	15.546	100.000	*****
Error	10	-0.001	-0.001		0.077		
Total	17	0.875			100		

หมายเหตุ คำอธิบายปัจจัย

A, B, C, และ D หมายถึง ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง, ปริมาตรอาหาร, พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดฟลask ตามลำดับ

คำอธิบายนัยสำคัญ

*****, ***, **, * หมายถึง $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.025$, $p < 0.05$ และ $p < 0.1$ ตามลำดับ

¹ ดูการคำนวณได้จากภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยอาศัยความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) จากตารางที่ 11 พบว่า ร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) ของปริมาณอาหารมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 31.51 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ปริมาตรเม็ดเจลเซลล์ครึ่งเท่ากับ 30.26 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพีเอชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดพลาสติก เป็นปัจจัยที่มีค่าร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) น้อยที่สุดเท่ากับ 17.80 และ 17.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากระดับความเชื่อมั่นจะเห็นว่าปัจจัยที่ทำการทดลองทั้ง 4 ปัจจัยมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ โดยเรียงลำดับปัจจัยของการทดลองที่มีอิทธิพลมากไปหาน้อยได้ดังนี้ ปริมาณอาหาร, ปริมาตรเม็ดเจลเซลล์ครึ่ง, พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดพลาสติก ตามลำดับ

ส่วนผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยอาศัยผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) จากตารางที่ 12 พบว่า ร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) ของปริมาตรเม็ดเจลเซลล์ครึ่งมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 57.06 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 26.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนขนาดพลาสติก และปริมาณอาหาร เป็นปัจจัยที่มีร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) น้อยที่สุดเท่ากับ 12.73 และ 0.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาถึงระดับความเชื่อมั่น (Confidence level) โดยค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปริมาตรเม็ดเจลเซลล์ครึ่ง พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดพลาสติกเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ โดยปริมาตรเม็ดเจลเซลล์ครึ่ง และพีเอชเริ่มต้นของอาหารมีอิทธิพลมากกว่าขนาดพลาสติก ส่วนปริมาณอาหารมีเปอร์เซ็นต์ความเชื่อมั่นน้อยมากจนเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p > 0.01$ โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลมากที่สุดต่อผลได้ของกรดแลกติกคือ ปริมาตรเม็ดเจลเซลล์ครึ่ง และที่ปริมาณอาหารมีอิทธิพลน้อยที่สุด เนื่องจากถ้าในการผลิตปริมาตรเม็ดเจลเซลล์ครึ่งน้อยถึงจะใช้ปริมาณอาหารมาก ก็ทำให้การผลิตกรดแลกติกไม่ดี เนื่องจากเซลล์มีปริมาณน้อย ดังนั้นปริมาณอาหารจึงเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกอย่างไม่มีนัยสำคัญ

และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) ในตารางที่ 13 จะเห็นว่าร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) ของแต่ละปัจจัยเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ ปริมาณอาหาร (46.03 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตรเม็ดเจลเซลล์ครึ่ง (20.96 เปอร์เซ็นต์) พีเอชเริ่มต้นของอาหาร (17.39 เปอร์เซ็นต์) และขนาดพลาสติก (15.55 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาในระดับความเชื่อมั่นจะเห็นว่าปัจจัยจากการทดลองทั้ง 4 ปัจจัยมีระดับความเชื่อมั่น (Confidence level) เท่ากัน และมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$

แม้ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นกรดแลกติก ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรไม่เหมือนกัน แต่เมื่อพิจารณาจากระดับความเชื่อมั่นพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทดลองมากที่สุดของทั้ง 3 ผลการทดลอง คือ ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง รองลงมาคือ พีเอช เริ่มต้นของอาหาร ขนาดพลาสติก และปริมาตรอาหาร ตามลำดับ

2.2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก

นำความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) ของทั้ง 9 ชุดการทดลอง การทดลองละ 2 ชั่วโมง หาอัตราส่วน Signal-to-Noise (อัตราส่วน S/N) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทดลอง โดยหลักการของวิธีการทางสถิติแบ่งประเภทของการทดลองออกเป็น 3 ประเภท คือ The Smaller is better (S), The Nominal is the best (N) และ The Bigger is better (B) ซึ่งการทดลองนี้จัดอยู่ในประเภท The Bigger is better เนื่องจากต้องการผลิตกรดแลกติกให้ได้สูงที่สุด ซึ่งสูตรการคำนวณหาค่า Mean-Squared Deviation (MSD) และอัตราส่วน S/N แสดงในภาคผนวก ข และสรุปผลได้ดังตารางที่ 14 และนำอัตราส่วน S/N มาคำนวณร้อยละอิทธิพลหลักของปัจจัยของการทดลองในแต่ละระดับการทดลอง ซึ่งสามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 14 สรุปค่าอัตราส่วน S/N จำนวนโดยอาศัยความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/S}$) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) จากผลการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้นกรดแลกติก		MSD	อัตราส่วน S/N (เดซิเบล)	ผลได้ของกรดแลกติก		MSD	อัตราส่วน S/N (เดซิเบล)	อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร		MSD	อัตราส่วน S/N (เดซิเบล)
	(C _p , กรัม/ลิตร)				(Y _{p/S} , กรัม/กรัม)				(Q _p , กรัม/ลิตร ชั่วโมง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2		
A	5.464	5.453	0.034	14.741	0.796	0.791	1.589	-2.010	0.843	0.834	1.407	-1.484
B	3.072	3.054	0.107	9.722	0.740	0.762	1.774	-2.490	0.331	0.342	8.839	-9.464
C	2.125	2.107	0.223	6.510	0.678	0.691	2.133	-3.290	0.243	0.244	16.869	-12.271
D	6.457	6.405	0.024	16.165	0.583	0.582	2.944	-4.690	0.734	0.733	1.859	-2.693
E	3.581	3.610	0.077	11.114	0.473	0.473	4.470	-6.503	0.401	0.402	6.204	-7.927
F	2.690	2.634	0.141	8.502	0.464	0.465	4.636	-6.661	0.289	0.290	11.934	-10.768
G	4.848	4.834	0.043	13.698	0.488	0.489	4.191	-6.223	0.643	0.643	2.419	-3.836
H	7.154	7.299	0.019	17.177	0.664	0.664	2.268	-3.557	0.830	0.830	1.452	-1.619
I	5.126	5.140	0.038	14.207	0.797	0.798	1.573	-1.966	0.593	0.594	2.839	-4.532

จากผลการทดลองในตารางที่ 14 จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) ที่ได้อยู่ระหว่าง 2.11-7.30 กรัม/ลิตร และค่ากลางเบี่ยงเบนมาตรฐาน (MSD) ของความเข้มข้นกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 0.034-0.141 ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) ที่ได้อยู่ระหว่าง 0.46-0.80 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส และค่ากลางเบี่ยงเบนมาตรฐาน (MSD) ของผลได้ของกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 1.573-4.636 และอัตราผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (MSD) ของอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรที่ได้อยู่ระหว่าง 0.24-0.84 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง และ 1.407-16.869 ตามลำดับ ส่วนอัตราส่วน S/N จะสัมพันธ์กับผลการทดลองดังนี้ หากการทดลองใดมีความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูง การทดลองนั้นก็จะม้อค่าอัตราส่วน S/N สูงตามไปด้วย เนื่องจากการออกแบบการทดลองโดยวิธีการทากูชิเป็นแบบ B (Biger is the better) โดยชุดการทดลอง H ประกอบด้วย ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง 46.875 มิลลิลิตร, ปริมาตรอาหาร 187.50 มิลลิลิตร, พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 5.7 และขนาดพลาสติก 500 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) สูงสุด เท่ากับ 7.30 กรัม/ลิตร ชุดการทดลอง I ซึ่งประกอบด้วย ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง 46.875 มิลลิลิตร, ปริมาตรอาหาร 281.125 มิลลิลิตร, พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6.0 และขนาดพลาสติก 500 มิลลิลิตร ให้ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) สูงสุดเท่ากับ 0.80 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส และชุดการทดลอง A ซึ่งประกอบด้วย ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง 15.625 มิลลิลิตร, ปริมาตรอาหาร 93.75 มิลลิลิตร, พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 5.7 และขนาดพลาสติก 500 มิลลิลิตร ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) สูงสุดเท่ากับ 0.84 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมงดังที่อธิบายข้างต้น (ตารางที่ 10) และพบว่า จากทั้ง 3 ชุดการทดลอง ความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุดที่ปัจจัยขนาดพลาสติกที่เท่ากัน คือ 500 มิลลิลิตร ซึ่งขนาดพลาสติกบ่งบอกถึงการผสมเข้าด้วยกันของเมล็ดเจลเซลล์ตรึงกับอาหาร นั้นแสดงว่า ไม่ว่าปริมาตรของเมล็ดเจลเซลล์ตรึงและอาหารจะเป็นอย่างไร การผสมเข้าด้วยกันของทั้ง 2 ปัจจัยจะเหมาะสมที่สุดที่ปัจจัยขนาดของพลาสติกเท่ากับ 500 มิลลิลิตร และเมื่อพิจารณาถึงปัจจัยพีเอชเริ่มต้นของอาหารพบว่า ปัจจัย พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.7 ให้ความเข้มข้น และอัตราผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุด โดยปัจจัยพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 ให้ผลได้ของกรดแลกติกสูงสุด เมื่อพิจารณาถึงปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึงกับอาหาร โดยคิดเป็นอัตราส่วน พบว่า อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเมล็ดเจลเซลล์ตรึงและอาหารเท่ากับ 0.17 ($46.875/281.125$, $15.625/93.75$) ให้ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุด โดยอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเมล็ดเจลเซลล์ตรึงและอาหารเท่ากับ 0.25 ($46.875/187.5$) ให้ความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุด

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์อิทธิพลหลักของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยอาศัยอัตราส่วน S/N ของแต่ละระดับปัจจัยของปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัย

ระดับ \ ปัจจัย	A	B	C	D
ความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p)				
1	10.324	14.868	13.473	13.319
2	11.927	12.671	13.365	10.641
3	15.027	9.74	10.441	
ค่าต่ำสุด	10.324	9.74	10.441	10.641
ค่าสูงสุด	15.027	14.868	13.473	13.319
ค่าอิทธิพลหลัก ¹	4.703	5.128	3.032	2.678
ร้อยละอิทธิพลหลัก ²	30.262	32.997	19.510	17.232
ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/S}$)				
1	-2.598	-4.309	-4.076	-3.671
2	-5.953	-4.184	-3.05	-5.125
3	-3.915	-3.974	-5.34	
ค่าต่ำสุด	-5.953	-4.309	-5.34	-5.125
ค่าสูงสุด	-2.598	-3.974	-3.05	-3.671
ค่าอิทธิพลหลัก ¹	3.355	0.335	2.29	1.454
ร้อยละอิทธิพลหลัก ²	45.130	4.506	30.804	19.559
อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p)				
1	-7.74	-2.671	-4.623	-5.087
2	-7.129	-6.337	-5.563	-8.023
3	-3.329	-9.19	-8.011	
ค่าต่ำสุด	-7.74	-9.19	-8.011	-8.023
ค่าสูงสุด	-3.329	-2.671	-4.623	-5.087
ค่าอิทธิพลหลัก ¹	4.411	6.519	3.388	2.936
ร้อยละอิทธิพลหลัก ²	25.565	37.783	19.636	17.016

หมายเหตุ ค่าอธิบายปัจจัย

A, B, C และ D หมายถึง ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง, ปริมาตรอาหาร, พื้นที่เริ่มต้นของอาหาร และ ขนาดฟลาस्क

¹ ค่าอิทธิพลหลักเท่ากับ ผลต่างของค่าสูงสุด และค่าต่ำสุด

² ร้อยละอิทธิพลหลัก คำนวณดังสูตรที่แสดงในภาคผนวก ข โดยใช้ค่าอิทธิพลหลักรวมดังนี้ ความเข้มข้นผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรเท่ากับ 15.541, 7.454 และ 17.254 ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก โดยอาศัยความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) ดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่า ค่าร้อยละอิทธิพลหลักของปริมาณอาหารมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 32.997 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณเม็ดเจลเซลล์ตรึง ฟิเอชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดพลาสติกมีร้อยละอิทธิพลหลักใกล้เคียงกันโดยเรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 30.262, 19.510 และ 17.232 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากค่าดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าปริมาณเม็ดเจลเซลล์ตรึง เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Anova) โดยร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) อาศัยความเข้มข้นกรดแลกติกดังตารางที่ 11 ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

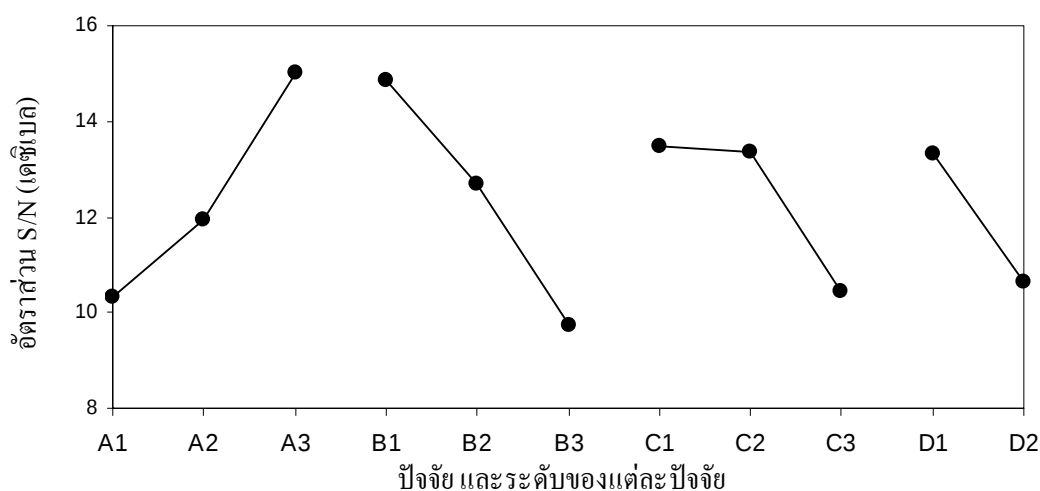
ส่วนผลการวิเคราะห์ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก โดยอาศัยผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) จากตารางที่ 15 พบว่า ค่าร้อยละอิทธิพลหลักของปริมาณเม็ดเจลเซลล์ตรึงมีค่ามากที่สุด คือ 45.13 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ฟิเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 30.80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนขนาดพลาสติก และปริมาณของอาหารมีร้อยละอิทธิพลหลักถัดมาโดยเรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 19.56 และ 4.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากค่าดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าปริมาณเม็ดเจลเซลล์ตรึง เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด โดยให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Anova) ในค่าร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) โดยอาศัยผลได้ของกรดแลกติกในตารางที่ 12 ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

และผลการวิเคราะห์ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก โดยอาศัยอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) จากตารางที่ 15 พบว่า ค่าร้อยละอิทธิพลหลักของปริมาณอาหารมีค่ามากที่สุด คือ 37.78 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ปริมาณเม็ดเจลเซลล์ตรึงเท่ากับ 25.51 เปอร์เซ็นต์ ส่วนฟิเอชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดพลาสติกมีร้อยละอิทธิพลหลักใกล้เคียงกันโดยเรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 19.64 และ 17.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากค่าร้อยละอิทธิพลหลักสามารถบอกได้ว่าปริมาณอาหาร เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด โดยให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Anova) ในค่าร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) โดยอาศัยอัตราการการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรตามตารางที่ 13 ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

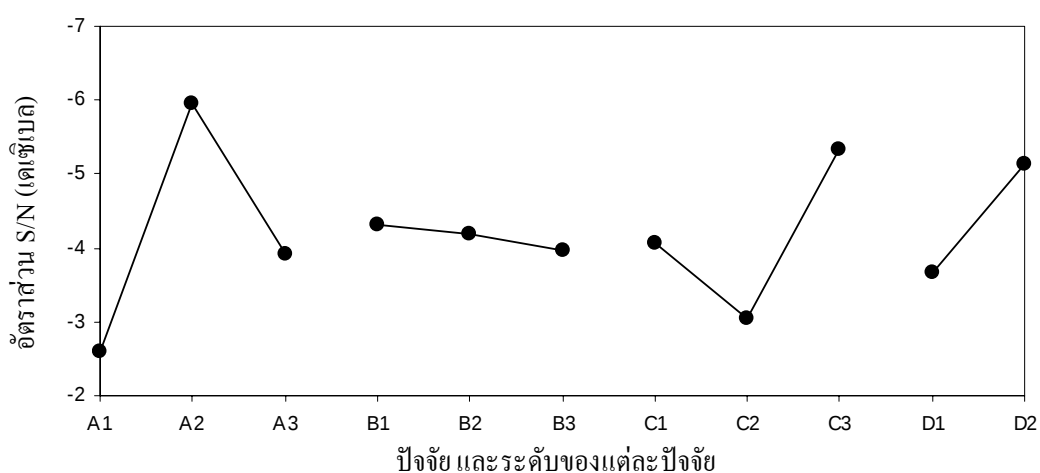
จากผลการวิเคราะห์ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก พบว่า ปริมาณอาหาร เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด รองลงมา คือ ปริมาณเม็ดเจลเซลล์ตรึง เมื่อใช้ความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) และอัตราการการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) ในการวิเคราะห์ และเมื่อใช้ผลได้ของ

กรดแลกติก (Y_{PS}) ในการวิเคราะห์ พบว่า ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด รองลงมา คือ พีเอชเริ่มต้นของอาหาร

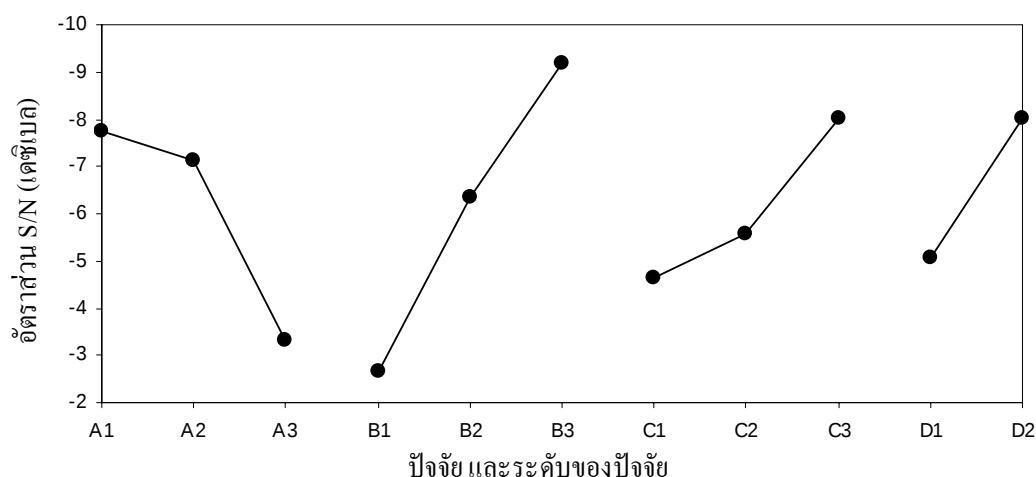
นำอัตราส่วน S/N ตามตารางที่ 14 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วน S/N กับปัจจัยของการทดลองในแต่ละระดับของปัจจัยของการทดลองเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ระดับฟลาสก์ ได้ผลดังภาพที่ 27, 28 และ 29



ภาพที่ 27 สถานะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกรดแลกติก ในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง



ภาพที่ 28 สถานะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อผลได้ของกรดแลกติก ในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง



ภาพที่ 29 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ ในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง

จากภาพที่ 27, 28 และ 29 พิจารณาปัจจัยของแต่ละระดับที่มีอัตราส่วน S/N สูงสุด ซึ่งสามารถสรุประดับของแต่ละระดับของปัจจัยที่เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ได้ผลดังนี้ อัตราส่วน S/N สูงสุดโดยอาศัยความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณสูงสุดสอดคล้องกัน โดยระดับของปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัย อยู่ในระดับเดียวกัน คือ ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง (A) ระดับที่ 3 เท่ากับ 46.825 มิลลิลิตร ส่วนปริมาตรอาหาร (B) พีเอชเริ่มต้นของอาหาร (C) และขนาดพลาสติก (D) ที่ระดับเดียวกัน คือ ระดับที่ 1 เท่ากับ 93.75 มิลลิลิตร, 5.7 และ 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าอัตราส่วน S/N สูงสุดโดยอาศัยผลได้ของกรดแลกติก พบว่า ปัจจัยปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง และขนาดพลาสติกมีระดับเดียวกัน คือ ระดับที่ 1 เท่ากับ 15.625 และ 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปัจจัยปริมาตรอาหาร และพีเอชเริ่มต้นของอาหาร มีระดับที่ต่างกัน คือ ระดับที่ 3 และ 2 เท่ากับ 281.125 มิลลิลิตร และ 6.0 ตามลำดับ สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมได้ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ระดับฟลาस्कที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ โดยพิจารณาจากความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ

ปัจจัยการทดลอง	ระดับการทดลอง	รายละเอียด
ชุดการทดลอง A: ความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ (Q_p)		
A: ปริมาตรเมล็ดเซลล์ตรึง (มล.)	3	46.825
B: ปริมาตรอาหาร (มล.)	1	93.75
C: พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	1	5.7
D: ขนาดฟลาस्क (มล.)	1	500
ชุดการทดลอง B: ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$)		
A: ปริมาตรเมล็ดเซลล์ตรึง (มล.)	1	15.625
B: ปริมาตรอาหาร (มล.)	3	281.125
C: พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	2	6.0
D: ขนาดฟลาस्क (มล.)	1	500

2.2.3 การประมาณค่าความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ (Q_p) ที่ได้จากการผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การประมาณค่าความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ (Q_p) ด้วยการคำนวณในภาคผนวก ข เมื่อแปรผันปัจจัยการทดลองในระดับที่เหมาะสม สรุปผลการคำนวณได้ดังตารางที่ 17

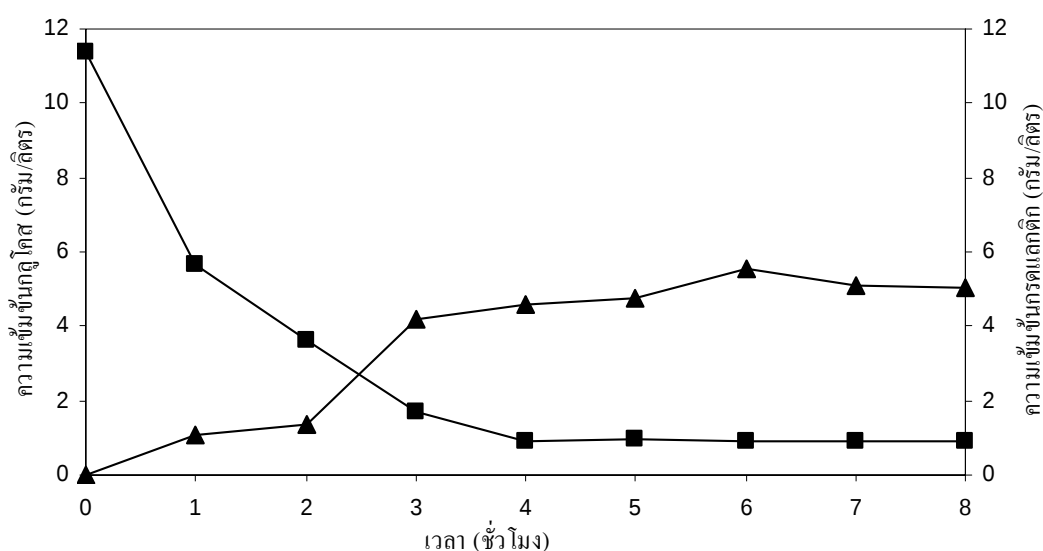
ตารางที่ 17 สรุปการประมาณค่าความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการทางกุกิ

พารามิเตอร์ที่ใช้พิจารณา	ค่าคำนวณจากวิธีการทางกุกิ		
	C_p (g g ⁻¹)	$Y_{p/s}$ (g g ⁻¹)	Q_p (g l ⁻¹ h ⁻¹)
ความเข้มข้นกรดแลกติก	9.342	0.668	1.332
ผลได้ของกรดแลกติก	2.975	0.909	0.499
อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร	9.342	0.668	1.332

การประมาณค่าความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรภายใต้สภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการทางกุกิแสดงดังตารางที่ 17 พบว่าค่าประมาณของความเข้มข้น (C_p) ผลได้ (Y_p) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) จากความเข้มข้นกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรมีค่าเท่ากัน เนื่องจากมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงที่ได้จากวิธีการทางกุกิเดียวกัน โดยมีผลดังนี้ความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรเท่ากับ 9.34 กรัม/ลิตร, 0.67 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส และ 1.33 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนค่าประมาณของความเข้มข้นกรดแลกติก (C_p) ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) จากผลได้ของกรดแลกติกได้เท่ากับ 2.98 กรัม/ลิตร, 0.91 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส และ 0.50 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากการประมาณค่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสมกับผลที่ได้จากการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 10) พบว่า ผลที่ได้จากการคำนวณภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร มีค่าความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงกว่าทั้ง 9 ชุดการทดลอง แต่ค่าผลได้ของกรดแลกติกมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลอง C และ H คือ ประมาณ 0.66-0.69 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส ส่วนผลที่ได้จากการคำนวณภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากผลได้ของกรดแลกติก มีค่าผลได้ของกรดแลกติกสูงกว่าทั้ง 9 ชุดการทดลอง แต่ค่าความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลอง F และ I เท่ากับ 0.27 กรัม/ลิตร และ 0.59 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

2.3 การยืนยันการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ระดับพลาสติกภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

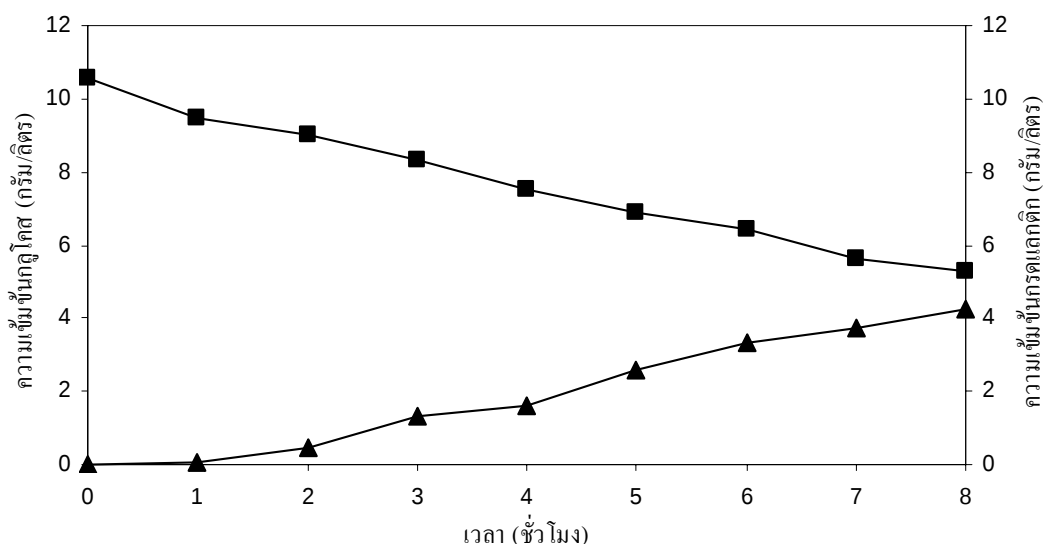
ทำการทดลองยืนยันการผลิตกรดแลกติกระดับพลาสติกภายใต้สภาวะตามตารางที่ 16 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 โดยทำการทดลองภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบ/นาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 30, 31 และตารางที่ 18



ภาพที่ 30 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากวิธีการทางจุลชีววิทยา ภายใต้สภาวะชุดการทดลอง A (ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง 46.825 มล. ปริมาตรอาหาร 93.75 มล. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 5.7 และขนาดพลาสติก 500 มล.) (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

ภาพที่ 30 เป็นการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร คือ ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง 46.825 มล. ปริมาตรอาหาร 93.75 มล. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 5.7 และขนาดพลาสติก 500 มล. ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 11.386 กรัม/ลิตร พบว่า เมื่อเริ่มการผลิตภายใน 3 ชั่วโมง น้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็ว และเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 4 ส่วนการเกิดกรดแลกติกมีแนวโน้มเช่นเดียวกัน จนกระทั่งสิ้นสุดการผลิตในชั่วโมงที่ 8

ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติกเท่ากับ 0.92 และ 5.02 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก4)



ภาพที่ 31 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีการทางเคมี ภายใต้สภาวะชุดการทดลอง B (ปริมาตรเม็ดยีสเซลล์ตรึง 15.625 มล. ปริมาตรอาหาร 281.125 มล. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6.0 และขนาดพลาสติก 500 มล.) (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

ภาพที่ 31 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากผลได้ของกรดแลกติก คือ ปริมาตรเม็ดยีสเซลล์ตรึง 15.625 มล. ปริมาตรอาหาร 281.125 มล. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6.0 และขนาดพลาสติก 500 มล. โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 10.58 กรัม/ลิตร พบว่า เมื่อเริ่มการผลิต น้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติกลดลง และเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ตามลำดับ จนกระทั่งสิ้นสุดการผลิตในชั่วโมงที่ 8 ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติกเท่ากับ 5.28 และ 4.27 กรัม/ลิตร (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก5)

นำผลการทดลองของทั้ง 3 ชุดการทดลอง มาคำนวณค่าผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_s) อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิง-ปริมาตร (Q_p) สรุปผลได้ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 สรุปผลการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการทางกุกิ

พารามิเตอร์	ชุดการทดลอง	
	A	B
ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น ($C_x, g\ l^{-1}$)	3.066	0.485
ความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุด ($C_p^m, g\ l^{-1}$)	5.561	4.273
ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}, g\ g^{-1}$)	0.531	0.802
อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส ($q_s, g\ g^{-1}\ h^{-1}$)	0.569	1.365
อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก ($q_p, g\ g^{-1}\ h^{-1}$)	0.302	1.095
อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร ($Q_p, g\ l^{-1}\ h^{-1}$)	0.926	0.531

หมายเหตุ สภาวะชุดการทดลอง A ประกอบด้วย ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง 46.825 มล. ปริมาตรอาหาร 93.75 มล. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 5.7 และขนาดพลาสติก 500 มล.

สภาวะชุดการทดลอง B ประกอบด้วย ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง 15.625 มล. ปริมาตรอาหาร 281.125 มล. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6.0 และขนาดพลาสติก 500 มล.

การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในตารางที่ 16 ชุดการทดลอง A และ B แสดงดังตารางที่ 18 พบว่า มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นของชุดการทดลอง A และ B เท่ากับ 3.07 และ 0.49 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยชุดการทดลอง A มีความเข้มข้นกรดแลกติก (5.56 กรัม/ลิตร) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (0.93 กรัม/ลิตร ชั่วโมง) สูงกว่าชุดการทดลอง B ในทางกลับกันชุดการทดลอง B มีผลได้ของกรดแลกติก (0.80 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส) อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (1.37 กรัมกลูโคส/กรัมเซลล์ ชั่วโมง) และอัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (1.10 กรัมกรดแลกติก/กรัมเซลล์ ชั่วโมง) สูงกว่าชุดการทดลอง A ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากชุดการทดลอง A มีความเข้มข้นเซลล์ และปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึงมากกว่าชุดการทดลอง B ประมาณ 6 และ 3 เท่า แต่ในทางกลับกันชุดการทดลอง A มีปริมาณอาหารน้อยกว่าชุดการทดลอง B ประมาณ 3 เท่า และเมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการประมาณด้วยวิธีการทางกุกิในตารางที่ 17 ได้ผลแสดงดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 การเปรียบเทียบค่าประมาณและผลจากการทดลองของการผลิตกรดแลกติกแบบ เบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการทางกฤษฎี

พารามิเตอร์	Y_{exp}	Y จากการทดลอง
ความเข้มข้นกรดแลกติก และอัตราการผลิตเชิงปริมาตร ¹		
C_p (g l ⁻¹)	9.342	5.561
$Y_{p/s}$ (g g ⁻¹)	0.668	0.531
Q_p (g l ⁻¹ h ⁻¹)	1.332	0.926
ผลได้ของกรดแลกติก ²		
C_p (g l ⁻¹)	2.975	4.273
$Y_{p/s}$ (g g ⁻¹)	0.909	0.802
Q_p (g l ⁻¹ h ⁻¹)	0.499	0.531

หมายเหตุ ¹ หมายถึง สภาวะของชุดการทดลอง A ประกอบด้วย ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง 46.825 มล. ปริมาตรอาหาร 93.75 มล. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 5.7 และขนาดพลาสติก 500 มล.

² หมายถึง สภาวะชุดการทดลอง B ประกอบด้วย ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง 15.625 มล. ปริมาตรอาหาร 281.125 มล. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6.0 และขนาดพลาสติก 500 มล.

ตารางที่ 19 แสดงการสรุปผลการเปรียบเทียบระหว่างผลจากการทดลอง และผลที่ได้จากการประมาณด้วยวิธีการทางกฤษฎี พบว่า ผลการทดลองจากชุดการทดลอง A และ B มีค่าต่ำกว่าผลที่ได้จากการประมาณด้วยวิธีการทางกฤษฎี ยกเว้นความเข้มข้นของกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรที่ได้จากการทดลองของชุดการทดลอง B มีค่าสูงกว่าผลที่ได้จากการประมาณด้วยวิธีการทางกฤษฎี ถ้าดูจากภาพที่ 21 และ 22 โดยปล่อยให้ระยะเวลาในการผลิตกรดแลกติกนานกว่า 8 ชั่วโมง อาจทำให้กรดแลกติกที่อยู่ภายในเมล็ดเจลเซลล์ตรึงแพร่ออกมาสู่น้ำหมักเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ได้กรดแลกติกสูงขึ้น แต่ทำให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรลดลง เพราะใช้เวลาในการผลิตนานขึ้น

เมื่อพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการทางกฤษฎี เทียบกับการทดลอง 9 ชุดการทดลอง ที่อธิบายในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 8 ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก

กแบบเปิดเสร็จด้วยเซลล์ตริง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ระดับพลาสติก พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่ได้

จากวิธีการทางสถิติ โดยอาศัยความเข้มข้น และอัตราผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (ชุดการทดลอง A) คล้ายกับชุดการทดลอง H โดยมีบางสภาวะที่แตกต่างกัน คือ ระดับของปัจจัยปริมาณอาหารโดย สภาวะที่เหมาะสมที่ได้มีระดับของปัจจัยดังกล่าวที่ระดับที่ 1 (93.75 มิลลิลิตร) แต่ในชุดการทดลอง H อยู่ในระดับที่ 2 (187.5 มิลลิลิตร) แสดงให้เห็นว่า สภาวะที่เหมาะสมที่ได้สามารถลดปริมาณอาหารจากที่ใช้ในชุดการทดลอง H ทำให้ต้นทุนปริมาณอาหาร หรือสารตั้งต้นในการผลิตกรด แลก-ติกลดลง ส่วนปัจจัยที่เหลือมีระดับเดียวกัน โดยปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตริง ฟือเชเริ่มต้นของอาหาร และขนาดพลาสติกเท่ากับ ระดับที่ 3 (46.825 มิลลิลิตร), 1 (5.7) และ 1 (500 มิลลิลิตร) ตามลำดับ ส่วนสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากค่าอัตราส่วน S/N โดยอาศัยผลได้ของกรดแลกติกคล้ายกับชุดการทดลอง C แต่มีบางสภาวะที่แตกต่างกัน โดยระดับของปัจจัยฟือเชเริ่มต้นของอาหารใน สภาวะที่เหมาะสม คือ ระดับที่ 2 (6) ในชุดการทดลอง C อยู่ในระดับที่ 3 (6.3) ซึ่งไม่แตกต่างกัน มาก และดูได้จากตารางที่ 12 พบว่า ฟือเชเริ่มต้นของอาหารมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกเป็น อันดับ 2 รองจากปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตริง และปัจจัยที่เหลืออีก 3 ปัจจัยอยู่ในระดับเดียวกัน โดย ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตริง ปริมาณอาหาร และขนาดพลาสติกเท่ากับ ระดับที่ 1 (15.625 มิลลิลิตร), 3 (281.125 มิลลิลิตร) และ 1 (500 มิลลิลิตร) ตามลำดับ

ตารางที่ 20 การเปรียบเทียบผลการทดลองการผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จด้วยเซลล์ตริงระดับ พลาสติกระหว่างชุดการทดลองจากการหาสภาวะที่เหมาะสม (ชุดการทดลอง C และ H) กับ ชุดการทดลองการยืนยันภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ชุดการทดลอง A และ B)

พารามิเตอร์	ชุดการทดลอง			
	A	H	B	C
$C_p \text{ (g l}^{-1}\text{)}$	5.561	7.227	4.273	2.116
$Y_{p/S} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	0.531	0.664	0.802	0.685
$Q_p \text{ (g l}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0.926	0.830	0.531	0.244

หมายเหตุ สภาวะการทดลองชุด A และ B ดูคำอธิบายจากตารางที่ 16
สภาวะการทดลองชุด H และ C ดูคำอธิบายจากตารางที่ 8

ตารางที่ 20 เมื่อนำผลการทดลองจากชุดการทดลอง A เปรียบเทียบกับการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมในชุดการทดลอง H พบว่า ค่าพารามิเตอร์ของชุดการทดลอง A มีค่าใกล้เคียงหรือสูงกว่าค่าที่ได้จากชุดการทดลอง H โดยชุดการทดลอง A และ H มีความเข้มข้นกรดแลกติกเท่ากับ 5.56 และ 7.23 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ผลได้ของกรดแลกติกเท่ากับ 0.53 และ 0.66 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส ตามลำดับ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรเท่ากับ 0.93 และ 0.83 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าชุดการทดลอง H มีความเข้มข้น และผลได้ของกรดแลกติกสูงกว่าชุดการทดลอง A เนื่องจากชุดการทดลอง H มีปริมาณอาหารมากกว่า ทำให้มีปริมาณสารตั้งต้นมากกว่าด้วย ในขณะที่ปัจจัยอื่น ๆ อยู่ในระดับเดียวกัน ทำให้เซลล์มีอาหารในการผลิตกรดแลกติกได้มากกว่านั่นเอง แต่อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรของชุดการทดลอง A มีค่าสูงกว่าชุดการทดลอง H เพราะเวลาที่ให้กรดแลกติกสูงสุดในการทดลอง A (6 ชั่วโมง) เร็วกว่าชุดการทดลอง H (8 ชั่วโมง) และในทำนองเดียวกันเมื่อนำค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากชุดการทดลอง B มาเปรียบเทียบกับผลการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมในชุดการทดลอง C พบว่า ค่าพารามิเตอร์ของชุดการทดลอง B มีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากชุดการทดลอง C โดยชุดการทดลอง B และ C มีความเข้มข้นกรดแลกติกเท่ากับ 4.27 และ 2.12 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ผลได้ของกรดแลกติกเท่ากับ 0.80 และ 0.69 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส ตามลำดับ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรเท่ากับ 0.53 และ 0.24 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ โดยชุดการทดลอง B และ C มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกันดังที่ได้อธิบายข้างต้น นั้นแสดงให้เห็นว่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Anova) โดยอาศัยความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรในตารางที่ 11 ถึง 13

จากผลการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ระดับพลาสติก พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกที่สำคัญ ไม่ว่าจะเป็นอาศัยความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรในการวิเคราะห์ คือ ปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์ในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง ถ้ามีความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์สูงอาจจะทำให้ได้กรดแลกติกที่ความเข้มข้นสูง และถ้ามีความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์ต่ำไปก็อาจทำให้การผลิตกรดแลกติกเกิดขึ้นได้ไม่ดี ปัจจัยที่มีอิทธิพลรองลงมา คือ ปริมาณอาหาร โดยปัจจัยดังกล่าวนี้บ่งชี้ถึงปริมาณสารอาหารที่มีในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง คือ ถ้าในการผลิตมีปริมาณอาหารมาก ส่งผลทำให้ได้กรดแลกติกที่มีความเข้มข้นสูงกว่าในการผลิตที่มีปริมาณอาหารน้อย อย่างไรก็ตาม การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ต้องอาศัยปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัยเกื้อหนุน

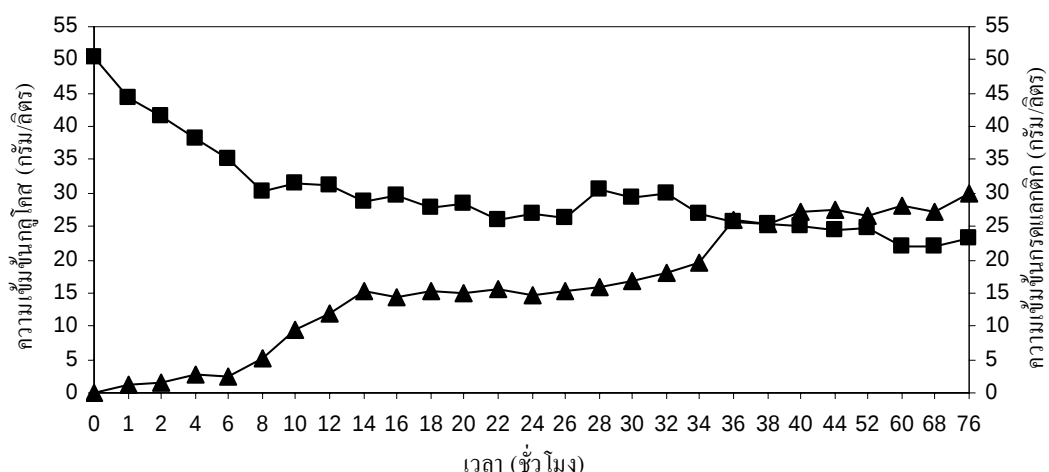
กันโดยถ้าต้องการให้ได้กรดแลกติกที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ก็อาจใช้ปริมาณเมล็ดเชลล์ตรึงมากแต่ใช้อาหารที่มีปริมาณน้อยกว่าใช้อาหารปริมาณมาก ดังผลการทดลองของชุดการทดลอง A (ภาพที่ 21) ในสถานะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการทางจุล ซึ่งใช้ปริมาณเมล็ดเชลล์ตรึงสูงสุด คือ 46.875 มิลลิลิตร และปริมาณอาหารต่ำสุด คือ 93.75 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณเท่ากับ 5.56 กรัม/ลิตร และ 0.926 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง และจากผลการทดลองทั้งหมด (จากการหาสถานะที่เหมาะสมรวมกับการยืนยันภายใต้สถานะที่เหมาะสม) พบว่าอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเมล็ดเชลล์ตรึงและอาหาร (อัตราส่วน V_B/V_M) ที่เหมาะสม โดยให้ความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณสูง อยู่ในช่วง 0.17-0.50 และปัจจัยถัดมาคือพีเอชเริ่มต้นของอาหาร จากตารางที่ 2 (ในตรวจเอกสาร) จะเห็นได้ว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกด้วยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 อยู่ระหว่าง 5.5-6.0 ส่วนปัจจัยสุดท้าย คือ ขนาดพลาสติก ปัจจัยนี้ช่วยบ่งบอกถึงการผสมเข้าด้วยกันของเมล็ดเชลล์ตรึงกับอาหาร ดังนั้นเมื่อเมล็ดเชลล์ตรึงและอาหารมีการผสมเข้าด้วยกันดี สามารถทำให้เกิดการแพร่ของกลูโคสเข้าสู่เมล็ดเชลล์ตรึง และการแพร่ของกรดแลกติกจากภายในเมล็ดเชลล์ตรึงออกสู่น้ำหมักภายนอกเมล็ดเชลล์ตรึงได้ดี จึงทำให้การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเชลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 มีประสิทธิภาพมากขึ้น

3. การผลิตกรดแลกติกด้วยถังปฏิกรณ์เชลล์ตรึงแพ็คเกจ

3.1 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก

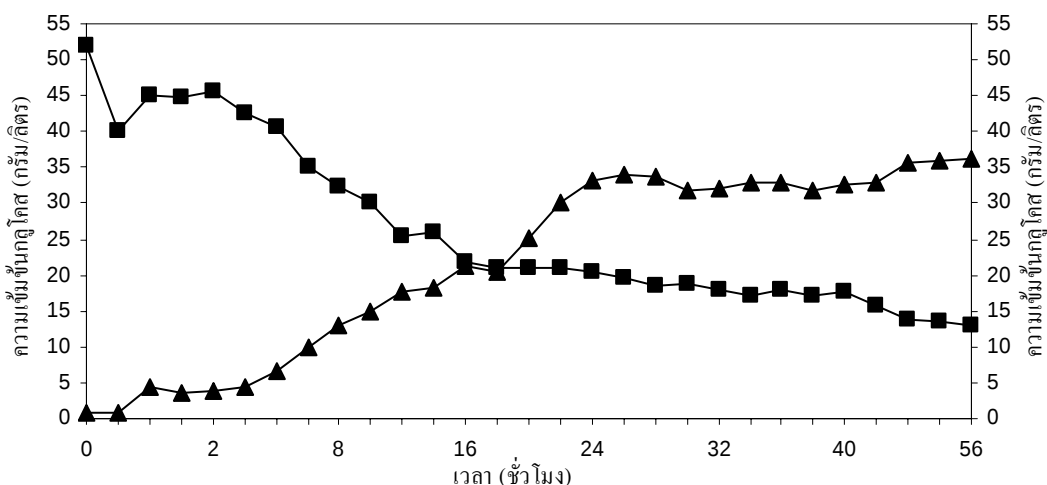
3.1.1 ผลของอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเมล็ดเชลล์ตรึงและน้ำหมัก

ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยถังปฏิกรณ์เชลล์ตรึงแพ็คเกจโดยการแปรผันอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเมล็ดเชลล์ตรึงและน้ำหมัก (อัตราส่วน V_B/V_M) 3 อัตราส่วน คือ 125/750 (0.5 เท่า) 250/750 (1 เท่า) และ 500/750 (2 เท่า) โดยทำการกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเชลล์ตรึง ภายใต้สภาวะดังนี้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชในการผลิต 5.7 และอัตราการกวน 100 รอบ/นาที แสดงผลดังภาพที่ 32 ถึง 34 และตารางที่ 21



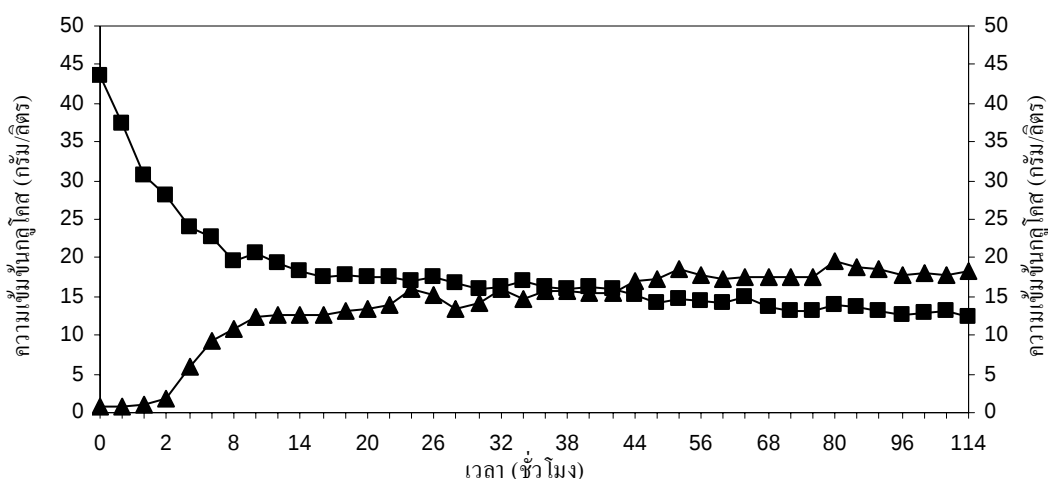
ภาพที่ 32 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงเวียนกลับน้ำหมัก ด้วยอัตราส่วน $V_B/V_M=125/750$ ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 50.46 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

ภาพที่ 32 แสดงการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง โดยมีอัตราส่วน $V_B/V_M=125/750$ ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 50.46 กรัม/ลิตร เมื่อเริ่มการผลิตพบว่า ภายใน 8 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วจาก 50.46 กรัม/ลิตร ลดลงเหลือ 30.10 กรัม/ลิตร และกรดแลกติกมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 5.30 กรัม/ลิตร หลังจากชั่วโมงที่ 8 พบว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติกมีการลดลง และเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ตามลำดับ จนกระทั่งสิ้นสุดการผลิตภายใน 76 ชั่วโมง ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติกเท่ากับ 23.09 และ 30.09 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก6)



ภาพที่ 33 การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงเวียนกลับน้ำหมัก ด้วยอัตราส่วน $V_B/V_M=250/750$ ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 51.87 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงเวียนกลับน้ำหมัก โดยมีอัตราส่วน $V_B/V_M=250/750$ ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 51.87 กรัม/ลิตร แสดงดังภาพที่ 33 เมื่อเริ่มการผลิต พบว่า ภายใน 16 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วเป็น 21.86 กรัม/ลิตร และกรดแลกติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกันจาก 0.96 กรัม/ลิตรเป็น 21.34 กรัม/ลิตร) หลังจาก ชั่วโมงที่ 16 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติกมีการเปลี่ยนแปลงโดยลดลง และเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการผลิตภายใน 56 ชั่วโมง ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก เท่ากับ 13.02 และ 36.26 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก7)



ภาพที่ 34 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงเวียนกลับน้ำหมัก โดยมีอัตราส่วน $V_B/V_M=500/750$ ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 43.66 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

ภาพที่ 34 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงเวียนกลับน้ำหมักด้วย อัตราส่วน $V_B/V_M=500/750$ ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 43.66 กรัม/ลิตร พบว่า ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 8 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วจาก 43.66 กรัม/ลิตร เป็น 19.63 กรัม/ลิตร และกรดแลกติกมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 0.66 กรัม/ลิตร เป็น 10.84 กรัม/ลิตร หลังจากชั่วโมงที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของกลูโคส และกรดแลกติกลดลง และเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ตามลำดับ จนกระทั่งสิ้นสุดการผลิตภายใน 114 ชั่วโมง มีความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก เท่ากับ 12.47 และ 18.19 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก8)

เมื่อนำผลการทดลองทั้ง 3 การทดลองมาพิจารณาถึงจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจเวียนกลับน้ำหมัก สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 สรุปผลการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสรีเวียนกลับน้ำหมักด้วยระบบถังหมักปฏิกรณ์เซลล์ครึ่งเพื่อกเบระดับปฏิบัติการ

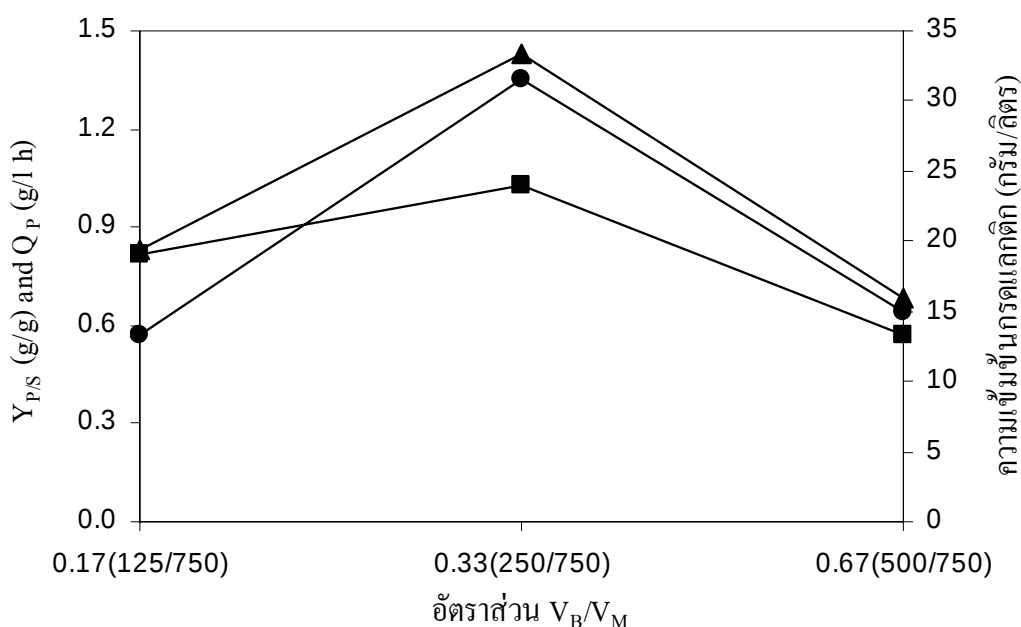
พารามิเตอร์	อัตราส่วน V_B/V_M		
	125/750	250/750	500/750
C_{Xi} ($g\ l^{-1}$)	1.00	1.68	2.62
T_f (h)	34	24	24
C_{Si} ($g\ l^{-1}$)	50.46	51.87	43.66
C_{Sf} ($g\ l^{-1}$)	26.80	20.39	17.00
C_P^m ($g\ l^{-1}$)	19.41	33.28	15.97
$Y_{P/S}$ ($g\ g^{-1}$)	0.82	1.03	0.57
q_s ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)	0.70	0.78	0.42
q_p ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)	0.57	0.80	0.24
Q_s ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$)	0.70	1.31	1.11
Q_p ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$)	0.57	1.35	0.64

หมายเหตุ ดูคำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อในหน้า (11)

พิจารณาจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสรีเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ครึ่งเพื่อกเบ ด้วยอัตราส่วน V_B/V_M ทั้ง 3 อัตราส่วนแสดงผลดังตารางที่ 21 จะเห็นว่าเวลาในการผลิตกรดแลกติกสูงสุดของอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 125/750 ใช้เวลานานที่สุดเท่ากับ 34 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นระบบที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นต่ำที่สุด อัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ให้ความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 33.28 กรัม/ลิตร, 1.03 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส และ 1.35 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีอัตราจำเพาะของการผลิตกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ $0.80\ h^{-1}$ เมื่อพิจารณาถึงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ พบว่า อัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 125/750 และ 500/750 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ใกล้เคียงกันคือ 23.66 และ 26.66 กรัม/ลิตร แต่อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสของอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 500/750 เท่ากับ $1.11\ g\ l^{-1}\ h^{-1}$ สูงกว่าอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 125/750 เนื่องจากมีปริมาณเซลล์สูงกว่า ส่วนอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้สูงสุดคือ $31.42\ g\ l^{-1}\ h^{-1}$ จึงมีอัตราการใช้กลูโคสสูงสุดเท่ากับ $1.31\ g\ l^{-1}\ h^{-1}$ ชั่วโมง เมื่อพิจารณาถึงอัตราจำเพาะของการใช้น้ำตาลกลูโคส พบว่า อัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 125/750

และ 250/750 ใกล้เคียงกันเท่ากับ 0.70 และ 0.78 ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ โดยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 500/750 มีค่าน้อยที่สุดเท่ากับ 0.42 ชั่วโมง⁻¹ เนื่องจากใช้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นสูงที่สุด

จากผลการทดลองทั้ง 3 การทดลอง แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วน V_B/V_M มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น โดยการผลิตกรดแลกติกที่มีอัตราส่วน V_B/V_M ต่ำ ทำให้การผลิตกรดแลกติกเกิดขึ้นไม่ดี เนื่องจากมีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นต่ำ โดยมีการใช้น้ำตาลกลูโคส และการเกิดกรดแลกติกเกิดขึ้นในปริมาณต่ำ แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วน V_B/V_M ขึ้น พบว่า การผลิตกรดแลกติกก็กลับใกล้เคียงกับการผลิตกรดแลกติกที่มีอัตราส่วน V_B/V_M ต่ำ เนื่องจากเกิดข้อจำกัดของการแพร่ โดยการแพร่ของกลูโคสจากน้ำหมักเข้าสู่เม็ดเจลเซลล์ตรึงอาจเกิดได้ไม่ค่อยดี ทำให้กลูโคสที่อยู่ในเม็ดเจลเซลล์ตรึงมีปริมาณน้อย ซึ่งทำให้เซลล์ใช้กลูโคสได้น้อยเป็นผลให้ได้กรดแลกติกปริมาณน้อย และแพร่กรดแลกติกออกจากเม็ดเจลเซลล์ตรึงสู่น้ำหมักได้น้อยลง



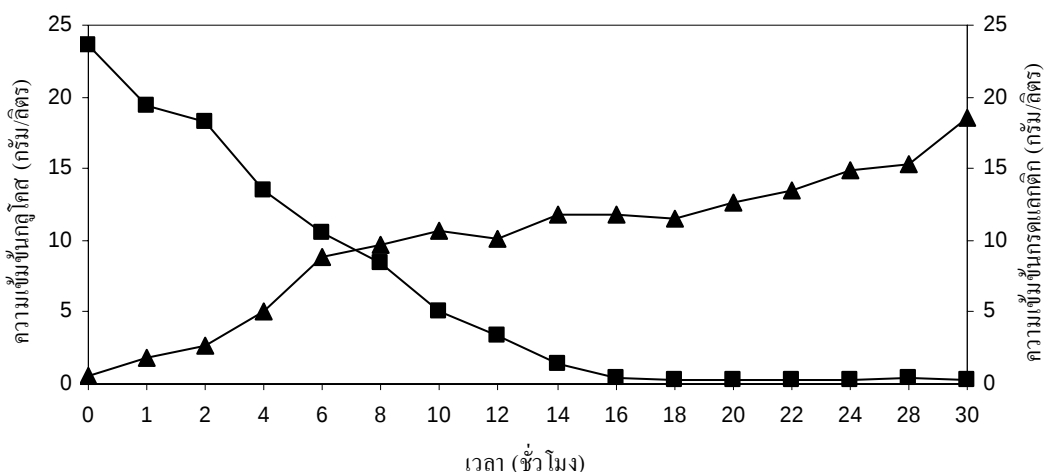
ภาพที่ 35 ความสัมพันธ์อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก (V_B/V_M) กับความเข้มข้นกรดแลกติก (C_P , ▲) ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$, ■) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_P , ●)

ความสัมพันธ์อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก กับความเข้มข้น (C_P) ผลได้ ($Y_{P/S}$) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_P) แสดงดังภาพที่ 35 พบว่า อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก (V_B/V_M) เท่ากับ 250/750 (0.33) มีความ

เข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 33.28 กรัม/ลิตร, 1.03 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคสและ 1.35 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสรีด้วยเซลล์ตรึง โดยอัตราส่วน V_B/V_M อยู่ในช่วง 0.17-0.50 และอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 มีค่าเท่ากับ 0.33 จึงเลือกใช้อัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ เพื่อบดเคี้ยววนกลับน้ำหมักที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสเท่ากับ 23.54 กรัม/ลิตร ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 36

3.1.2 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส

ภาพที่ 36 เป็นการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์เพื่อบดเคี้ยววนกลับน้ำหมักที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 23.54 กรัม/ลิตร เมื่อเริ่มการผลิตปริมาณน้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติกลดลง และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ตามลำดับ ภายใน 16 ชั่วโมง จนกระทั่งเมื่อสิ้นสุดการผลิตในชั่วโมงที่ 30 มีความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติกเท่ากับ 0.28 และ 18.55 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก9)



ภาพที่ 36 การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสรีวงวนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์เพื่อบดเคี้ยวเซลล์ตรึงด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 23.54 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์เพื่อบดเคี้ยววนกลับน้ำหมัก ภายใต้สภาวะอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ระหว่าง

ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสเท่ากับ 23.54 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 36) ณ เวลาของการผลิตที่ 16 และ 30 ชั่วโมง และ 51.87 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 33) ณ เวลาของการผลิตที่ 24 ชั่วโมง สรุปผลดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ในถังหมักแพ็คเกจระดับปฏิบัติการด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750

พารามิเตอร์	ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)		
	23.54		51.87
C_{Xi} ($g\ l^{-1}$)	1.97		1.68
T (h)	16	30	24
C_{Sf} ($g\ l^{-1}$)	0.39	0.28	20.39
C_p ($g\ l^{-1}$)	11.79	18.55	33.28
$Y_{p/s}$ ($g\ g^{-1}$)	0.48	0.77	1.03
q_s ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)	0.73	0.30	0.78
q_p ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)	0.36	0.78	0.80
Q_s ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$)	1.45	0.39	1.31
Q_p ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$)	0.70	0.60	1.35
glucose utilization (%)	98.34	98.81	60.69

หมายเหตุ คู่มืออธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่หน้า (11)

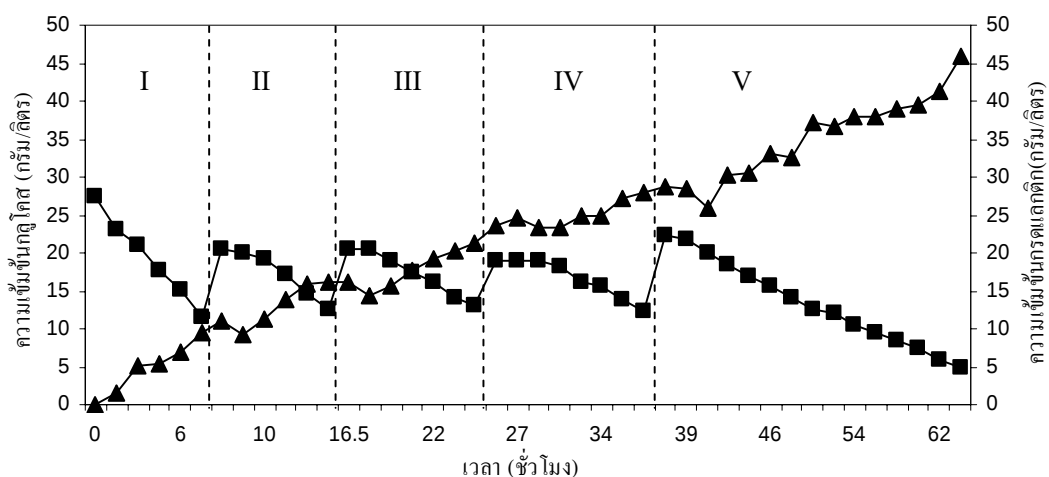
จากตารางที่ 22 เป็นการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจ ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นต่างกัน พบว่า ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่ำ มีการใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 16 ชั่วโมง คือ จาก 23.54 กรัม/ลิตร เหลือ 0.39 กรัม/ลิตร แต่ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 51.87 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 มีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ 20.39 กรัม/ลิตร ดังนั้น glucose utilization ของการผลิตกรดแลกติกที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 23.54 กรัม/ลิตร จึงมีค่าสูงกว่าการผลิตกรดแลกติกที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 51.87 กรัม/ลิตรเท่ากับ 98.34 และ 60.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นกรดแลกติก พบว่า ที่สภาวะความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่ำมีความเข้มข้นกรดแลกติกต่ำกว่าที่สภาวะความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นสูงกว่าเท่ากับ 11.79 และ 33.28

กรัม/ลิตร ตามลำดับ เนื่องจากมีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นของการทดลองสูงกว่า จึงทำให้ผลได้ อัตราผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร และอัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติกต่ำกว่า อย่างไรก็ตามการใช้น้ำตาลกลูโคสในการทดลองทั้งสองใกล้เคียงกัน คือ 1.45 และ 1.31 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเวลาการผลิตชั่วโมงที่ 30 ของการทดลองที่มีความเข้มข้นกลูโคสต่ำ พบว่าผลได้ อัตราผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร และอัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติกใกล้เคียงกับการทดลองที่มีความเข้มข้นกลูโคสสูงกว่าที่เวลาการผลิตชั่วโมงที่ 24 การใช้เวลาการผลิตนานขึ้นทำให้กรดแลกติกในการทดลองที่มีความเข้มข้นกลูโคสต่ำเพิ่มมากขึ้น แต่อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสลดลงจาก 1.45 เป็น 0.39 กรัมกลูโคส/ลิตร ชั่วโมง

จากผลการทดลองดังกล่าว จะเห็นได้ว่า การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์แพ็คเกจเวียนกลับน้ำหมักด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสต่ำกว่าสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดในระยะเวลาการผลิตที่เร็วกว่า แต่มีความเข้มข้นผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรต่ำการทดลองที่มีความเข้มข้นกลูโคสสูงกว่า จึงเลือกใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสต่ำในการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจเวียนกลับน้ำหมักด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 แสดงผลดังภาพที่ 37

3.2 การผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจ

การผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจเวียนกลับน้ำหมักด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ภายใต้สภาวะดังนี้ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบ/นาที และพีเอชในการผลิตเท่ากับ 5.7 เมื่อความเข้มข้นกลูโคสลดลงเหลือประมาณ 10 กรัม/ลิตร จึงเติมน้ำตาลกลูโคสปริมาตร 25 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นกลูโคสสุดท้ายเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร เพื่อรักษาอัตราส่วน V_B/V_M ให้คงที่ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 37



ภาพที่ 37 การผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึงด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 27.36 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)

การผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ในถังปฏิกรณ์แพ็คเกจ แสดงดังภาพที่ 37 เมื่อเริ่มการผลิต ตั้งแต่เวลา 0-8 ชั่วโมง ความเข้มข้นกลูโคสลดลงเหลือ 11.64 กรัม/ลิตร และได้กรดแลกติกเท่ากับ 9.50 กรัม/ลิตร จึงทำการเติมน้ำตาลกลูโคสได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20.60 กรัม/ลิตร ช่วงที่ 2 เวลาตั้งแต่ 8.5-16 ชั่วโมง ความเข้มข้นกลูโคสลดลงเหลือ 12.45 กรัม/ลิตร ได้กรดแลกติกเท่ากับ 16.24 กรัม/ลิตร จึงทำการเติมน้ำตาลกลูโคสได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20.60 กรัม/ลิตร ช่วงที่ 3 เวลาตั้งแต่ 16.5-26 ชั่วโมง ความเข้มข้นกลูโคสลดลงเหลือ 13.10 กรัม/ลิตร ได้กรดแลกติกเท่ากับ 21.34 กรัม/ลิตร จึงทำการเติมน้ำตาลกลูโคสได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 18.92 กรัม/ลิตร ช่วงที่ 4 เวลาตั้งแต่ 26.5-38 ชั่วโมง ความเข้มข้นกลูโคสลดลงเหลือ 12.27 กรัม/ลิตร ได้กรดแลกติกเท่ากับ 28.03 กรัม/ลิตร จึงทำการเติมน้ำตาลกลูโคสได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 22.28 กรัม/ลิตร และช่วงที่ 5 ซึ่งเป็นช่วงสุดท้าย เวลาตั้งแต่ 38.5-64 ชั่วโมง มีความเข้มข้นกลูโคสเหลือ 4.83 กรัม/ลิตร ได้กรดแลกติกเท่ากับ 46.01 กรัม/ลิตร (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก10)

เมื่อเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ระหว่างการผลิตกรดแลกติกเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึง โดยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 แบบเบ็ดเสร็จจากการทดลอง 3.1.2 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 23.54 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 36) และการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราว (ภาพที่ 37) ได้ผลดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ผลเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์แพ็คเกจเวียนกลับน้ำหมักระหว่างการผลิตแบบเบ็ดเสร็จ และการผลิตแบบครั้งคราว

พารามิเตอร์	แบบเบ็ดเสร็จ		แบบครั้งคราว
ปริมาณกลูโคสที่ใช้ (กรัม)	17.36 ¹	23.61 ²	47.90
ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิต (กรัม)	8.40 ¹	24.96 ²	34.43
ปริมาณกลูโคสที่เหลือ (กรัม)	0.011 ¹	15.29 ²	3.62
เวลาการผลิต (ชั่วโมง)	16 ¹	24 ²	64
ปริมาณเซลล์เริ่มต้น (กรัม)	1.48 ¹	1.26 ²	1.46
ผลได้ของกรดแลกติก (กรัม/กรัม)	0.48 ¹	1.06 ²	0.72
อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (กรัม/กรัม ชั่วโมง)	0.73 ¹	0.78 ²	0.51
อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (กรัม/กรัม ชั่วโมง)	0.36 ¹	0.83 ²	0.37
อัตราการใช้กลูโคส (กรัม/ชั่วโมง)	1.09 ¹	0.98 ²	0.75
อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (กรัม/ชั่วโมง)	0.53 ¹	1.04 ²	0.54

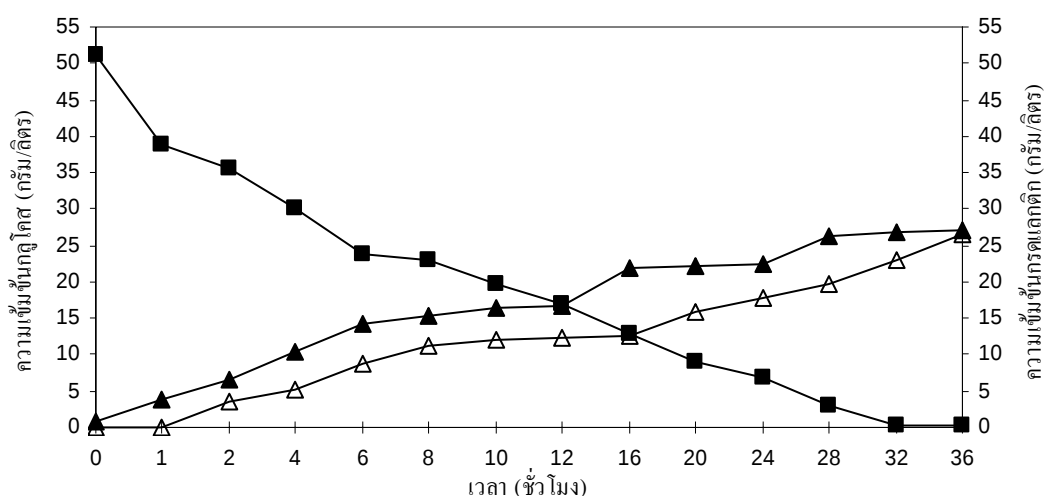
หมายเหตุ ¹ และ ² คือ ผลการทดลองที่ 3.1.2 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 23.54 และ 51.87 กรัม/ลิตร ณ เวลาของการผลิตที่ 16 และ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 22) ตามลำดับ

ผลเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์แพ็คเกจเวียนกลับน้ำหมักระหว่างการผลิตแบบเบ็ดเสร็จ และการผลิตแบบครั้งคราว แสดงดังตารางที่ 23 พิจารณาถึงปริมาณกรดแลกติกที่ได้ในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 23.54 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณต่ำกว่าการผลิตแบบครั้งคราวในชั่วโมงที่ 64 เท่ากับ 8.40 และ 34.43 กรัม ตามลำดับ เนื่องจากการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้สูงกว่าการผลิตแบบเบ็ดเสร็จที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่ำประมาณ 3 เท่า จึงทำให้ผลได้ของกรดแลกติกของการผลิตแบบครั้งคราวมีค่าสูงกว่าการผลิตแบบเบ็ดเสร็จที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่ำเท่ากับ 0.72 และ 0.48 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส ตามลำดับ ส่วนอัตราจำเพาะการใช้กลูโคส อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแลกติก อัตราการใช้กลูโคส และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิง-

ปริมาตร มีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องเวลาในการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวนานกว่าแบบเบ็ดเสร็จ เมื่อพิจารณาถึงเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 51.87 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 24 และการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวในชั่วโมงที่ 64 พบว่า ปริมาณกรดแลกติกของการผลิตแบบครั้งคราวสูงกว่าการผลิตแบบเบ็ดเสร็จที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นสูงเท่ากับ 33.43 และ 24.96 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เนื่องจากการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวใช้ปริมาณกลูโคสสูงกว่าการผลิตแบบเบ็ดเสร็จที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นสูงประมาณ 2 เท่ากับ แต่ผลได้ของกรดแลกติกในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นสูงมีค่าสูงกว่าการผลิตแบบครั้งคราวเท่ากับ 1.06 และ 0.72 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส เนื่องจากการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นสูงสามารถเปลี่ยนกลูโคสที่ใช้ไปเป็นกรดแลกติกได้มากกว่าการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราว จึงทำให้อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแลกติก อัตราการใช้กลูโคส และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 51.87 กรัม/ลิตร มีค่าสูงกว่าการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวเท่ากับ 0.78 กรัมกลูโคส/กรัมเซลล์ ชั่วโมง 0.83 กรัมกรดแลกติก/กรัมเซลล์ 0.98 กรัมกลูโคส/ชั่วโมง และ 1.04 กรัมกรดแลกติก/ชั่วโมง ตามลำดับ

3.3 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จในถังปฏิกรณ์แบบแฟ็กเบดเซลล์ตรึงด้วยระบบแยกกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จในถังปฏิกรณ์แบบแฟ็กเบดเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 โดยระบบแยกกรดแลกติกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ (ภาคผนวก ข: ข้อมูลและรายละเอียดคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ) ด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคสเท่ากับ 51.14 กรัม/ลิตร ภายใต้สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบ/นาที และพีเอชในการผลิตเท่ากับ 5.7 แสดงผลดังภาพที่ 38 และตารางที่ 24



ภาพที่ 38 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึงด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 51.14 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ■, ▲ และ △ ความเข้มข้นกลูโคส กรดแลกติกในถังพัก และกรดแลกติกที่แยกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ ตามลำดับ)

เมื่อเริ่มการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ แพ็กเบดที่มีระบบแยกกรดแลกติก ดังแสดงในภาพที่ 38 เมื่อเริ่มการผลิตกรดแลกติกภายในเวลา 32 ชั่วโมง ความเข้มข้นกลูโคสมีการลดลงอย่างรวดเร็วจนหมด ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตของกรดแลกติก คือ มีการผลิตกรดแลกติกอย่างรวดเร็วจนกระทั่งคงที่ โดยในเวลากการผลิตที่ 32 ชั่วโมง มีความเข้มข้นกรดแลกติกเท่ากับ 27.16 กรัม/ลิตร คิดเป็นปริมาณกรดแลกติก 20.37 กรัม โดยมีปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 38.10 กรัม ส่วนปริมาณกรดแลกติกที่ออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ พบว่า ใน 1 ชั่วโมง มีปริมาณกรดแลกติกเพียงเล็กน้อย หลังจากชั่วโมงที่ 1 ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้น จนกระทั่งสิ้นสุดการผลิตที่ 32 ชั่วโมง มีปริมาณกรดแลกติกใกล้เคียงกับในน้ำหมัก คือ 26.48 กรัม/ลิตร เมื่อแยกกรดแลกติกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล และปริมาตรที่ชะทั้งหมดเท่ากับ 1,103 มิลลิลิตร มีปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 16.13 กรัม (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางภาคผนวกที่ ก11 และภาพผนวกที่ ก1 ตามลำดับ) ดังนั้นปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการผลิตทั้งหมดเท่ากับปริมาณกรดแลกติกในน้ำหมักรวมกับปริมาณกรดแลกติกที่ชะจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุเท่ากับ 36.50 กรัม ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก11

เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ พบว่ามีประสิทธิภาพลดลง โดยมีปริมาณกรดแลกติกที่ออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุมีปริมาณสูงตั้งแต่ในชั่วโมงแรก เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการผลิต คือ อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มีองค์ประกอบที่สามารถแตกตัวให้ประจุลบ ได้แก่ SO_4^{2-} , PO_4^{3-} และ $\text{H}_3\text{P}_3\text{O}_{10}^{-2}$ เช่นเดียวกับกรดแลกติก อาจทำให้ประจุลบดังกล่าวแลกเปลี่ยนกับประจุบวกของเรซิน แทนที่จะเป็นเพียงกรดแลกติกเท่านั้น จึงทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ในการแยกกรดแลกติกลดลง

เมื่อเปรียบเทียบจนผลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์แฟกเบคที่มีระบบแยกกรดแลกติก (ภาพที่ 38) และไม่มีระบบแยกกรดแลกติกจากผลการทดลองที่ 3.1.2 ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 51.87 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 33) ได้ผลดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 เปรียบเทียบผลการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์แฟกเบคที่มี และ ไม่มีระบบแยกกรดแลกติกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ

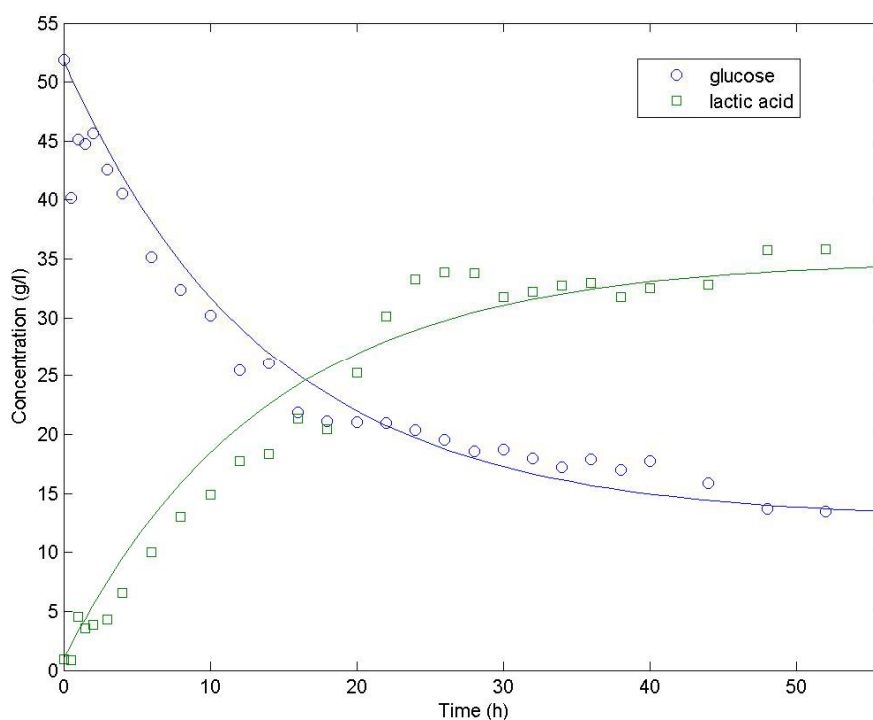
พารามิเตอร์	ไม่มีระบบแยกกรดแลกติก	มีระบบแยกกรดแลกติก
ปริมาณกลูโคสที่ใช้ (กรัม)	29.14	38.10
ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตในน้ำหมัก (กรัม)	26.48	20.37
ปริมาณกรดแลกติกที่แยกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ (กรัม)	-	16.13
ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตทั้งหมด (กรัม)	26.48	36.50
ปริมาณกลูโคสที่เหลือ (กรัม)	9.77	0.29
เวลาการผลิต (ชั่วโมง)	56	32
ปริมาณเซลล์เริ่มต้น (กรัม)	1.26	1.37
ผลได้ของกรดแลกติก (กรัม/กรัม)	0.909	0.958
อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (ชั่วโมง ⁻¹)	0.771	0.868
อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (ชั่วโมง ⁻¹)	0.375	0.831
อัตราการใช้กลูโคส (กรัม/ชั่วโมง)	0.971	1.191
อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (กรัม/ชั่วโมง)	0.473	1.141

สรุปการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ระหว่างการผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์แฟ็กเบดที่มี และไม่มีระบบแยกกรดแลกติกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ แสดงดังตารางที่ 24 พบว่า เวลาที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกที่มีระบบแยกกรดแลกติกใช้เวลาลดลงประมาณ 1.6 เท่าของระบบที่ไม่มีการแยกกรดแลกติก ในระบบที่มีการแยกกรดแลกติกสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้หมดในเวลา 32 ชั่วโมง โดยมีอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส และอัตราจำเพาะการใช้น้ำตาลกลูโคสสูงกว่า เมื่อพิจารณาปริมาณการผลิตกรดแลกติก พบว่า การใช้ระบบการแยกกรดแลกติกให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 36.50 กรัม ซึ่งสูงกว่าระบบที่ไม่มีการแยกกรดแลกติก ซึ่งมีปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 26.48 กรัม และระบบที่มีการแยกกรดแลกติกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ มีผลได้ของกรดแลกติก อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติกและอัตราการผลิตเชิงปริมาตร เท่ากับ 0.958 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส, 0.831 ชั่วโมง⁻¹ และ 1.141 กรัมกรดแลกติก/ชั่วโมง ตามลำดับ สูงกว่าระบบที่ไม่มีการแยกกรดแลกติก ซึ่งมีผลได้ อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก และอัตราการผลิตเชิงปริมาตรเท่ากับ 0.909 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส 0.375 ชั่วโมง⁻¹ และ 0.473 กรัมกรดแลกติก/ชั่วโมง ตามลำดับ

จากผลการทดลองที่ได้อธิบายข้างต้น จะเห็นได้ว่า การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแฟ็กเบดเวียนกลับน้ำหมักที่มีระบบแยกกรดแลกติก ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแฟ็กเบดเวียนกลับน้ำหมัก ในด้านของเวลาในการผลิตกรดแลกติกให้เร็วขึ้น และเพิ่มปริมาณกรดแลกติกสุดท้าย และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรมากขึ้น

4. การประมาณค่าพารามิเตอร์และการเลียนแบบการหมัก

จากการศึกษาการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์การผลิตกรดแลกติกจากกลูโคสด้วยเซลล์ตรึงแบบที่เรียกรวดแลกติก *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 แบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์แฟ็กเบด โดยอาศัยผลการทดลอง 3.1.1 ซึ่งมีอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมักเท่ากับ 250/750 ในการประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามสมการที่ 15 และ 31 ในภาคผนวก ง ซึ่งอธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติกในน้ำหมัก โดยวิธี Non-linear least square curve fit (Ordinary differential equation) ในโปรแกรม MATLABTM ในการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงตัวเลข และทำการประมาณค่าพารามิเตอร์ดังแสดงในตารางที่ 25 และภาพที่ 39



ภาพที่ 39 ผลการทดลองแสดงความเข้มข้นของกลูโคส (o) และกรดแลกติก (□) กับ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (เส้น) โดยมีอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเซลล์ตรึงและน้ำหมักเท่ากับ 250/750

ตารางที่ 25 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 แบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์แฟ็กเบด

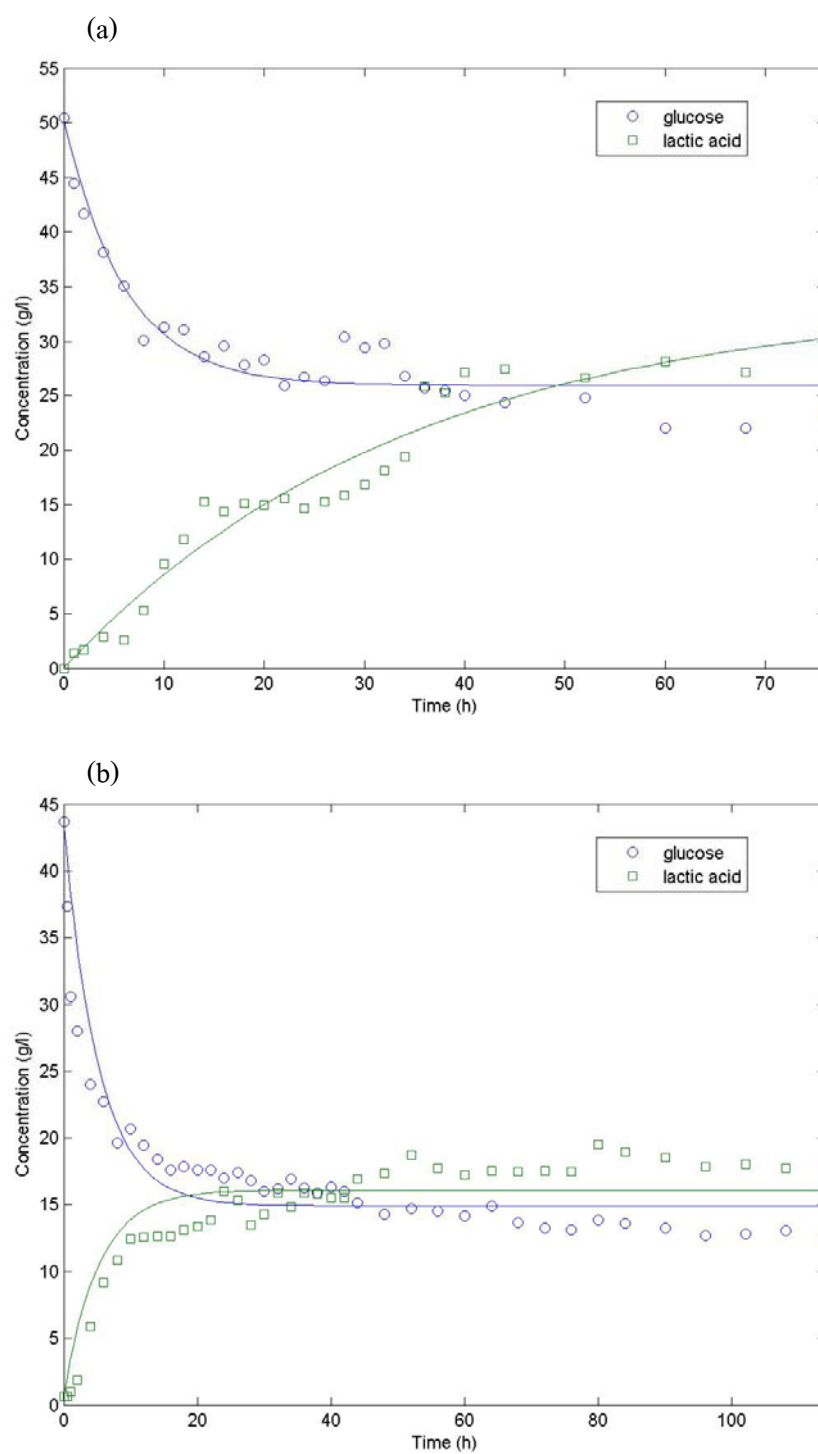
พารามิเตอร์	η_{glu}	q_{glu}^m (g g ⁻¹ h ⁻¹)	K_{glu} (g l ⁻¹)	C_{glu}^* (g l ⁻¹)	η_{lac}	q_{lac}^m (g g ⁻¹ h ⁻¹)	K_{lac} (g l ⁻¹)
อัตราส่วน V_B/V_M							
250/750 (0.33)	0.411	2.119	6.757	12.785	0.789	5.502	38.705

หมายเหตุ ดูคำอธิบายสัญลักษณ์ในภาคผนวก ง

การเปรียบเทียบผลการทดลองและค่าที่คำนวณได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ โดยอาศัยพารามิเตอร์ที่ประมาณได้ในตารางที่ 25 แสดงดังภาพที่ 39 พบว่ามีความสอดคล้องกัน แสดงว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นสามารถประยุกต์ใช้กับการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแฟ็กเบด โดยนิยามค่า effectiveness factor ของกลูโคส และกรดแลกติก

(η_{glu} และ η_{lac}) หมายถึง อัตราการใช้กลูโคสภายในเม็ดเจลไคโตซานต่ออัตราการใช้กลูโคสภายนอกเม็ดเจลไคโตซาน และอัตราการเกิดกรดแลกติกภายในเม็ดเจลไคโตซานต่ออัตราการเกิดกรดแลกติกภายนอกเม็ดเจลไคโตซาน กรณีที่การแพร่เกิดขึ้นได้ดี η จะมีค่าเข้าใกล้ 1 ถ้าหากมีผลของภาวะจำกัดของการแพร่หรือการแพร่เกิดขึ้นได้ไม่ดี ค่า η จะน้อยกว่า 1 จากค่าพารามิเตอร์ที่ประมาณค่าได้ในตารางที่ 25 จะเห็นว่าค่า η_{glu} และ η_{lac} มีค่าเท่ากับ 0.41 และ 0.79 ตามลำดับ ซึ่ง η_{glu} มีค่าต่ำกว่า η_{lac} แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนจำกัดของการแพร่มีผลต่ออัตราการใช้กลูโคสมากกว่าอัตราการเกิดกรดแลกติก และมีอัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_{glu}^m) และการเกิดกรดแลกติก (q_{lac}^m) สูงสุดเท่ากับ 2.12 และ 38.71 ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ และมีค่าคงที่ของการใช้กลูโคส (K_{glu}) และการเกิดกรดแลกติก (K_{lac}) เท่ากับ 6.76 และ 5.50 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยมีความเข้มข้นกลูโคส ณ จุดสมดุลเท่ากับ 12.79 กรัม/ลิตร

เมื่อนำค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการประมาณดังกล่าวนี้ซึ่งได้แก่ q_{glu}^m , K_{glu} , q_{lac}^m และ K_{lac} ตามลำดับ มาใช้ในการประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามสมการที่ 15 และ 30 ในภาคผนวก จ: การประมาณค่าพารามิเตอร์ด้วยโปรแกรม MATLAB™ โดยอาศัยผลการทดลอง 3.1.1 ซึ่งมีอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมักเท่ากับ 125/750 และ 500/750 เพื่อประมาณค่าพารามิเตอร์ η_{glu} , η_{lac} และ C_{glu}^* ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 26 และภาพที่ 40



ภาพที่ 40 ผลการทดลองแสดงความเข้มข้นของกลูโคส (o) และกรดแลกติก (□) กับ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (เส้น) โดยอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและปริมาณน้ำหมักเท่ากับ (a) 125/750 และ (b) 500/750

ตารางที่ 26 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 แบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์แพ็กเบด

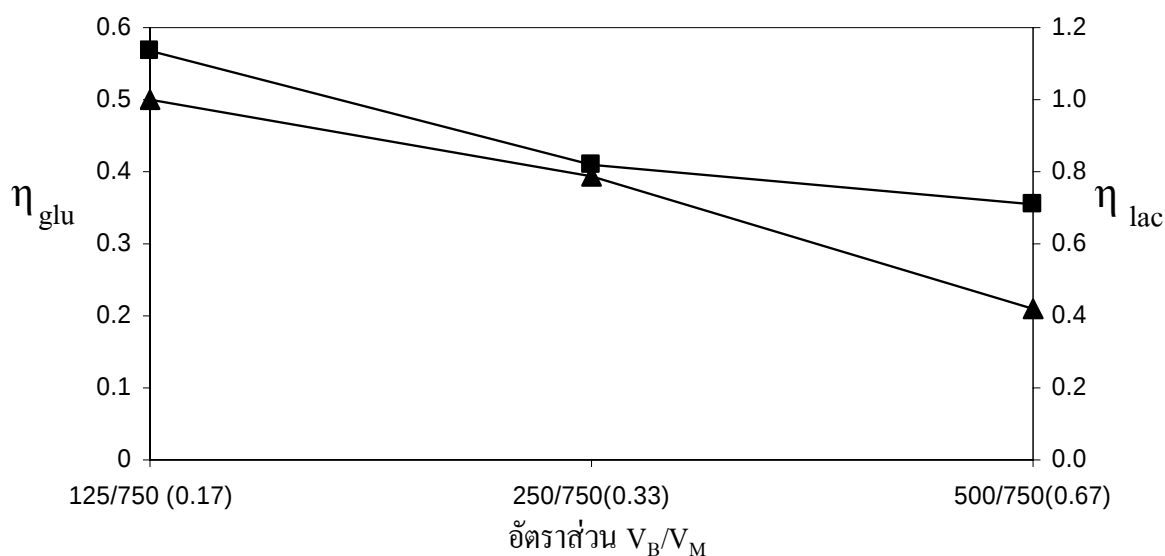
อัตราส่วน V_B/V_M \ พารามิเตอร์	η_{glu}	C_{glu}^* (g l ⁻¹)	η_{lac}
125/750 (0.17)	0.567	25.933	1.000
500/750(0.67)	0.354	14.894	0.419

การเปรียบเทียบผลการทดลองและค่าที่คำนวณได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ แสดงดังภาพที่ 40 และตารางที่ 26 พบว่า มีความสอดคล้องกันเป็นอย่างดี แสดงว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นสามารถประยุกต์ใช้กับการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 125/750 และ 500/750 โดยที่อัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 125/750 มีค่า η_{glu} และ η_{lac} มีค่าเท่ากับ 0.57 และ 1.00 ตามลำดับ และอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 500/750 มีค่า η_{glu} และ η_{lac} มีค่าเท่ากับ 0.35 และ 0.42 ตามลำดับ และเห็นได้ว่าในอัตราส่วนทั้ง 2 มีค่า η_{glu} มีค่าต่ำกว่า η_{lac} แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนจำกัดของการแพร่ที่มีผลต่ออัตราการใช้กลูโคสมากกว่าอัตราการเกิดกรดแลกติก

เมื่อนำค่า η_{glu} และ η_{lac} ที่ได้จากการประมาณค่ามาเปรียบเทียบ และเขียนกราฟความสัมพันธ์อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก กับค่า η_{glu} และ η_{lac} ตามลำดับ สรุปผลดังตารางที่ 27 และภาพที่ 41

ตารางที่ 27 สรุปผลการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดเวียนกลับน้ำหมัก

อัตราส่วน V_B/V_M \ พารามิเตอร์	η_{glu}	η_{lac}	C_{glu}^* (g l ⁻¹)
125/750 (0.17)	0.567	1.000	25.933
250/750(0.33)	0.411	0.789	12.785
500/750(0.67)	0.354	0.419	14.894



ภาพที่ 41 ค่า effectiveness factor (η) ของน้ำตาลกลูโคส (■) และกรดแลกติก (▲) ระหว่างอัตราส่วนต่าง ๆ ของปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและปริมาตรน้ำหมัก

เมื่อเปรียบเทียบค่า effectiveness factor (η) ของน้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติกระหว่างอัตราส่วนต่าง ๆ ของปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและปริมาตรน้ำหมัก (ภาพที่ 41 และตารางที่ 27) พบว่า ค่า η_{glu} ของอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและปริมาตรน้ำหมักทั้ง 3 อัตราส่วน มีค่าน้อยกว่าค่า η_{lac} แสดงให้เห็นชัดเจนว่าขั้นตอนจำกัดของการแพร่มีผลต่ออัตราการใช้กลูโคสมากกว่าอัตราการเกิดกรดแลกติก และเมื่ออัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมักเพิ่มขึ้น ค่า effectiveness factor (η) ของน้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติกมีค่าลดลงตามลำดับ แสดงว่าอัตราอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมักมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจ โดยการเพิ่มเม็ดเจลเซลล์จะทำให้เกิดข้อจำกัดของการแพร่เพิ่มขึ้น ส่วนค่าคงที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของกลูโคส (C_{glu}^*) ณ จุดสมดุลระหว่างภายนอกและภายในเม็ดเจลเซลล์ตรึงโคโคซานมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับค่า η_{glu} และ η_{lac} ที่ลดลง

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษากระบวนการผลิตกรดแลกติก เพื่อให้ได้กรดแลกติกความเข้มข้นสูง และช่วยเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ ซึ่งจากการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ การคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงระดับพลาสติกด้วยวิธีการทาทุชิ และการผลิตกรดแลกติกด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็คเกจ

โดยการคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกได้ทำการทดลองเพื่อหาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ช่วยเพิ่มปริมาณกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ ที่สำคัญคือ สามารถลดต้นทุนด้านวัตถุดิบลงจากอาหารสูตรดั้งเดิม คือ อาหาร MRS ซึ่งทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 5 สูตร โดยมีอาหาร MRS เป็นสูตรอ้างอิง และจึงนำมาเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติก พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ซึ่งประกอบด้วย (ต่อลิตร) น้ำตาลกลูโคส 10 กรัม ยีสต์สกัด 15 กรัม $MgSO_4$ 0.2 กรัม $MnSO_4$ 0.03 กรัม Sodium citrate 0.5 กรัม $FeSO_4$ 0.03 กรัม KH_2PO_4 2.5 กรัม NH_4Cl 5 กรัม และ H_2SO_4 0.015 มิลลิลิตร เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) , ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$), อัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) และการใช้น้ำตาลกลูโคส (glucose utilization) สูงสุดเท่ากับ 0.116 ชั่วโมง⁻¹ 0.85 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส 0.50 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง และ 92.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตร 5 มีความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 8.86 กรัม/ลิตร ซึ่งสูงกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ซึ่งเท่ากับ 7 กรัม/ลิตร

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงระดับพลาสติกด้วยวิธีการทาทุชิ ซึ่งปัจจัยที่ได้ศึกษามี 4 ปัจจัย คือ ปริมาตรเมล็ดเซลล์ตรึง ปริมาตรอาหาร พื้นที่เริ่มต้นของอาหาร และขนาดพลาสติก ได้ทำการทดลองแบบ $L_9(2^1 \times 3^3)$ มีทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง และพิจารณาถึงค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตคือ ความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ พบว่า เมื่อพิจารณาโดยอาศัยความเข้มข้นของกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ ได้สภาวะที่เหมาะสมสภาวะเดียวกัน คือ ปริมาตรเมล็ดเซลล์ตรึง 46.825 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 93.75 มิลลิลิตร พื้นที่เริ่มต้นของอาหาร 5.7 และ

ขนาดพลาสติก 500 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร เท่ากับ 5.56 กรัม/ลิตร 0.53 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส และ 0.93 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาโดยอาศัยผลได้ของกรดแลกติกได้สภาวะที่เหมาะสม คือ ปริมาตรเมล็ด เจลเซลล์ตรึง 15.625 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 281.125 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6.0 และ ขนาดพลาสติก 500 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร เท่ากับ 4.27 กรัม/ลิตร 0.80 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส และ 0.53 กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัยที่ศึกษามีอิทธิพลต่อความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการ ผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ยกเว้น ปริมาตรอาหาร ไม่มีอิทธิพลต่อผลได้ของกรดแลกติกในการผลิตกรดแลกติกแบบ เบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง โดยปริมาตรเมล็ดเจลเซลล์ตรึงมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ ตรึงมากที่สุด ดังนั้นในการเลือกสภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก ต้องคำนึงถึงความต้องการใน การผลิต โดยถ้าต้องการให้ได้กรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงเลือก สภาวะที่ได้จากความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร แต่ถ้าต้องการผลได้ของ กรดแลก- ดิกสูงก็ต้องเลือกสภาวะที่ได้จากผลได้ของกรดแลกติก

ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบด ได้แบ่งการศึกษา ออกเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก และได้ แบ่งออกอีกเป็น 2 การทดลอง คือ (1) ศึกษาผลของอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเมล็ดเจลเซลล์ตรึงและ น้ำหมัก (V_B/V_M) เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกให้ได้กรดแลกติก และอัตรา การผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรที่สูง พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ อัตราส่วนปริมาตรระหว่าง เมล็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมักเท่ากับ 250/750 โดยมีความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตกรดแลก- ดิกเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 33.28 กรัม/ลิตร 1.03 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส และ 1.35 กรัมกรด แลกติก/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ และ (2) ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส ที่มี ความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคสเท่ากับ 23.54 และ 51.87 กรัม/ลิตร โดยใช้อัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 พบว่า ในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ ตรึงแพ็กเบดที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส 23.54 กรัม/ลิตร ใช้เวลาในการผลิตเร็วกว่า ประมาณ 2 เท่า และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมด โดยมีความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิต กรดแลกติกเชิงปริมาตรเท่ากับ 18.55 กรัม/ลิตร 0.77 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส 0.60 กรัมกรด แลกติก/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

การศึกษาส่วนที่ 2 เป็นการผลิตกรดแลกติกแบบครึ่งคราวเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์ เซลล์ตรึงแพ็กเบด ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 27.36 กรัม/ลิตร และอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสถูกใช้ไปเท่ากับ 47.90 กรัม ได้กรดแลกติก เท่ากับ 34.43 กรัม ทำให้มีผลได้ อัตราการใช้กลูโคส และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร เท่ากับ 0.719 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส 0.748 กรัมกลูโคส/ชั่วโมง และ 0.538 กรัมกรดแลกติก/ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบครึ่งคราวกับการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบด ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 51.87 กรัม/ลิตร พบว่า การผลิตกรดแลกติกแบบครึ่ง-คราวเวียนกลับน้ำหมักสามารถเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรเล็กน้อย แต่เพิ่มความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายให้สูงขึ้นประมาณ 2.5 เท่า

การศึกษาสุดท้ายเป็นการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยถังปฏิกรณ์ เซลล์ตรึงแพ็กเบดที่มีระบบแยกกรดแลกติกโดยใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ เพื่อลดภาวะยับยั้งโดยกรดแลกติกที่ผลิตได้ โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคสเท่ากับ 51.14 กรัม/ลิตร พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปเท่ากับ 38.10 กรัม และได้กรดแลกติกเท่ากับ 36.50 กรัม โดยมีผลได้ อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร และอัตราการใช้กลูโคสเท่ากับ 0.958 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส 1.141 กรัมกรดแลกติก/ชั่วโมง และ 1.191 กรัมกลูโคส/ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกนี้กับการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักที่ไม่มีระบบแยกกรดแลกติก ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากัน พบว่า การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จที่มีระบบแยกกรดสามารถลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสสุดท้ายได้ จึงทำให้อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น และลดเวลาในการผลิตลงประมาณ 1.6 เท่า นอกจากนี้การผลิตที่มีระบบแยกกรดแลกติกยังช่วยเพิ่มปริมาณกรดแลกติกสุดท้ายได้เท่ากับ 36.50 กรัม จากปริมาตรน้ำหมัก 750 มิลลิลิตร ทำให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรเพิ่มขึ้นเป็น 1.191 กรัมกรดแลกติก/ชั่วโมง

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นสามารถประยุกต์ใช้กับการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดด้วยอัตราส่วน ปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและปริมาตรน้ำหมักเท่ากับ 125/750 250/750 และ 500/750 ตามลำดับ โดยพบว่า ค่า η_{glu} ของอัตราส่วน V_B/V_M ทั้ง 3 มีค่าน้อยกว่าค่า η_{lac} ของอัตราส่วนทั้ง 3 แสดงการจำกัดของการแพร่ที่มีผลต่ออัตราการใช้กลูโคสมากกว่าอัตราการเกิดกรดแลกติก และเมื่อเพิ่มอัตราส่วน V_B/V_M ค่า effectiveness factor (η) ของน้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติกมีค่าลดลง แสดงว่าการเพิ่มอัตราส่วน

ปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ครึ่งและน้ำหมักจะทำให้เกิดการจำกัดของการแพร่เพิ่มขึ้น โดยพบว่า อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ครึ่งและน้ำหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 250/750

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากเม็ดเจลเซลล์ครึ่งโกลโทซานที่เตรียมได้ยังมีความแข็งแรงไม่เพียงพอต่อการการนำไปใช้ซ้ำในการผลิตที่ใช้ระยะเวลายาวนาน ดังนั้นจึงควรปรับปรุงขั้นตอนการเตรียมเม็ดเจลเซลล์ครึ่ง และคอลัมน์เซลล์ครึ่ง เพื่อใช้ในการผลิตกรดแลกติกอย่างต่อเนื่องที่มีเวลาในการใช้งานได้นานขึ้น

และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของการเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส เพื่อสนับสนุนการเพิ่มความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้าย และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร นอกจากนี้ควรมีการศึกษาถึงกระบวนการผลิตกรดแลกติกที่บูรณาการระบบแยกกรดแลกติก เพื่อลดภาวะยับยั้งจากความเข้มข้นสูงของกรดแลกติก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกให้สูงขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เกสร กิตติคุณธรรม. 2545. การผลิตกรดแลกติกด้วยการหมักแบบต่อเนื่องที่มีระบบหมุนเวียนเซลล์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ดิยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์. 2549. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ *Lactococcus lactis* IO-1 โดยวิธี Taguchi. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มนัส สัจจวิเศษ และ วรรณ ภัทรอมรกุล. 2543. คู่มือการใช้งาน MATLAB ฉบับสมบูรณ์ สำนักพิมพ์ อินโฟเพรส, นนทบุรี.
- มีชัย ถัดดี. 2546. การผลิตกรดแลกติกด้วยการหมักแบบต่อเนื่องสองขั้นตอน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภาวณี คณาสวัสดิ์. 2531. การตรึงเอนไซม์และเซลล์. ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศิวพร ศิวเวช. 2535. วัตถุเจือปนอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 328 น.
- สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล. 2544. การผลิตกรดแลกติกในอุตสาหกรรม. ส่งเสริมเทคโนโลยี. 158: 88-94.
- _____. 2547. เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- สมใจ ภัสตั๊ตยางกูร. 2527. การศึกษาวิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์และการนำไปปรับใช้ในการผลิตสารเมตาบอไลต์จากแบคทีเรียโปรปีโอนิก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อาบชัย รัชญอุตร. 2542. การผลิตกรดโปรปีโอนิกโดยระบบการตรึงเซลล์จาก *Propionibacterium Jensenit* KU 0001 ที่แยกจากอาหารหมักไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรพิน ภูมิภมร. 2523. เอกสารประกอบการสอนวิชา วทอ. 461 ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหมัก. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Abbott, J. B. 1977. Immobilized cells, p. 257. *cited by* D. Perlman. **Annual Reports on Fermentation Process.** Vol. 1. Academic Press, Inc., New York. 568 p.
- Aeschlimann, A and U. von Stockar. 1991. Continuous production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus* in a cell-recycle reactor. **Enzyme Microb. Technol.** 13(10): 811-816.
- Akerberg, C., K. Hofvendahl, G. Zacchi and B. Hahn-Hagerdal. 1998. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 49: 682-690.
- Andre, C. D. M. and B. E. Willem. 2004. Encapsulated crystalline lactic acid. **U.S. Pat. No. 115315.**
- Barker, S.B. and W.H. Summerson. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological materials. **J. Biol. Chem.** 138: 535-534.

- Berry, A. R., C.M.M. Franco, W. Zhang and A. P. J. Middelberg. 1999. Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in defined medium. **Biotechnol. Lett.** 21: 163-167.
- Bong, C. G., K. G. Won, O. Y. Hui, S. U. Chang and S. S. Gi. 2003. Improved NURUK (Malted Rice) containing active dried-yeasts and encapsulated lactic acid bacteria and method for manufacturing traditional rice wine using the same. **K.R. Pat. No. 085954.**
- Box, G., S. Bisgaard and C. Fung. 1988. An explanation and critique of Taguchi's contributions to quality engineering. **Qual. Reliab. Eng. Int.** 4: 123-131.
- Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Bucke, C. 1982. Immobilized cells, p. 49. *cited by* UNESCO Workshop on Immobilized **Microbial Enzymes and Cells.** 13-17 December 1982. Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- _____. 1987. Cell Immobilization in Calcium Alginate. **Method in Enzymology.** Vol. 135. Academic Press, Inc., New York. 1270 p.
- Cheetham, P.S.J. 1980. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology.** Vol. 4. New York: Academic Press, Inc.
- Cheetham, P. S. J, K. W. Blunt and B. Christopher. 1979. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 215-216.
- Chibata, I., T. Tosa and T. Sato. 1974. Immobilized aspartase-containing microbial cells: preparation and enzymatic properties. **Appl. Microbiol.** 27: 878-885.

- Eiji, S., O. Eiji, C. Iida, Y. Furubayashi and A. Sakimae. 1995. Production of D-lactic acid and L-lactamide. **Jpn. Pat. No. 7327693**.
- Elezi, O., Y. Kourkoutas, A. A. Koutinas, M. Kanellaki, E. Bezirtoglou, Y. A. Barnett and P. Nigam. 2003. Food additive lactic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus brevis* on delignified cellulosic material. **J. Agric. Food Chem.** 51(18): 5285-9.
- Freeman, A. and B. Shemen. 1996. Method for entrapment of active materials in chitosan. **U.S. Pat. No. 5489401**.
- Freeman, A. and Y. Dror. 1994. Immobilization of “disguised” yeast in chemically crosslinked chitosan beads. **Biotechnol. Bioeng.** 44: 1083-1088.
- Garde, A., G. Jonsson., A. S. Schmidt and B. K. Ahring. 2002. Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. **Biores. Technol.** 81: 217-223.
- Gilson, C. D. and A. Thomas. 1995. Calcium alginate bead manufacture with and without immobilized yeast drop formation at two-nozzle. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 62: 227-232.
- Gonçalves, L. M. D., A. Ramos., J. S. Almeida., A. M. R. B. Xavier and M. J. T. Carrondo. 1997. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and product in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 346-350.
- Gonçalves, L. M. D., M. T. O. Barreto, A. M. B. R. Xavier, M. J. T. Carrondo and J. Klein. 1992. Inert supports for lactic acid fermentation - a technological assessment. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38: 305-311.

- Gonçalves, L. M. D., J. S. Almeida, A. M. B. R. Xavier and M. J. T. Carrondo. 1991. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. **Enzyme Microb. Technol.** 13: 314-319.
- Heikki, L., P. S. W. Jacobus, V. T. Tapio and H. R. Charles. 1994. Bioreactor with immobilized lactic acid bacteria and the use thereof. **Z.A. Pat. No. 9308823.**
- Hiroaki, H. and K. Keiichi. 1985. Production by immobilized microorganism. **Jpn. Pat. No. 60006196.**
- Hofvendahl, K., C. Akerberg, G. Zacchi and B. Hahn-Hagerdal. 1999. Simultaneous enzymatic wheat starch saccharification and fermentation to lactic acid by *Lactococcus lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 52: 163-169.
- Ishizaki, A., C. Nolasco-Hipolito, G. Kobayashi and K. Sonomoto. 1999. Continuous L-lactic production using *Lactococcus lactis* IO-1 from hydrolyzed sago starch, pp. 49-59. **In Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics.** Vol. 14, Joint Seminar November 22-24, Peenang, Malaysia.
- Ishizaki, A. 2001. Sago plam, the high potential bioresource for green chemistry, alternative to petrochemical industry, pp. 154-160. **In Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics Vol. 15, JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC Joint Seminar.** November 7-9. Bangkok, Thailand.
- Jack, T. R. and J. E. Zajik. 1977. The enzymatic conversion of L-histidine to urocanic acid by whole cells of *Micrococcus luteus* immobilized on carbodiimide carboxymethylcellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 19: 631-648.
- Kennedy, J. F., S. A. Barker and I. D. Humphries. 1976. Microbial cells living immobilized on metal hydroxides. **Nature.** 261: 242-244.

- Koshcheenko, K. A. 1981. Living immobilized cells as biocatalysts of transformation and biosynthesis of organic compounds. **Appl. Biochem. Microbiol.** 17: 351-365
- Kourkoutas Y., V. Xolias, M. Kallis, E. Bezirtzoglou and M. Kanellaki. 2005. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochem.** 40: 411-416.
- Kwon, S., P. C. Lee, E. G. Lee, Y. K. Chang and N. Chang. 2000. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Enzyme Microbiol. Technol.** 26: 209-215.
- Kwon, S., I. K. Yoo, W. G. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang. 2001. High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.** 73(1): 25-34.
- Laopaiboon, L. and P. Laopaiboon. 2003. Effect of Aeration on Xylose Fermentation in batch culture by *Lactococcus lactis* IO-1. **KKU Res. J.** 8(1): Jan – Jun.
- Lochner, R. H. and J. E. Matar. 1990. **Designing for Quality**. Chapman and Hall, UK.
- Madhav, S. P. 1989. Quality engineering using robust design. **AT&T Bell Laboratories.** 67-68.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- Moldes, A.B., J.L. Alonso and J.C. Parj6. 2003. Recovery of lactic acid from simultaneous saccharification and fermentation media using anion exchange resins. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 25: 357-363.

- Nagarjun, P. A., R. S. Rao, S. Rajesham and L. V. Rao. 2005. Optimization of lactic acid production in SSF by *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 using Taguchi methodology. **J. Microb.** 43(1): 38-43.
- Narayanan N., P. K. Roychoudhury and A. Srivastava. 2004. Isolation of adh mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L(+) Lactic acid. **Biotechnol. Ind. Microb. Biotechnol.** 7(1): 64-72.
- Navarro, J. M. and G. Durand. 1977. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 4: 243-254. In Bucke, C. 1982. **Immobilized Cells.** In UNESCO workshop on immobilized microbial enzymes and cells, 13-17 December 1982. Mahidol University. Bangkok, Thailand.
- Nolasco-Hipolito C., T. Matsunaka, G. Kobayashi, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2002. Synchronized fresh cell bioreactor system for continuous L-(+)-lactic acid production using *Lactococcus lactis* IO-1 in hydrolysed sago starch. **J. Biosci. Bioeng.** 93(3): 281-287.
- Olivira, E. A. and A. R. Costa. 1994. L-Malic acid production by entrapped *Saccharomyces cerevisiae* into polyacrylamide gel beads. **Appl. Biochem.** 47: 65-69.
- Pena, C., N. Compos and E. Galindo. 1997. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 510-515.
- Roy, R. K. 2001. Design of experiments using the Taguchi approach. John Wiley & Sons, Inc.
- Rivas, B., A. B. Moldes., J. M. Dominguez and C. P. Juan. 2004. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **J. Food Microbiotechnol.** 97: 93-98.

Shuler, M. L. and F. Kargi. 2002. **Bioprocess Engineering**. Prentice Hall, Inc., USA.

Siebold, M., P. V. Frieling, R. Joppien, D. Joppien, K. Schugerl and H. Roper. 1995.

Comparison of the production of lactic acid by three different *Lactobacilli* and its recovery by extraction and electrodiagnosis. **Process Biochem.** 30: 81-95.

Sirisansaneeyakul, S., C. N. Hipolito, G. Kobayashi, K. Sonomoto, S. Lertsiri, P. Luangpituksa, S. Varavinit and A. Ishizaki. 1998. Kinetic modeling of lactic acid fermentation from sago starch using *Lactococcus lactis* IO-1. **The Annual Reports of ICBiotech.** 21: 504-524.

Sirisansaneeyakul, S., K. Kittikusolthum, M. Luddee, W. Vanichsriratana and A. Ishizaki.

2003. Continuous production of lactic acid using *Lactococcus lactis* IO-1. **Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2003, Brisbane, Australia.**

Sirisansaneeyakul, S., M. Luddee, K. Kittikusolthum and W. Vanichsriratana. 2004. Process

Development for lactic acid production from cassava starch. **International Symposium on Multilateral Cooperation in Agricultural Biotechnology Exchange in Pan-Pacific Area, NPUST, Nov. 7-10, Kaohsiung, Taiwan.**

Sirisansaneeyakul, S., P. Mekvichitsaeng, K. Kittikusolthum, S. Pattaragulwanit, M. Luddee, S.

Bhuwathanapun and A. Ishizaki. 2000. Lactic acid production from starch hydrolysates using *Lactococcus lactis* IO-1. **Thai J. Agric. Sci.** 33(1-2): 53-64.

Speirs, E. D., P. J. Halling and B. McNeil. 1995. The importance of bead size measurement in

mass-transfer modeling with immobilized cells. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47: 440-444.

- Tay, A. and S. T. Yang. 2002. Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.** 80: 1-12.
- Tejayadi, S. and M. Cheryan. 1995. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43: 242-248.
- Téllez-luis, S. J., A. B. Moldes, M. Vázquez, J. L. Alonso. 2003. Alternative Media for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* NRRL B-445. **Food Bioprod. Process.** 81: 1744-3571.
- Thongchul, N. and S. T. Yang. 2004. Lactic acid production by immobilized *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Eng. Chem.** 246p.
- Tochampa, W. 2004. **Matlab Tutorial & Applications in Biotechnology.** Naresuan University. (Unpublished manuscript)
- Vickroy, T. B. 1985. Lactic acid, pp. 761-774. In M. Moo-young, ed. **Comprehensive Biotechnology : The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine.** Vol. 3, The Practice of biotechnology-Bulk Commodity Products. Pergamon Press. New York.
- Vorlop, K. D. and J. Klein. 1987. Entrapment of microbial cells in chitosan. **Method. Enzymol.** 135: 259-268.
- Xavier, A. M. R. B., L. M. D. Gonçalves, J. L. Moreira, and M. J. Carrondo. 1995. Operational patterns affecting lactic acid production in ultrafiltration cell recycle bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.** 45: 320-327.

Yong-Sup, S., B. Byung-Hak, and L. Jun-Kyu. 2002. Yogurt with encapsulated lactic acid bacteria and method for producing same. **T.W. Pat. No. 501913B.**

_____. 2002. Liquid yogurt with encapsulated lactic acid bacteria and method for producing the same. **U.S. Pat. No. 6447823.**

Youssef, C. B., V. Guillou and A. Olmos-Dichara. 2000. Modelling and adaptive control strategy in lactic acid fermentation process. **Cont. Eng. Pract.** 8: 1297-1307.

Zenovich, S. M. 2003. Method for obtaining food, predominantly, lactic acid production (variants). **R.U. Pat. No. 2213460.**

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ก1 น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติกกับเวลาที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 5 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)					ความเข้มข้นกลูโคส ¹ (กรัม/ลิตร)					ความเข้มข้นกรดแลกติก ² (กรัม/ลิตร)				
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5
0	0.60	0.70	0.86	1.00	1.13	9.48	11.38	9.90	9.64	10.59	0.04	0.74	0.37	0.44	0.54
1	0.58	0.72	0.86	1.02	1.24	9.43	11.02	9.83	9.69	9.39	0.09	0.85	0.27	0.48	1.52
2	0.74	0.80	0.88	0.94	1.63	8.78	10.57	9.10	9.53	7.74	2.16	0.97	0.92	0.56	3.33
4	0.92	1.10	1.10	1.18	1.39	8.48	9.79	8.63	9.09	6.57	3.60	1.79	1.21	0.88	4.25
6	1.00	1.36	1.36	1.00	1.61	7.69	8.41	7.71	8.83	5.33	3.65	3.90	1.86	0.98	5.97
8	1.02	1.56	1.66	1.04	1.97	7.06	6.73	6.61	8.33	3.69	4.45	4.88	2.38	1.86	6.58
10	1.02	1.82	1.80	1.12	2.56	6.03	5.43	5.29	7.62	2.10	4.53	6.02	3.78	2.42	7.78
12	1.06	1.88	1.84	1.18	2.94	5.81	4.12	4.20	7.42	1.44	4.80	6.06	3.57	2.60	8.02
14	1.08	2.08	2.06	1.28	3.06	5.26	3.19	3.19	6.26	1.38	4.98	7.74	5.66	3.56	8.34
16	1.14	2.14	2.04	1.28	3.10	5.07	2.22	2.36	6.11	1.36	5.42	7.57	6.20	3.89	8.74
18	1.14	2.14	1.96	1.32	3.06	4.71	1.38	1.45	5.61	0.99	5.69	7.62	6.84	4.50	8.79
20	1.10	2.14	2.02	1.40	2.93	4.37	0.86	1.03	5.21	0.92	7.03	7.25	6.58	4.39	8.81
22	1.58	2.76	2.54	1.76	2.91	4.11	0.81	0.71	5.12	0.94	6.89	7.57	6.86	5.31	8.86

หมายเหตุ ¹ คำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ก: ภาคผนวกที่ ก1)

² คำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร และความเข้มข้นของกรดแลกติก (ภาคผนวก ก: ภาคผนวกที่ ก2)

ตารางผนวกที่ ก2 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ดรีง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ ครั้งที่ 1

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัม/ลิตร)									ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัม/ลิตร)								
	ชุดการทดลอง																	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0	10.747	10.716	10.976	11.184	10.822	10.896	11.027	10.770	10.346	0.405	0.423	0.421	0.589	0.375	0.375	0.344	0.513	0.382
1	8.423	9.519	10.131	6.855	8.600	9.182	6.001	7.794	9.106	1.453	0.515	0.613	1.950	0.766	0.780	1.642	1.290	0.678
2	7.345	9.034	9.008	5.178	7.736	8.126	4.808	6.115	8.442	2.300	1.729	0.785	3.403	1.314	0.704	2.721	2.419	1.703
3	5.776	8.154	8.977	3.428	6.224	7.407	3.436	3.997	6.875	3.882	1.858	1.666	5.078	2.924	1.658	3.018	3.988	2.849
4	5.079	7.966	8.678	2.411	5.504	6.741	2.745	3.367	5.769	4.654	2.484	1.781	5.335	3.206	2.236	3.862	4.207	4.014
5	4.589	7.550	8.647	1.960	4.876	6.494	2.357	2.108	5.356	4.673	2.649	1.991	5.905	3.127	2.377	3.894	5.629	4.656
6	4.393	7.629	8.606	1.730	4.506	6.125	2.139	1.574	4.942	5.464	2.796	2.049	5.519	3.159	2.080	4.175	5.776	5.126
7	4.118	7.362	8.461	1.289	4.403	6.033	1.808	1.078	4.587	4.894	2.907	2.125	5.556	3.425	2.393	4.848	5.131	4.900
8	3.893	7.134	8.255	1.111	4.043	5.910	1.704	0.763	4.394	4.562	3.072	2.106	6.457	3.581	2.690	4.769	7.154	5.126

ตารางผนวกที่ 3 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ดริ้ง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ ครั้งที่ 2

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัม/ลิตร)									ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัม/ลิตร)								
	ชุดการทดลอง																	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0	10.720	10.708	10.870	11.158	10.802	10.988	11.141	10.740	10.874	0.450	0.320	0.400	0.541	0.398	0.313	0.334	0.657	0.388
1	8.405	9.309	10.115	6.836	8.655	9.358	6.564	7.911	9.445	1.446	0.534	0.549	1.985	0.859	0.658	1.558	1.426	0.795
2	6.809	8.521	9.519	4.733	7.041	7.899	5.007	6.383	8.548	2.971	1.380	0.797	3.302	1.002	0.872	2.783	2.890	1.509
3	5.815	7.999	8.725	2.031	6.219	7.507	3.512	4.602	6.872	3.616	2.060	1.328	4.781	1.702	1.728	3.578	4.466	2.346
4	4.623	7.773	8.662	2.124	5.182	6.601	2.683	2.751	5.541	4.652	2.520	1.770	5.323	2.656	1.959	3.976	4.372	3.855
5	4.470	7.487	8.652	1.949	4.894	6.551	2.314	1.880	5.353	5.063	2.631	1.947	5.936	2.735	2.288	4.166	4.841	4.385
6	4.394	7.546	8.454	1.701	4.552	6.158	2.212	1.518	5.018	5.453	2.686	2.036	5.864	3.149	2.304	4.373	5.085	5.140
7	4.033	7.339	8.401	1.268	4.349	6.047	1.946	1.165	4.604	5.043	2.888	2.107	6.225	3.339	2.337	4.834	6.568	5.079
8	3.880	7.122	8.245	1.083	4.018	5.997	1.823	0.734	4.920	4.554	3.054	2.089	6.405	3.610	2.634	4.755	7.299	5.140

ตารางผนวกที่ ก4 การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863
ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ จาก
ความเข้มข้น และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	น้ำตาลกลูโคส	กรดแลกติก
0	11.386	0.005
1	5.663	1.070
2	3.621	1.387
3	1.683	4.213
4	0.913	4.598
5	0.942	4.775
6	0.918	5.561
7	0.908	5.095
8	0.923	5.024

ตารางผนวกที่ ก5 การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863
ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ จาก
ผลได้ของกรดแลกติก

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	น้ำตาลกลูโคส	กรดแลกติก
0	10.576	0.023
1	9.490	0.047
2	9.013	0.441
3	8.332	1.342
4	7.525	1.580
5	6.895	2.605
6	6.411	3.334
7	5.616	3.745
8	5.280	4.273

ตารางผนวกที่ ก6 การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 (อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึง และ น้ำหมัก เท่ากับ 125/750)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)		เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	น้ำตาลกลูโคส	กรดแลกติก		น้ำตาลกลูโคส	กรดแลกติก
0	50.46	0.00	24	26.75	14.68
1	44.43	1.36	26	26.34	15.28
2	41.70	1.66	28	30.46	15.85
4	38.14	2.88	30	29.43	16.82
6	35.05	2.57	32	29.84	18.12
8	30.10	5.30	34	26.80	19.41
10	31.34	9.53	36	25.72	25.88
12	31.08	11.80	38	25.46	25.24
14	28.61	15.28	40	25.05	27.18
16	29.58	14.38	44	24.33	27.50
18	27.88	15.13	52	24.79	26.69
20	28.30	14.98	60	22.06	28.15
22	25.93	15.59	68	22.01	27.18
			76	23.09	30.09

ตารางผนวกที่ ก7 การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 (อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึง และ น้ำหมัก เท่ากับ 250/750)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)		เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	น้ำตาลกลูโคส	กรดแลกติก		น้ำตาลกลูโคส	กรดแลกติก
0	51.87	0.96	22	20.95	30.09
0.5	40.18	0.90	24	20.39	33.28
1	45.10	4.54	26	19.55	33.86
1.5	44.79	3.58	28	18.55	33.79
2	45.69	3.90	30	18.71	31.81
3	42.56	4.35	32	17.99	32.19
4	40.55	6.59	34	17.25	32.77
6	35.15	9.98	36	17.88	32.97
8	32.40	12.99	38	17.03	31.81
10	30.17	14.91	40	17.76	32.55
12	25.46	17.78	44	15.84	32.84
14	26.05	18.36	48	13.71	35.77
16	21.86	21.34	52	13.44	35.85
18	21.12	20.41	56	13.02	36.26
20	21.02	25.27			

ตารางผนวกที่ ๓8 การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 (อัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึง และ น้ำหมัก เท่ากับ 500/750)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)		เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	น้ำตาลกลูโคส	กรดแลกติก		น้ำตาลกลูโคส	กรดแลกติก
0	43.66	0.66	36	16.23	15.85
0.5	37.38	0.66	38	15.88	15.82
1	30.62	1.04	40	16.32	15.48
2	28.04	1.88	42	16.00	15.48
4	24.04	5.84	44	15.13	16.93
6	22.73	9.17	48	14.27	17.37
8	19.63	10.84	52	14.72	18.68
10	20.64	12.41	56	14.49	17.69
12	19.44	12.54	60	14.13	17.21
14	18.36	12.61	64	14.90	17.52
16	17.56	12.59	68	13.68	17.45
18	17.85	13.09	72	13.21	17.55
20	17.56	13.34	76	13.12	17.45
22	17.59	13.83	80	13.87	19.51
24	17.00	15.97	84	13.62	18.93
26	17.41	15.32	90	13.21	18.48
28	16.81	13.45	96	12.65	17.86
30	15.97	14.28	102	12.83	18.00
32	16.15	15.88	108	13.02	17.74
34	16.91	14.80	114	12.47	18.19

ตารางผนวกที่ ก9 การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคส 23.54 กรัม/ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	
	น้ำตาลกลูโคส	กรดแลกติก
0	23.54	0.59
1	19.37	1.86
2	18.29	2.64
4	13.47	5.12
6	10.46	8.80
8	8.37	9.70
10	5.05	10.64
12	3.39	10.18
14	1.42	11.79
16	0.39	11.79
18	0.26	11.52
20	0.23	12.67
22	0.31	13.54
24	0.31	14.83
28	0.36	15.24
30	0.28	18.55

ตารางผนวกที่ ก10 การผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคส 27.36 กรัม/ลิตร

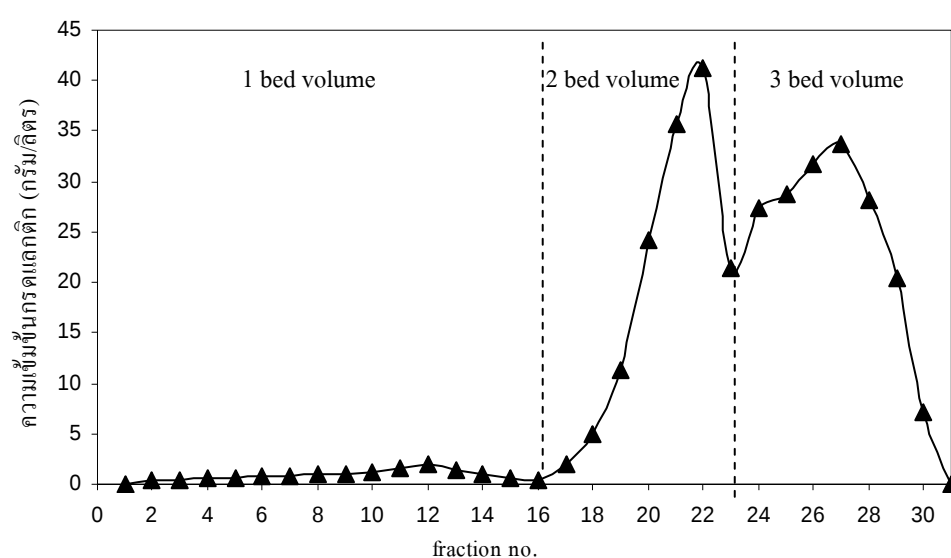
	เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)			เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
		น้ำตาล กลูโคส	กรดแลกติก			น้ำตาล กลูโคส	กรดแลกติก
ช่วงที่ 1	0	27.36	0.11	ช่วงที่ 4	26.5	18.92	23.66
	1	23.14	1.60		27	18.88	24.66
	2	21.15	5.15		28	19.07	23.46
	4	17.61	5.49		30	18.11	23.28
	6	15.09	7.04		32	16.25	24.78
	8	11.64	9.50		34	15.64	24.78
ช่วงที่ 2	8.5	20.60	11.15	ช่วงที่ 5	36	13.89	27.24
	9	20.08	9.18		38	12.27	28.03
	10	19.30	11.39		38.8	22.28	28.75
	12	17.25	13.79		39	21.85	28.39
	14	14.53	16.00		40	19.94	25.80
	16	12.45	16.24		42	18.37	30.13
ช่วงที่ 3	16.5	20.60	16.15		44	16.83	30.61
	17	20.62	14.46		46	15.61	32.96
	18	18.88	15.52		48	14.10	32.54
	20	17.38	17.78		50	12.51	37.23
	22	16.13	19.22		52	11.98	36.71
	24	14.17	20.28		54	10.59	38.07
	26	13.10	21.34		56	9.51	38.01
					58	8.42	39.03
					60	7.46	39.45
					62	5.89	41.26
					64	4.83	46.01

ตารางผนวกที่ ก11 การผลิตกรดแลกติกแบบเปิดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ด้วยระบบแยกกรดกรดแลกติก ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคส 51.14 กรัม/ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)		
	น้ำตาลกลูโคส	กรดแลกติก	กรดแลกติกที่ออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ
0	51.14	0.83	0.01
1	38.97	3.86	0.02
2	35.52	6.46	3.52
4	30.11	10.48	5.09
6	23.83	14.33	8.69
8	22.88	15.38	11.26
10	19.72	16.31	12.03
12	17.07	16.78	12.34
16	12.73	21.84	12.66
20	9.04	22.20	15.97
24	6.95	22.57	17.72
28	3.06	26.32	19.64
32	0.35	26.90	23.02
36	0.39	27.16	26.48

ตารางผนวกที่ ก12 ความเข้มข้นกรดแลกติกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ

fraction no.	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้น กรดแลกติก (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรด แลกติก (กรัม)	fraction no.	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้น กรดแลกติก (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรด แลกติก (กรัม)
1	20	0.052	0.001	16	33	0.417	0.014
2	20	0.417	0.008	17	50	2.064	0.103
3	20	0.459	0.009	18	50	4.941	0.247
4	20	0.573	0.011	19	50	11.321	0.566
5	20	0.636	0.013	20	50	24.269	1.213
6	20	0.782	0.016	21	50	35.590	1.780
7	20	0.855	0.017	22	50	41.157	2.058
8	20	0.907	0.018	23	35	21.454	0.751
9	20	0.938	0.019	24	50	27.305	1.365
10	20	1.282	0.026	25	50	28.836	1.442
11	20	1.658	0.033	26	50	31.651	1.583
12	20	1.970	0.039	27	50	33.662	1.683
13	20	1.303	0.026	28	50	28.205	1.410
14	20	1.063	0.021	29	50	20.450	1.022
15	20	0.584	0.012	30	35	7.180	0.251
				31	100	0.049	0.005



ภาพผนวกที่ ก1 การชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มัล

ภาคผนวก ข
การประมาณค่าพารามิเตอร์

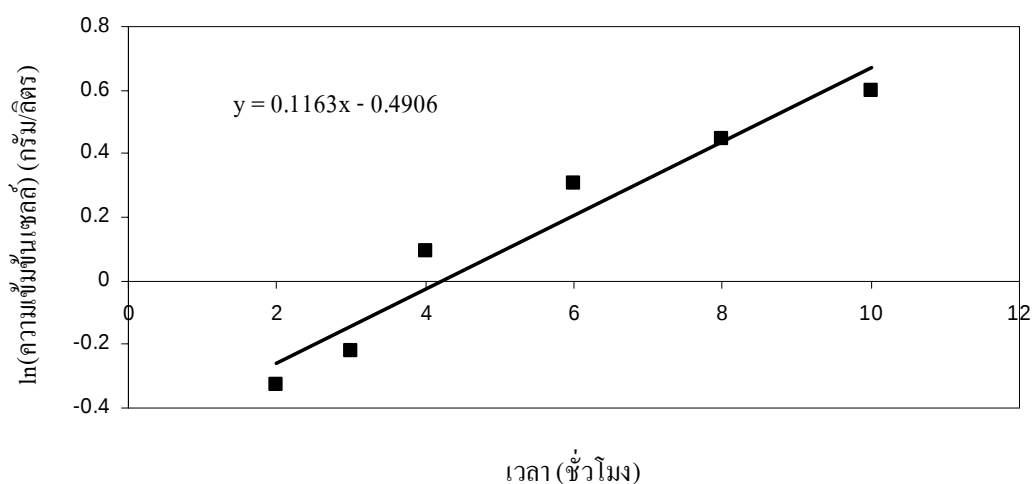
1. การคำนวณค่าพารามิเตอร์

1.1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)

คำนวณได้โดยการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับ $\ln X$ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสามารถหาได้จากความชันของกราฟ

ตัวอย่างการคำนวณ

ใช้ข้อมูลผลการทดลองจากภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1 (สูตรที่ 2 ชั่วโมงที่ 2-10)



ภาพผนวกที่ ข1 การหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)

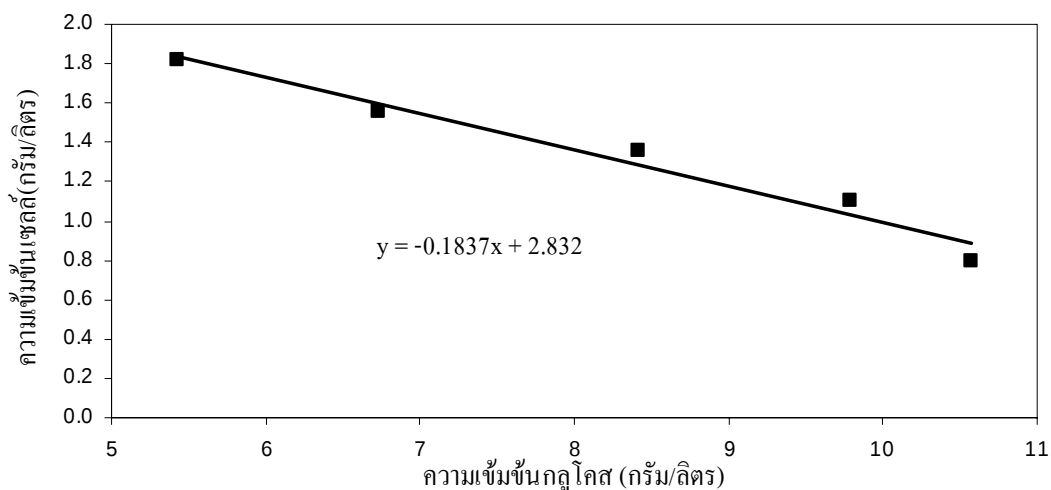
จากภาพผนวกที่ ข1 ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เท่ากับ ความชันกราฟ ดังนั้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ $0.116 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$

1.2 ผลได้ของเซลล์ ($Y_{x/s}$)

คำนวณได้จากการเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นเซลล์ กับกลูโคส โดยผลได้ของเซลล์ได้จากความชัน

ตัวอย่างการคำนวณ

ใช้ข้อมูลผลการทดลองจากภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1 (สูตรที่ 2 ชั่วโมงที่ 2-10)



ภาพผนวกที่ ข2 การหาผลได้เซลล์ ($Y_{x/s}$)

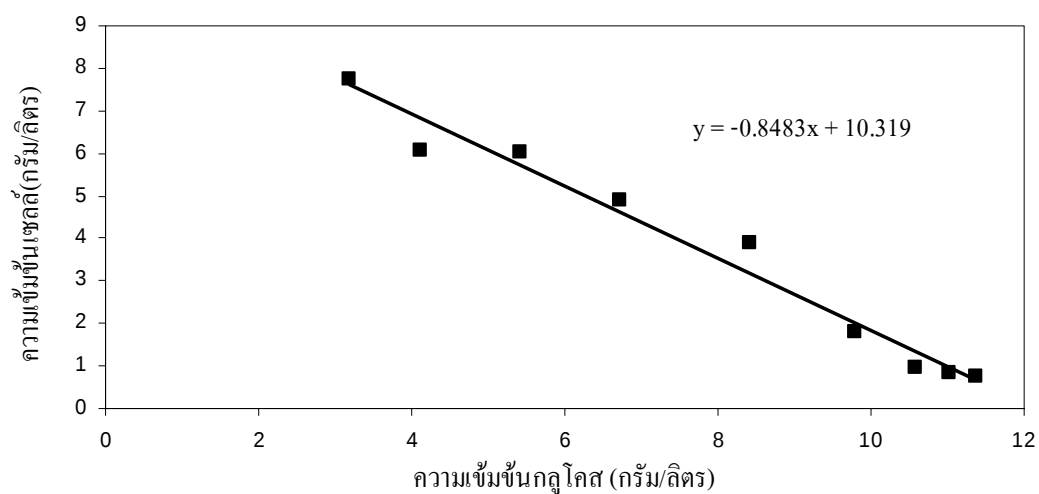
จากภาพผนวกที่ ข2 ได้ผลได้เซลล์ เท่ากับ ความชันกราฟ ดังนั้น ผลได้เซลล์เท่ากับ 0.18 กรัมเซลล์/กรัมกลูโคส

1.3 ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$)

คำนวณได้จากการเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นกลูโคส กับกรดแลกติก โดยผลได้ของกรดแลกติกได้จากความชัน

ตัวอย่างการคำนวณ

ใช้ข้อมูลผลการทดลองจากภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1 (สูตรที่ 2 ชั่วโมงที่ 14)



ภาพผนวกที่ ข3 การหาผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$)

จากภาพผนวกที่ ข3 ได้ผลได้ของกรดแลกติก เท่ากับ ความชันกราฟ ดังนั้น ผลได้ของกรดแลกติกเท่ากับ 0.85 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส

1.4 อัตราจำเพาะการใช้สับสเทรต (q_s)

คำนวณได้จากสมการ

$$\begin{aligned}
 q_s &= \frac{1}{\bar{X}} \frac{dS}{dt} \\
 &= \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2} \right)} \left(\frac{S_t - S_0}{t_t - t_0} \right) \quad \text{กรัมกลูโคส/กรัมเซลล์ ชั่วโมง}
 \end{aligned}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

ใช้ข้อมูลการทดลองจากภาพผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1 (สูตรที่ 2 ชั่วโมงที่ 14)

$$\begin{aligned}
 q_s &= \frac{1}{1.39} \left(\frac{11.38 - 3.19}{14 - 0} \right) \\
 &= 0.42 \text{ กรัมกลูโคส/กรัมแลกติก ชั่วโมง}
 \end{aligned}$$

1.5 อัตราจำเพาะการเกิดผลิตภัณฑ์ (q_p)

คำนวณได้จากสมการ

$$q_p = \frac{1}{\bar{X}} \frac{dP}{dt} = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2}\right)} \left(\frac{P_t - P_0}{t_t - t_0}\right) \quad \text{กรัมกรดแลกติก/กรัมเซลล์ ชั่วโมง}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

ใช้ข้อมูลการทดลองจากภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1 (สูตรที่ 2 ชั่วโมงที่ 14)

$$q_p = \frac{1}{1.39} \left(\frac{7.74 - 0.74}{14 - 0} \right) = 0.36 \text{ กรัมกรดแลกติก/กรัมเซลล์ ชั่วโมง}$$

1.6 อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (Q_p)

คำนวณได้จากสมการ

$$Q_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_t - P_0}{t_t - t_0} \quad \text{กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

ใช้ข้อมูลผลการทดลองจากภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1 (สูตรที่ 2 ชั่วโมงที่ 14)

$$Q_p = \frac{7.74 - 0.74}{14 - 0} = 0.50 \text{ กรัมกรดแลกติก/ลิตร ชั่วโมง}$$

2. การคำนวณในการออกแบบโดยวิธีทากูชิ (Roy, 2001)

2.1 อัตราส่วน S/N

$$S/N \text{ ratio} = -10\log(\text{MSD})$$

2.2 ค่ากลางเบี่ยงเบนมาตรฐาน (MSD)

$$\text{MSD} = \frac{\left(\frac{1}{y_1^2}\right) + \left(\frac{1}{y_2^2}\right) + \left(\frac{1}{y_3^2}\right) + \dots + \left(\frac{1}{y_n^2}\right)}{N}$$

หมายเหตุ y และ N หมายถึง ผลการทดลอง และจำนวนการทดลอง ตามลำดับ

2.3 เปอร์เซ็นอิทธิพลหลัก (% main effect)

$$\text{เปอร์เซ็นต์อิทธิพลหลัก} = \frac{(\text{ค่าอิทธิพลสูงสุด} - \text{ค่าอิทธิพลต่ำสุด}) \times 100}{\text{ค่าอิทธิพลหลักรวม}}$$

2.4 ค่า Factor sum of square (SS_{Factor})

$$SS_{\text{Factor}} = \frac{N \times r}{L} \sum_{k=1}^L (\bar{y}_k - \bar{y})^2$$

2.5 ค่า Error sum of square (SS_{Error})

$$SS_{\text{Error}} = \sum (SD)^2 \times (r-1)$$

2.6 ค่าองศาอิสระของปัจจัย (DOF_{Factor})

$$DOF_{\text{Factor}} = L - 1$$

2.7 ค่าองศาอิสระของข้อผิดพลาด (DOF_{Error})

$$DOF_{\text{Error}} = N(r - 1)$$

2.8 ค่าองศาอิสระรวม (DOF_{Total})

$$DOF_{\text{Error}} = (N \times r) - 1$$

2.9 ค่าความแปรปรวน (variance, Var)

$$\text{Var} = \frac{SS}{DOF}$$

2.10 ค่าสัดส่วนความแปรปรวน (variance ratio, F_{ratio})

$$F_{\text{ratio}} = \frac{\text{Var}}{\text{Var}_{\text{Error}}}$$

2.11 ค่าความเชื่อมั่น (confidence)

$$\text{Confidence} = 100 - F_{\text{DIST}}\left(F_{\text{ratio}}, DOF_{\text{Factor}}, DOF_{\text{Error}}\right) \times 100$$

2.12 การหาค่าผลการทดลองที่คาดไว้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (result expected at optimum condition, Y_{opt})

$$Y_{opt} = \bar{T} + (\bar{A}_2 - \bar{T}) + (\bar{B}_2 - \bar{T}) + (\bar{C}_3 - \bar{T}) + (\bar{D}_3 - \bar{T})$$

หมายเหตุ F_{DIST} เป็นค่าที่คำนวณ โดยใช้ฟังก์ชันสำเร็จรูปใน โปรแกรม excel โดยเป็นความสัมพันธ์ระหว่างค่า F_{ratio} , DOF_{Factor} , DOF_{Error} โดย y , $\bar{y}$, N , r , L , k และ $\bar{T}$ หมายถึง ผลการทดลอง ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง จำนวนการทดลอง จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง จำนวนระดับของปัจจัย ระดับของปัจจัย และค่าเฉลี่ยของผลรวมของผลการทดลองทั้งหมด ตามลำดับ และ $\bar{A}_2$, $\bar{B}_2$, $\bar{C}_3$ และ $\bar{D}_3$, หมายถึง ค่าเฉลี่ยของผลรวมของผลการทดลองของแต่ละระดับของปัจจัยที่เหมาะสมที่ได้

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์

1. การหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยวิธีการอบแห้ง

1.1 เตรียมหลอดทดลองขนาดเล็ก ขนาด 12x100 มิลลิเมตร ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักแน่นอน

1.2 คูณตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

1.3 รินส่วนใสเก็บไว้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติก

1.4 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองนำไปเหวี่ยงแยกอีกครั้ง ทำ 2 ครั้ง

1.5 รินส่วนใสทิ้ง นำหลอดทดลองไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.6 ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที และ ชั่งน้ำหนักหลอดทดลองที่แน่นอน

1.7 คำนวณน้ำหนักแห้ง โดย

$$\text{น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดทดสอบและเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดทดสอบ (กรัม)}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มล.)} \times 10^{-3}}$$

2. การประมาณค่าน้ำหนักเซลล์แห้งโดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

การวัดค่าความขุ่น

นำตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ในช่วงการเติบโตที่คุ้นเคยจากด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราการเจือจางที่เหมาะสมประมาณ 4-5 อัตราการเจือจาง นำไปวัดค่าความขุ่นที่ 620 นาโนเมตรด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959)

3.1 สารเคมี

1. DNS reagent
2. น้ำตาลกลูโคส

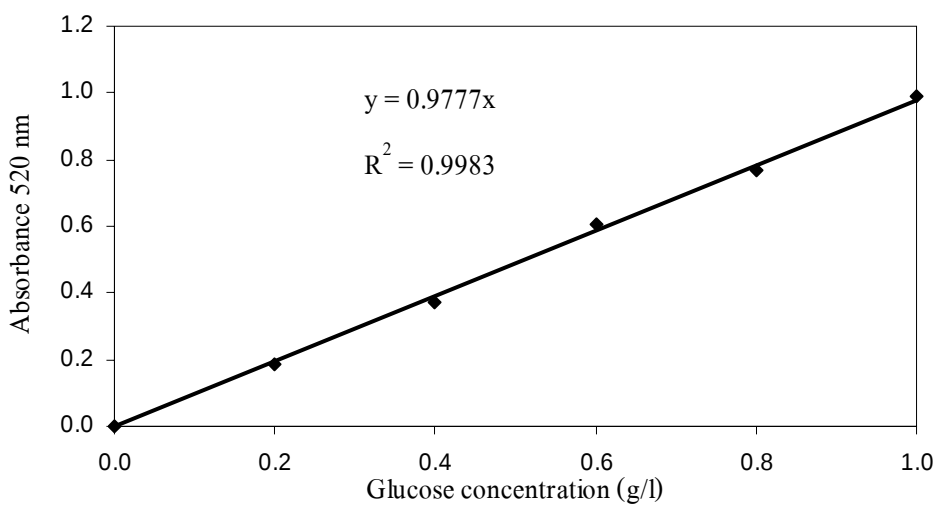
3.2 วิธีการ

1. สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

- 1.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 1.2 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากสารละลายน้ำตาล 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 8
- 1.3 ดูดสารละลายน้ำตาลกลูโคส 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 2 หลอด
- 1.4 เติมสารละลาย DNS หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสม จากนั้นหุ้มปากหลอดด้วยกระดาษอลูมิเนียม
- 1.5 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำเย็นทันที 5 นาที
- 1.6 เติมน้ำกลั่นปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 1.7 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
- 1.8 เขียนกราฟสารละลายมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส พร้อมหาค่าความชัน

ตารางผนวกที่ ๑1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้นของสารละลาย น้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	สารละลายน้ำตาลเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0.0	0.0	0.5
0.2	0.1	0.4
0.4	0.2	0.3
0.6	0.3	0.2
0.8	0.4	0.1
1.0	0.5	0.0



ภาพผนวกที่ ค1 กราฟสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

1. นำตัวอย่างมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม
2. ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตัวอย่างละ 2 หลอด
3. ดำเนินการตามหัวข้อ 1.4-1.7
4. Blank ดำเนินการตามขั้นตอนเช่นเดียวกับตัวอย่าง แต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง
5. คำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดย

$$\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{A_s \times D}{\text{slope}}$$

โดย

A_s	=	ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง
D	=	ค่าเจือจาง
slope	=	ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยวิธีของ Barker และ Summerson (1941)

4.1 สารเคมี

1. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20%
2. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4%
3. p-hydroxydiphenyl 1.5% ในสารละลาย NaOH 5%
4. Calcium hydroxide
5. Conc. H_2SO_4
6. Lithium lactate

4.2 วิธีการ

1. สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายลิเทียมแลกเตต

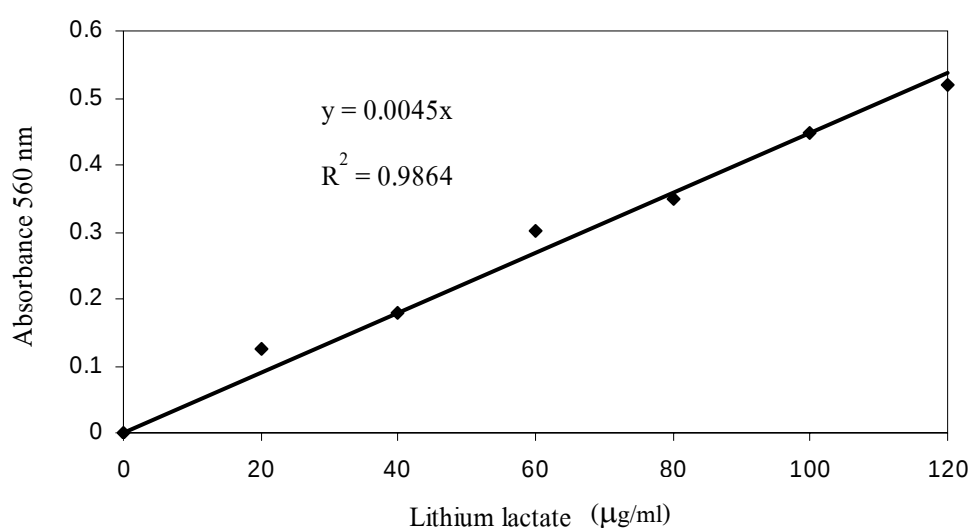
- 1.1 เตรียมสารละลายลิเทียมแลกเตต ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- 1.2 เตรียมสารละลายลิเทียมแลกเตตความเข้มข้นต่าง ๆ จากสารละลายลิเทียมแลกเตตเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ก2
- 1.3 ดูดสารละลายลิเทียมแลกเตต 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 2 หลอด
- 1.4 เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20% 1 มิลลิลิตร ลงไป ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- 1.5 เติม calcium hydroxide 1 กรัม ลงในหลอดทดลอง แล้วผสมให้เข้ากัน
- 1.6 นำไปเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายด้านบนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4% อยู่ 0.005 มิลลิลิตร (1 หยด)
- 1.7 นำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำเย็นและ ค่อย ๆ เติม Conc. H_2SO_4 6 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้า ๆ แล้วผสมให้เข้ากัน
- 1.8 นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที
- 1.9 หยดสารละลาย p-hydroxydiphenyl 1.5% 2 หยดผสมด้วยเครื่องผสมตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปต้มในเดือด 90 วินาที แล้วทำให้เย็นในทันที

1.10 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร

1.11 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายลิเทียมแลกเตต กับค่าการดูดกลืนแสง พร้อมหาความชัน

ตารางผนวกที่ ค2 การเตรียมสารละลายลิเทียมแลกเตตเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานลิเทียม-แลกเตต

ความเข้มข้นของสารละลาย Lithium lactate (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	สารละลาย Lithium lactate 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
0	0	1,000
20	20	980
40	40	960
60	60	940
80	80	920
100	100	900
120	120	880



ภาพผนวกที่ ค2 กราฟสารละลายมาตรฐานลิเทียมแลกเตต

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก

1. เจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม
2. ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงในหลอดทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด
3. ทำตามขั้นตอนในหัวข้อ 1.3-1.9
4. คำนวณปริมาณกรดแลกติก โดย

$$\text{ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัม/ลิตร)} = \frac{A_s \times D \times 90.08}{\text{slope} \times 1000 \times 96.01}$$

โดย

$$\begin{aligned} A_s &= \text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} \\ D &= \text{ค่าเจือจาง} \\ \text{slope} &= \text{ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน} \end{aligned}$$

และเมื่อ 90.08 และ 96.01 คือ มวลโมเลกุลของกรดแลกติกและ Lithium lactate ตามลำดับ

5. การหาความหนาแน่นของเม็ดเจล

5.1 นำเซลล์ครึ่งทั้งหมดที่เตรียมได้ฝังบนตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว นาน 10 นาที

5.2 ชั่งน้ำหนักเม็ดเจลที่ฝังบนตะแกรง 0.2 กรัม (น้ำหนักเปียก) โดยจดบันทึกน้ำหนักเปียกที่แน่นอน และใส่ลงในกระบอกตวง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ)

5.3 วัดปริมาตรของเม็ดเจล ซึ่งเท่ากับปริมาตรของน้ำกลั่นในกระบอกตวงที่เพิ่มขึ้น¹

5.4 คำนวณความหนาแน่นของเม็ดเจล ดังนี้

$$D = \frac{M}{V}$$

โดย D = ความหนาแน่นของเม็ดเจล (กรัม/มิลลิลิตร)
 M = น้ำหนักเปียกของเม็ดเจล (กรัม)
 V = ปริมาตรของเม็ดเจล (มิลลิลิตร)

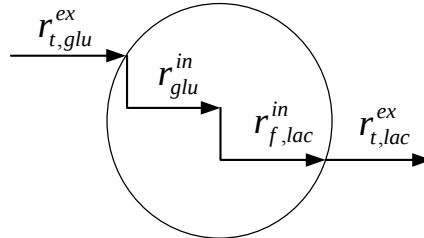
หมายเหตุ ¹ ปริมาตรน้ำกลั่นในกระบอกตวงที่เพิ่มขึ้น (มิลลิลิตร) =
 ปริมาตรของเม็ดเจลและน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)– ปริมาตรน้ำกลั่นเริ่มต้น (มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ง

การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของกระบวนการผลิตกรดแลกติกจากกลูโคสด้วยการตรึงเซลล์ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์สร้างขึ้นอาศัยสมการที่เกี่ยวข้องกับภาวะจำกัดของการแพร่ในเซลล์ตรึง (Shuler and Kargi, 2002)

Medium



ภาพผนวกที่ ง1 อัตราการเปลี่ยนแปลงของกลูโคสและกรดแลกติกในน้ำหมักและเม็ดเจลไคโตซาน (chitosan-bead)

พิจารณาการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคส

ในน้ำหมัก

อัตราการแพร่ของกลูโคสจากน้ำหมักเข้าสู่เม็ดเจลไคโตซาน ($r_{t,glu}^{ex}$) มีความสัมพันธ์กับฟลักซ์ของกลูโคส (N_S) และพื้นที่ผิวสัมผัสของเม็ดเจลไคโตซาน (A_B) ดังสมการ (1)

$$V_M \frac{dC_{glu}^{ex}}{dt} = -r_{t,glu}^{ex} \quad (1)$$

$$r_{t,glu}^{ex} = N_S A_B \quad (2)$$

นำสมการ (2) แทนในสมการ (1) จะได้ว่า

$$V_M \frac{dC_{glu}^{ex}}{dt} = -N_S A_B \quad (3)$$

และกำหนดให้ $a = \frac{A_B}{V_M}$ จะได้ว่า

$$\frac{dC_{glu}^{ex}}{dt} = -N_S a \quad (4)$$

กำหนด	$r_{t,glu}^{ex}$	คือ อัตราการแพร่ของกลูโคสจากน้ำหมักเข้าสู่เม็ดเจลไคโตซาน (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)
	V_M	คือ ปริมาตรของน้ำหมัก (ลิตร)
	N_S	คือ ฟลักซ์ของกลูโคส (กรัม/ตารางเมตร ชั่วโมง)
	A_B	คือ พื้นที่ผิวสัมผัสของเม็ดเจลไคโตซาน (ตารางเมตร)

ในเม็ดเจลไคโตซาน

การเปลี่ยนแปลงของกลูโคสขึ้นอยู่กับอัตราการใช้กลูโคสภายในเม็ดเจลไคโตซาน (r_{glu}^{in}) ตามสมการดังนี้

$$V_B \frac{dC_{glu}^{in}}{dt} = r_{t,glu}^{ex} - (r_{glu}^{in}) V_B \quad (5)$$

กำหนด	C_{glu}^{in}	คือ ความเข้มข้นกลูโคสในเม็ดเจลไคโตซาน (กรัม/ลิตร)
	V_B	คือ ปริมาตรของเม็ดเจลไคโตซาน (ลิตร)
	r_{glu}^{in}	คือ อัตราการใช้กลูโคสภายในเม็ดเจลไคโตซาน (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)

กำหนดให้ค่า effectiveness factor (η_{glu}) คือ อัตราการใช้กลูโคสภายในเม็ดเจลไคโตซาน (r_{glu}^{in}) ต่ออัตราการใช้กลูโคสภายนอกเม็ดเจลไคโตซาน (r_{glu}^{ex})

ดังนั้นอธิบายอัตราการใช้กลูโคสภายในเม็ดเจลไคโตซาน จึงเป็นผลคูณระหว่าง η_{glu} และ r_{glu}^{ex} โดยแก้สมการได้ดังสมการ (6)

$$(r_{glu}^{in}) = \eta_{glu} (r_{glu}^{ex}) \quad (6)$$

จากสมการ (6) สามารถอธิบายอัตราการใช้สับสเตรตภายนอกเม็ดเจลไคโตซาน (r_{glu}^{ex}) โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของสมการ Michaelis-Menten ได้ดังนี้

$$r_{glu}^{ex} = \frac{q_{glu}^m C_{glu}^{ex}}{K_{glu} + C_{glu}^{ex}} \bar{X} \quad (7)$$

จากสมการ (7) ถ้า $K_{glu} \gg C_{glu}^{ex}$ จะได้ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (1st order) และ ถ้า $K_{glu} \ll C_{glu}^{ex}$ จะได้ปฏิกิริยาอันดับศูนย์ ตามสมการ (8) และ (9) ตามลำดับ ดังนี้

$$q_{glu}^{ex} = \left(\frac{q_{glu}^m}{K_{glu}} \right) C_{glu}^{ex} \quad (8)$$

$$q_{glu}^{ex} \cong q_{glu}^m \quad (9)$$

ในกรณีนี้สันนิษฐานว่า $K_{glu} \gg C_{glu}^{ex}$ เนื่องจากปฏิกิริยาการถ่ายโอนมวลของสับสเทรตเข้าสู่เม็ดเจล (mass transfer reaction into gel bead) เป็นปฏิกิริยาจำกัด (rate limiting step) เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของเซลล์ (cell reaction) และเขียนแบบสมการ (8) ให้อยู่ในรูปสมการการถ่ายโอนมวลออกซิเจน $\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L (C_{O_2}^* - C_{O_2})$ แต่เนื่องจากความเข้มข้นกลูโคสในน้ำหมัก ณ เวลาใด ๆ มีค่าสูงกว่า ณ จุดสมดุล ดังนั้น จากสมการ (7) จะได้ว่า

$$r_{glu}^{ex} = \left(\frac{q_{glu}^m}{K_{glu}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} \quad (10)$$

นำสมการ (10) แทนในสมการ (6) จะได้ว่า

$$r_{glu}^{in} = \eta_{glu} \left(\frac{q_{glu}^m}{K_{glu}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} \quad (11)$$

กำหนด	q_{glu}^m	คือ อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (ชั่วโมง ⁻¹)
	$\bar{X}$	คือ ความเข้มข้นเซลล์ (กรัม/ลิตร)
	C_{glu}^{ex}	คือ ความเข้มข้นกลูโคสภายนอกเม็ดเจล ณ เวลาใด (กรัม/ลิตร)
	C_{glu}^*	คือ ความเข้มข้นกลูโคสอิ่มตัว ณ จุดสมดุล (กรัม/ลิตร)

ดังนั้นเมื่อนำสมการ (2) และ (11) แทนในสมการ (5) จะเป็นได้สมการดังนี้

$$V_B \frac{dC_{glu}^{in}}{dt} = N_S A_B - \eta_{glu} \left(\frac{q_{glu}^m}{K_{glu}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} V_B \quad (12)$$

ที่ภาวะคงตัว $\frac{dC_{glu}^{in}}{dt} = 0$ จะได้ว่า

$$N_S A_B = \eta_{glu} \left(\frac{q_{glu}^m}{K_{glu}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} V_B \quad (13)$$

$$N_S = \eta_{glu} \left(\frac{q_{glu}^m}{K_{glu}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} \frac{V_B}{A_B} \quad (14)$$

โดยนำสมการ (14) แทนในสมการ (4) และ $a = \frac{A_B}{V_m}$ จะได้สมการอนุพันธ์แสดงการเปลี่ยนแปลงกลูโคสโดยการตรึงเซลล์ดังนี้

$$\frac{dC_{glu}^{ex}}{dt} = -\eta_{glu} \left(\frac{q_{glu}^m}{K_{glu}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} \frac{V_B}{V_M} \quad (15)$$

พิจารณาการเปลี่ยนแปลงของกรดแลกติก

ในเม็ดเจลไคโตซาน

การเปลี่ยนแปลงของกรดแลกติกขึ้นอยู่กับอัตราการเกิดกรดแลกติกภายในเม็ดเจลไคโตซาน ($r_{f,lac}^{in}$) ตามสมการดังนี้

$$V_B \frac{dC_{lac}^{in}}{dt} = (r_{f,lac}^{in}) V_B - r_{t,lac}^{ex} \quad (16)$$

กำหนด	C_{lac}^{in}	คือ ความเข้มข้นกลูโคสในเม็ดเจลไคโตซาน (กรัม/ลิตร)
	$r_{f,lac}^{in}$	คือ อัตราการเกิดกรดแลกติกภายในเม็ดเจลไคโตซาน (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)
	$r_{t,lac}^{ex}$	คือ อัตราการแพร่ของกรดแลกติกจากน้ำหมักเข้าสู่เม็ดเจลไคโตซาน (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)

กำหนดให้ ค่า effectiveness factor (η_{lac}) คือ อัตราการเกิดกรดแลกติกภายในเม็ดเจลไคโตซาน ($r_{f,lac}^{in}$) ต่อยอัตราการเกิดกรดแลกติกภายนอกเม็ดเจลไคโตซาน (r_{lac}^{ex})

ดังนั้นอธิบายอัตราการเกิดกรดแลกติกภายในเม็ดเจลไคโตซานจึงเป็นผลคูณระหว่าง η_{lac} และ (r_{lac}^{ex}) และแก้สมการได้ดังสมการ (17)

$$r_{f,lac}^{in} = \eta_{lac} r_{lac}^{ex} \quad (17)$$

จากสมการ (17) สามารถอธิบายอัตราการเกิดกรดแลกติกภายนอกเม็ดเจลไคโตซาน (r_{lac}^{ex}) โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของสมการ Michaelis-Menten ได้ดังนี้

$$r_{lac}^{ex} = \frac{q_{lac}^m C_{glu}^{ex}}{K_{lac} + C_{glu}^{ex}} \bar{X} \quad (18)$$

จากสมการ (18) ถ้า $K_{lac} \gg C_{glu}^{ex}$ จะได้ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (1st order) และ ถ้า $K_{lac} \ll C_{glu}^{ex}$ จะได้ปฏิกิริยาอันดับศูนย์ ตามสมการ (19) และ (20) ตามลำดับ ดังนี้

$$q_{lac}^{ex} = \left(\frac{q_{lac}^m}{K_{lac}} \right) C_{glu}^{ex} \quad (19)$$

$$q_{lac}^{ex} \cong q_{lac}^m \quad (20)$$

ในกรณีนี้สันนิษฐานว่า $K_{lac} \gg C_{glu}^{ex}$ เนื่องจากปฏิกิริยาการถ่ายโอนมวลของผลิตภัณฑ์ออกสู่เม็ดเจล (mass transfer reaction out of gel bead) เป็นปฏิกิริยาจำกัด (rate limiting step) เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของเซลล์ (cell reaction) และเขียนแบบสมการ (8) ให้อยู่ในรูปสมการการ

ถ่ายโอนมวลออกซิเจน $\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L (C_{O_2}^* - C_{O_2})$ แต่เนื่องจากความเข้มข้นกลูโคสในน้ำหมัก ณ เวลาใด ๆ มีค่าสูงกว่า ณ จุดสมดุล ดังนั้น จากสมการ (18) จะได้ว่า

$$r_{lac}^{ex} = \left(\frac{q_{lac}^m}{K_{lac}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} \quad (21)$$

นำสมการ (21) แทนในสมการ (17) จะได้ว่า

$$r_{f,lac}^{in} = \eta_{lac} \left(\frac{q_{lac}^m}{K_{lac}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} \quad (22)$$

นำสมการ (22) แทนในสมการ (16) จะได้ว่า

$$V_B \frac{dC_{lac}^{in}}{dt} = \eta_{lac} \left(\frac{q_{lac}^m}{K_{lac}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} V_B - r_{t,lac}^{ex} \quad (23)$$

ในน้ำหมัก

อัตราการแพร่ของกรดแลกติกออกจากเม็ดเจลไคโตซานเข้าสู่ น้ำหมัก ($r_{t,lac}^{ex}$) มีความสัมพันธ์กับฟลักซ์ของกรดแลกติก (N_P) และพื้นที่ผิวสัมผัสของเม็ดเจลไคโตซาน (A_B) ดังสมการ

$$V_M \frac{dC_{lac}^{ex}}{dt} = r_{t,lac}^{ex} \quad (24)$$

$$r_{t,lac}^{ex} = N_P A_B \quad (25)$$

นำสมการ (25) แทนในสมการ (24) จะได้ว่า

$$V_M \frac{dC_{lac}^{ex}}{dt} = N_P A_B \quad (26)$$

และกำหนดให้ $a = \frac{A_B}{V_M}$ จะได้ว่า

$$\frac{dC_{glu}^{ex}}{dt} = N_P a \quad (27)$$

กำหนด N_P คือ ฟลักซ์ของกรดแลกติก (กรัม/ตารางเมตร ชั่วโมง)

และนำสมการ (25) แทนในสมการ (23) จะได้ว่า

$$V_B \frac{dC_{lac}^{in}}{dt} = \eta_{lac} \left(\frac{q_{lac}^m}{K_{lac}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} V_B - N_P A_B \quad (28)$$

ที่ภาวะคงตัว $\frac{dC_{lac}^{in}}{dt} = 0$ จะได้ว่า

$$N_P A_B = \eta_{lac} \left(\frac{q_{lac}^m}{K_{lac}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} V_B \quad (29)$$

$$N_P = \eta_{lac} \left(\frac{q_{lac}^m}{K_{lac}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} \frac{V_B}{A_B} \quad (30)$$

โดยนำสมการ (30) แทนในสมการ (27) และ $a = \frac{A_B}{V_M}$ จะได้สมการอนุพันธ์แสดงการเปลี่ยนแปลงกรดแลกติกโดยการตรึงเซลล์ดังนี้

$$\frac{dC_{lac}^{ex}}{dt} = \eta_{lac} \left(\frac{q_{lac}^m}{K_{lac}} \right) (C_{glu}^{ex} - C_{glu}^*) \bar{X} \frac{V_B}{V_M} \quad (31)$$

ภาคผนวก จ

การประมาณค่าพารามิเตอร์ด้วยโปรแกรม MATLABTM

1. โปรแกรม MATLAB™ (มนัส และ วรรัตน์, 2543)

โปรแกรม MATLAB™ ย่อมาจาก Matrix Laboratory เริ่มต้นพัฒนามาจากภาษาฟอร์แทรน โดย Clave Moler และถูกพัฒนาจากโปรแกรมเมทริกซ์ของ LINPACK และ EISPACK ต่อมาจึงได้ถูกเขียนขึ้นใหม่โดยใช้ภาษาซีโดย Steve Bangert, Steve Kleimar, John Little และ Clave Moler จากบริษัท MathWorks โปรแกรม MATLAB™ เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับคำนวณเชิงตัวเลข กราฟิกที่ซับซ้อน การจำลองแบบ และการแสดงผลข้อมูล เพื่อให้มองเห็นภาพพจน์ได้ง่ายและชัดเจนขึ้น โดยในโปรแกรม MATLAB™ จะประกอบด้วยกล่องเครื่องมือ (Toolbox) ในแต่ละสาขา ซึ่งในกล่องเครื่องมือของแต่ละสาขาก็จะประกอบไปด้วยฟังก์ชันต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแก้ปัญหาในสาขานั้น ๆ เพื่อประยุกต์ในการใช้งานจำนวนมาก

2. การใช้งานโปรแกรม MATLAB™ เบื้องต้น

เมื่อเข้าสู่โปรแกรม MATLAB™ จะพบหน้าต่างคำสั่ง ที่มีเครื่องหมาย >> (MATLAB prompt) เป็นตัวเริ่มต้นบรรทัดพร้อมที่จะรอรับคำสั่งต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดคำสั่งแล้วกดปุ่ม [Enter] โปรแกรม MATLAB™ จะมีการประมวลผลตามคำสั่งทันที และจะรับคำสั่งที่ละบรรทัด ซึ่งสามารถสร้างไฟล์ที่ประกอบด้วยชุดคำสั่งเก็บในรูปแบบ “ชื่อไฟล์. M” (มีนามสกุลของไฟล์เป็น M) เรียกว่าเอ็มไฟล์ (M-Files) การเขียนเอ็มไฟล์มี 2 รูปแบบ คือ

สคริปไฟล์ เป็นไฟล์ที่มีการกำหนดค่าตัวแปรและเขียนคำสั่ง หรือฟังก์ชันต่าง ๆ ที่ต้องการประมวลผลทีละคำสั่ง โดยสามารถเขียนคำอธิบายได้โดยใช้เครื่องหมาย “%” นำหน้าข้อความที่ต้องการอธิบาย โดยไม่มีผลต่อการทำงานของโปรแกรม การเรียกใช้สคริปไฟล์สามารถทำได้โดยเรียกชื่อเอ็มไฟล์ที่หน้าต่างของโปรแกรม MATLAB™

ฟังก์ชันไฟล์ คือ ไฟล์ที่เริ่มต้นบรรทัดแรกด้วยคำว่า “Function” และสามารถเขียนคำอธิบายได้เช่นเดียวกับสคริปไฟล์โดยใช้เครื่องหมาย “%”

3. การแก้สมการเชิงอนุพันธ์โดยใช้โปรแกรม MATLAB™

ปัญหาทางคณิตศาสตร์ วิทยาศาสตร์ และวิศวกรรมส่วนใหญ่ มักอยู่ในรูปของสมการเชิงอนุพันธ์ โดยเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสิ่งต่าง ๆ เมื่อเวลาเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสามารถ

แก้ไขปัญหาเหล่านี้โดยการแก้สมการเชิงอนุพันธ์ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น วิธีออยเลอร์ (Euler method) วิธีรุงเง-คุตตา (Runge-Kutta method) หรือการใช้ฟังก์ชัน ODE เพื่อหาคำตอบของสมการเชิงอนุพันธ์ โดยฟังก์ชันนี้อาศัยการแก้สมการเชิงอนุพันธ์ด้วยวิธี รุงเง-คุตตา (Runge-Kutta method) ประกอบด้วย 2 โครงสร้าง ดังนี้

ODE 23 เป็นฟังก์ชันที่หาคำตอบของสมการเชิงอนุพันธ์ด้วยวิธี รุงเง-คุตตา (Runge-Kutta method) อันดับ 2 และ 3 ของฟังก์ชัน FUN เมื่อ tspan คือค่าเริ่มต้นและค่าสุดท้ายของตัวแปรอิสระ t และค่าเริ่มต้น y (to) เท่ากับ yo โดย ODE 23 มีโครงสร้างดังนี้ $[t,y] = \text{ode 23}(\text{FUN}, \text{tspan}, \text{yo})$

ODE 45 เป็นฟังก์ชันที่หาคำตอบของสมการเชิงอนุพันธ์ด้วยวิธี รุงเง-คุตตา (Runge-Kutta method) อันดับ 4 และ 5 ของฟังก์ชัน FUN เมื่อ tspan คือค่าเริ่มต้นและค่าสุดท้ายของตัวแปรอิสระ t และค่าเริ่มต้น y (to) เท่ากับ yo โดย ODE 45 มีโครงสร้างดังนี้ $[t,y] = \text{ode 45}(\text{FUN}, \text{tspan}, \text{yo})$

4. Nonlinear Least Square Curve Fitting (Ordinary differential equation) (Tochampa, 2004)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุด และทดสอบพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่ทำให้ค่าที่ได้จากแบบจำลองและค่าที่ได้จากการทดลอง (fitting) มีค่าต่างกันน้อยที่สุด

ฟังก์ชันที่ใช้คือ “lsqnonlin” ใช้แก้ปัญหาในรูป

$$\min_X \sum [FUN(X)^2]$$

มีรูปแบบโครงสร้าง

$$[X, \text{resnorm}, \text{residual}] = \text{lsqnonlin}(\text{FUN}, X_0, \text{LB}, \text{UB}, \text{options}, \text{P1}, \text{P2}, \dots)$$

ส่วน Output

X = ค่าสัมประสิทธิ์ที่เหมาะสมที่สุด

Resnorm = ค่าผลรวมของกำลังสองของค่า Residual ที่ค่า X ใด ๆ, $\sum [FUN(X)^2]$

Residual = ค่าของ FUN(X) ที่ถูกส่งกลับมาจาก FUN

ส่วน Input

FUN = ฟังก์ชันไฟล์

X_0 = ค่าเริ่มต้น

LB = ค่าต่ำสุดของ X

UB = ค่าสูงสุดของ X

Options = options ที่ใช้ในการหาค่าที่เหมาะสมที่สุด

P1, P2 = ข้อมูลที่ต้องการประมาณค่า (ข้อมูลจากการทดลอง)

5. ขั้นตอนการทำงาน

ขั้นตอนที่ 1 : เตรียมข้อมูลจากการทดลอง เก็บไว้ในรูป text file

ขั้นตอนที่ 2 : กำหนดค่าพารามิเตอร์เริ่มต้นและขอบเขต (ค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด)

ขั้นตอนที่ 3 : สร้างฟังก์ชันไฟล์ที่ใช้ในการทำ interpolation และหาค่าผลต่างของข้อมูลจากการประมาณ กับการทดลอง

ขั้นตอนที่ 4 : ทำการหาค่าที่เหมาะสมที่สุดด้วยฟังก์ชัน “lsqnonlin”

ขั้นตอนที่ 5 : รายงานผล และสร้างกราฟจากข้อมูลการทดลองเทียบกับข้อมูลจากการเลียนแบบด้วยค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุดที่ประมาณค่าได้

การนำข้อมูลจากการทดลองและแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มาทำ curve fitting เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ โดยใช้วิธี Nonlinear Least Square Curve Fitting ในโปรแกรม MATLABTM เวอร์ชัน 6.5 ต้องมีการกำหนดค่าเริ่มต้น ค่าพารามิเตอร์สุ่ม (guess parameter) แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ และข้อมูลจากการทดลอง ดังแสดงในไฟล์ทั้งหมด 3 ไฟล์คือ “BatchEstim.m”, “ExpFitEval.m” และ “BatchFcn.m” รายละเอียดการเขียนโปรแกรมดังแสดงในภาพผนวกที่ จ1 ถึง จ9 ตามลำดับ

```

% BatchEstim250.m

clc

clear all

data = load('ex4.txt');

%lower and upper bound of each parameter
LB=[0 0 0 0 0 0];
UB=[inf 1 inf 1 20 10 inf];

%initial guess parameter
qms=2.02;
ns=0.30;
qmp=3.00;
np=0.25;
Seq = 16.73;
Ks=6.97;
Kp=50.00;
p0=[qms, ns, qmp, np, Seq, Ks, Kp];

%generate random initial guess parameters
%p0 = LB+rand(1,length(LB)).*(UB-LB);

options = optimset('Display','iter','MaxIter',inf,'MaxFunEvals',inf);

[p,sse] = lsqnonlin('ExpfitEval',p0,LB,UB,options,data);

```

ภาพผนวกที่ จ1 ไฟล์ “BatchEstim250.m”

```

%create summary report
filename = 'report.txt';
fid = fopen(filename,'w');
fprintf(fid,'****SUMARY REPORT****\n');
fprintf(fid,'%s\n',datestr(now,0));
fprintf(fid,'the best found : Parameter(s) and SSE \n');
for i=1:length(p)
    fprintf(fid,'Parameter(%d)=%f\n',i,p(i));
end
fprintf(fid,'sum of square error = %f\n',sse);
fclose(fid);
type(filename)
%-----

%create plot
tdata=data(:,1);
plot(tdata,data(:,2),'o',tdata,data(:,3),'s');
hold on
legend('glucose','lactic acid','Location','Best');
tspan= [0 max(data(:,1))];
y0= data(1,2:end);
axis ([0 56 0 55]);
xlabel('time (h)'); ylabel('concentration (g/l)');
[t y]= ode45('BatchFunc',tspan,y0,[],p);
plot(t,y); hold off

```

ภาพผนวกที่ จ1 (ต่อ)

```

function err=ExpFitEval(p,data)

tspan = [0 max(data(:,1))];

y0= data(1,2:end);

[t y]= ode45('BatchFunc',tspan,y0,[],p);

ysim = interp1(t,y,data(:,1),'spline');

err = ysim - data(:,2:end);

```

ภาพผนวกที่ จ2 ไฟล์ “ExpFitEval.m”

```

function ydat = BatchFunc(t,y,flag,p);

%kinetic parameter

qms=p(1);

ns=p(2);

qmp=p(3);

np=p(4);

Seq=p(5);

Ks=p(6);

Kp=p(7);

%assign variables

S=y(1);

P=y(2);

%condition parameter

Vb=250;

Vm=750;

X=1.68;

```

ภาพผนวกที่ จ3 ไฟล์ “BatchFcn.m”

```
%kinetic equation
rs=ns*(S-Seq)*(qms/Ks)*X*(Vb/Vm);
rp=np*(S-Seq)*(qmp/Kp)*X*(Vb/Vm);
% balance equations
ydat(1)= -rs;
ydat(2)= rp;
vdat = vdat(:);
```

ภาพผนวกที่ จ3 (ต่อ)

```
% BatchEstim125.m
clc
clear all
data = load('ex9.txt');
%lower and upper bound of each parameter
LB=[0 0 0];
UB=[1 1 30];

%initial guess parameter
ns=0.339;
np=0.453;
Seq = 24.37;
p0=[ns, np, Seq];
%generate random initial guess parameters
%p0 = LB+rand(1,length(LB)).*(UB-LB);
options = optimset('Display','iter','MaxIter',inf,'MaxFunEvals',inf);
[p,sse] = lsqnonlin('ExpfitEval',p0,LB,UB,options,data);
```

ภาพผนวกที่ จ4 ไฟล์ “BatchEstim125.m”

```

%create summary report
filename = 'report.txt';
fid = fopen(filename,'w');
fprintf(fid,'****SUMMARY REPORT****\n');
fprintf(fid,'%s\n',datestr(now,0));
fprintf(fid,'the best found : Parameter(s) and SSE \n');
for i=1:length(p)
    fprintf(fid,'Parameter(%d)=%f\n',i,p(i));
end
fprintf(fid,'sum of square error = %f\n',sse);
fclose(fid);
type(filename)
%-----

%create plot
tdata=data(:,1);
plot(tdata,data(:,2),'o',tdata,data(:,3),'s');
hold on

legend('glucose','lactic acid','Location','Best');
tspan= [0 max(data(:,1))];
y0= data(1,2:end);
axis ([0 76 0 55]);
xlabel('time (h)'); ylabel('concentration (g/l)');
[t y]= ode45('BatchFunc',tspan,y0,[],p);
plot(t,y); hold off

```

ภาพผนวกที่ จ4 (ต่อ)

```
function err=ExpFitEval(p,data)

tspan = [0 max(data(:,1))];

y0= data(1,2:end);

[t y]= ode45('BatchFunc',tspan,y0,[],p);

ysim = interp1(t,y,data(:,1),'spline');

err = ysim - data(:,2:end);
```

ภาพผนวกที่ ๑5 ไฟล์ “ExpFitEval.m”

```
function ydat = BatchFunc(t,y,flag,p);

%kinetic parameter

ns=p(1);

np=p(2);

Seq=p(3);

%assign variables

S=y(1);

P=y(2);

%condition parameter

Vb=125;

Vm=750;

X=1.00;

qms=2.119;

qmp=5.502;

Ks=6.757;

Kp=38.705;
```

ภาพผนวกที่ ๑6 ไฟล์ “BatchFcn.m”

```
%kinetic equation
rs=ns*(S-Seq)*(qms/Ks)*X*(Vb/Vm);
rp=np*(S-Seq)*(qmp/Kp)*X*(Vb/Vm);
% balance equations
ydat(1)= -rs;
ydat(2)= rp;
ydat = ydat(:);
```

ภาพผนวกที่ จ6 (ต่อ)

```
%BatchEstim500.m
clc
clear all
data = load('ex6.txt');

%lower and upper bound of each parameter
LB=[0 0 0];
UB=[1 1 20];

%initial guess parameter
ns=0.13;
np=0.12;
Seq = 13.61;
p0=[ns,np, Seq];

%generate random initial guess parameters
%p0 = LB+rand(1,length(LB)).*(UB-LB);
options = optimset('Display','iter','MaxIter',inf,'MaxFunEvals',inf);
[p,sse] = lsqnonlin('ExpfitEval',p0,LB,UB,options,data);
```

ภาพผนวกที่ จ7 ไฟล์ “BatchEtim500.m”

```

%create summary report
filename = 'report.txt';
fid = fopen(filename,'w');
fprintf(fid,'****SUMMARY REPORT****\n');
fprintf(fid,'%s\n',datestr(now,0));
fprintf(fid,'the best found : Parameter(s) and SSE \n');
for i=1:length(p)
    fprintf(fid,'Parameter(%d)=%f\n',i,p(i));
end
fprintf(fid,'sum of square error = %f\n',sse);
fclose(fid);
type(filename)
%-----

%create plot
tdata=data(:,1);
plot(tdata,data(:,2),'o',tdata,data(:,3),'s');
hold on
legend('glucose','lactic acid','Location','Best');
tspan= [0 max(data(:,1))];
y0= data(1,2:end);
axis ([0 114 0 45]);
xlabel('time (h)'); ylabel('concentration (g/l)');

```

ภาพผนวกที่ จ7 (ต่อ)

```
function err=ExpFitEval(p,data)

tspan = [0 max(data(:,1))];

y0= data(1,2:end);

[t y]= ode45('BatchFunc',tspan,y0,[],p);

ysim = interp1(t,y,data(:,1),'spline');

err = ysim - data(:,2:end);
```

ภาพผนวกที่ ๖8 ไฟล์ “ExpFitEval.m”

```
function ydat = BatchFunc(t,y,flag,p);

%kinetic parameter

ns=p(1);
np=p(2);
Seq=p(3);

%assign variables

S=y(1);
P=y(2);

%condition parameter

Vb=500;
Vm=750;
X=2.62;
qms=2.119;
qmp=5.502;
Ks=6.757;
Kp=38.705;
```

ภาพผนวกที่ ๖9 ไฟล์ “BatchFunc.m”

```
%kinetic equation

rs=n1*(S-Seq)*(qms/Ks)*X*(Vb/Vm);
rp=n2*(S-Seq)*(qmp/Kp)*X*(Vb/Vm);

% balance equations
ydat(1)= -rs;
ydat(2)= rp;
ydat = ydat(:);
```

ภาพผนวกที่ ๑๑ (ต่อ)

ภาคผนวก ฉ

สรุปผลการเตรียมเซลล์ตั้งไข่โคโตซาน

1. การเตรียมเซลล์ตรึงไคโตซาน

1.1 ตัวอย่างการเตรียมเซลล์ตรึงไคโตซาน

การทดลองที่ 2 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงระดับ ฟลาสก์

นำสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 ในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 2 กรัม/ลิตร ผสมกับสารละลายไคโตซาน-แอซีเทต 4 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก ปริมาตร 110 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรรวมเท่ากับ 125 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทั้งหมดจำนวน 4 ฟลาสก์ ทำการเตรียมเซลล์ตรึงไคโตซานดังวิธีการที่แสดงในภาพที่ 6 ได้น้ำหนักเปียกของเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 399.161 กรัม ปริมาตรแทนที่น้ำเท่ากับ 387.353 มิลลิลิตร และความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 1.03 กรัม/มิลลิลิตร แสดงผลดังตารางผนวกที่ ฅ1 (วิธีการคำนวณในภาคผนวก ค: วิธีการวิเคราะห์) และวัดขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึงจำนวน 30 เม็ด ด้วยเวอร์เนียขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึงเฉลี่ยเท่ากับ 0.329 มิลลิเมตร แสดงดังตารางผนวกที่ ฅ2

การทดลองที่ 3 การผลิตกรดแลกติกด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบด

การศึกษาการแปรผันอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบด โดยเม็ดเจลเซลล์ตรึงไคโตซานที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกด้วยอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 125/750 250/750 และ 500/750 ซึ่งมีความหนาแน่นของเม็ดเจลเซลล์ตรึงเท่ากับ 1.050, 1.047 และ 1.028 กรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงตามตารางผนวกที่ ฅ3 และเม็ดเจลเซลล์ตรึงจำนวน 20 เม็ด มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 0.318, 0.325 และ 0.314 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงผลดังตารางผนวกที่ ฅ4

การศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดมีอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 23.54 กรัม/ลิตร โดยมีความหนาแน่นของเม็ดเจลเซลล์ตรึงที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.040 กรัม/มิลลิลิตร ข้อมูลแสดงตามตารางผนวกที่ ฅ5 และเม็ดเจลเซลล์ตรึงจำนวน 20 เม็ด มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 0.322 มิลลิเมตร แสดงผลดังตารางผนวกที่ ฅ6

การศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบครึ่งคราวด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดที่มีอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 และเม็ดยีสเซลล์ตรึงที่ใช้มีความหนาแน่นเท่ากับ 1.033 กรัม/มิลลิลิตร และมีขนาด (จำนวน 20 เม็ด) เฉลี่ยเท่ากับ 0.323 มิลลิเมตร แสดงดังตารางผนวกที่ น7 และ น8 ตามลำดับ

การศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดที่มีระบบแยกกรดแลกติกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ โดยมีอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750 ซึ่งความหนาแน่น และขนาด (จำนวน 20 เม็ด) ของเม็ดยีสเซลล์ตรึงที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกในการศึกษานี้เท่ากับ 1.035 กรัม/มิลลิลิตร และ 0.322 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงผลตามตารางผนวกที่ น9 และ น10 ตามลำดับ

1.2 ตัวอย่างการคำนวณความหนาแน่นเม็ดยีสเซลล์ตรึง

ชั่งน้ำหนักเม็ดยีสที่ฝังบนตะแกรง 0.2 กรัม (น้ำหนักเปียก) โดยจดบันทึกน้ำหนักเปียกที่แน่นอน และใส่ลงในกระบอกตวง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่นมาเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) และวัดปริมาตรของเม็ดยีส ซึ่งเท่ากับปริมาตรของน้ำกลั่นในกระบอกตวงที่เพิ่มขึ้น¹ คำนวณความหนาแน่นของเม็ดยีส ดังนี้ (แสดงการคำนวณดังตารางผนวกที่ น1, น3, น5, น7 และ น9)

$$D = \frac{M}{V}$$

โดย	D	=	ความหนาแน่นของเม็ดยีส (กรัม/มิลลิลิตร)
	M	=	น้ำหนักเปียกของเม็ดยีส (กรัม)
	V	=	ปริมาตรของเม็ดยีส (มิลลิลิตร)

หมายเหตุ ¹ปริมาตรน้ำกลั่นในกระบอกตวงที่เพิ่มขึ้น (มิลลิลิตร) =
ปริมาตรของเม็ดยีสและน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)– ปริมาตรน้ำกลั่นเริ่มต้น (มิลลิลิตร)

ตารางผนวกที่ ฉ1 การคำนวณความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงไคโตซานในการทดลองที่ 2

ครั้งที่	น้ำหนักเม็ดเจลเซลล์ตรึง (กรัม)	ปริมาตรแทนที่น้ำ (มิลลิลิตร)	ความหนาแน่น (กรัม/มิลลิลิตร)
1	0.208	0.2	1.040
2	0.207	0.2	1.035
3	0.205	0.2	1.025
เฉลี่ย	0.207	0.2	1.030

ตารางผนวกที่ ฉ2 การวัดขนาดของเม็ดเจลเซลล์ตรึงในการทดลองที่ 2

ครั้งที่	ขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึง (มิลลิเมตร)	ครั้งที่	ขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึง (มิลลิเมตร)
1	0.365	16	0.335
2	0.320	17	0.355
3	0.315	18	0.330
4	0.320	19	0.325
5	0.330	20	0.340
6	0.300	21	0.330
7	0.360	22	0.345
8	0.285	23	0.300
9	0.330	24	0.350
10	0.235	25	0.300
11	0.325	26	0.340
12	0.35	27	0.350
13	0.35	28	0.340
14	0.325	29	0.350
15	0.350	30	0.320
เฉลี่ย	0.329 มิลลิเมตร		

ตารางผนวกที่ ๓ การคำนวณความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงไคโตซานในการศึกษาการแปรผันอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก

ครั้งที่	น้ำหนักเม็ดเจลเซลล์ตรึง (กรัม)			ปริมาตรแทนที่น้ำ (มิลลิลิตร)			ความหนาแน่น (กรัม/มิลลิลิตร)		
	อัตราส่วน V_B/V_M								
	125/750	250/750	500/750	125/750	250/750	500/750	125/750	250/750	500/750
1	0.213	0.213	0.199	0.2	0.2	0.2	1.065	1.065	0.995
2	0.207	0.202	0.213	0.2	0.2	0.2	1.035	1.010	1.065
3	0.210	0.213	0.205	0.2	0.2	0.2	1.050	1.065	1.025
เฉลี่ย	0.210	0.209	0.206	0.2	0.2	0.2	1.050	1.047	1.028

ตารางผนวกที่ ๔ การวัดขนาดของเม็ดเจลเซลล์ตรึงในการศึกษาการแปรผันอัตราส่วนปริมาตรระหว่างเม็ดเจลเซลล์ตรึงและน้ำหมัก

ครั้งที่	ขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึง (มิลลิเมตร)		
	อัตราส่วน V_B/V_M		
	125/750	250/750	500/750
1	0.315	0.345	0.330
2	0.330	0.332	0.25
3	0.360	0.345	0.312
4	0.285	0.355	0.289
5	0.355	0.326	0.246
6	0.340	0.350	0.256
7	0.330	0.340	0.326
8	0.326	0.312	0.369
9	0.396	0.296	0.350
10	0.341	0.325	0.340

ครั้งที่	ขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึง (มิลลิเมตร)		
	อัตราส่วน V_B/V_M		
	125/750	250/750	500/750
11	0.365	0.320	0.340
12	0.325	0.300	0.355
13	0.300	0.360	0.330
14	0.290	0.328	0.330
15	0.235	0.315	0.345
16	0.350	0.295	0.350
17	0.300	0.325	0.320
18	0.320	0.310	0.315
19	0.265	0.295	0.285
20	0.237	0.320	0.235
เฉลี่ย	0.318	0.325	0.314

ตารางผนวกที่ ๑๕ การคำนวณความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงไคโตซานในการศึกษาการผลิตรวดแลกดิกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 23.54 กรัม/ลิตร

ครั้งที่	น้ำหนักเม็ดเจลเซลล์ตรึง (กรัม)	ปริมาตรแทนที่น้ำ (มิลลิลิตร)	ความหนาแน่น (กรัม/มิลลิลิตร)
1	0.204	0.2	1.020
2	0.207	0.2	1.035
3	0.213	0.2	1.065
เฉลี่ย	0.208	0.2	1.040

ตารางผนวกที่ ๑๖ การวัดขนาดของเม็ดเจลเซลล์ตรึงในการศึกษาการผลิตรวดแลกดิกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 23.54 กรัม/ลิตร

ครั้งที่	ขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึง (มิลลิเมตร)	ครั้งที่	ขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึง (มิลลิเมตร)
1	0.320	11	0.305
2	0.315	12	0.295
3	0.285	13	0.330
4	0.365	14	0.325
5	0.395	15	0.320
6	0.235	16	0.365
7	0.340	17	0.295
8	0.360	18	0.320
9	0.325	19	0.330
10	0.315	20	0.300
เฉลี่ย	0.322 มิลลิเมตร		

ตารางผนวกที่ ๗ การคำนวณความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงไคโตซานในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดที่มีอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750

ครั้งที่	น้ำหนักเม็ดเจลเซลล์ตรึง (กรัม)	ปริมาตรแทนที่น้ำ (มิลลิลิตร)	ความหนาแน่น (กรัม/มิลลิลิตร)
1	0.203	0.2	1.015
2	0.210	0.2	1.050
3	0.207	0.2	1.035
เฉลี่ย	0.207	0.2	1.033

ตารางผนวกที่ ๘ การวัดขนาดของเม็ดเจลเซลล์ตรึงในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบครั้งคราวด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดที่มีอัตราส่วน V_B/V_M เท่ากับ 250/750

ครั้งที่	ขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึง (มิลลิเมตร)	ครั้งที่	ขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึง (มิลลิเมตร)
1	0.315	11	0.245
2	0.320	12	0.300
3	0.300	13	0.325
4	0.330	14	0.315
5	0.285	15	0.300
6	0.340	16	0.365
7	0.315	17	0.395
8	0.300	18	0.345
9	0.365	19	0.310
10	0.395	20	0.300
เฉลี่ย	0.323 มิลลิเมตร		

ตารางผนวกที่ ๙ การคำนวณความหนาแน่นเม็ดเจลเซลล์ตรึงไคโตซานในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดที่มีระบบแยกกรดแลกติกโดยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ

ครั้งที่	น้ำหนักเม็ดเจลเซลล์ตรึง (กรัม)	ปริมาตรแทนที่น้ำ (มิลลิลิตร)	ความหนาแน่น (กรัม/มิลลิลิตร)
1	0.206	0.2	1.030
2	0.205	0.2	1.025
3	0.211	0.2	1.055
เฉลี่ย	0.207	0.2	1.035

ตารางผนวกที่ ๑๐ การวัดขนาดของเม็ดเจลเซลล์ตรึงในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแพ็กเบดที่มีระบบแยกกรดแลกติกโดยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ

ครั้งที่	ขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึง (มิลลิเมตร)	ครั้งที่	ขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึง (มิลลิเมตร)
1	0.365	11	0.345
2	0.300	12	0.340
3	0.310	13	0.355
4	0.325	14	0.320
5	0.295	15	0.345
6	0.365	16	0.295
7	0.300	17	0.340
8	0.320	18	0.345
9	0.305	19	0.305
10	0.235	20	0.320
เฉลี่ย	0.322 มิลลิเมตร		

ภาคผนวก ข

ข้อมูลและรายละเอียดคอตัมน์แลกเปลี่ยนประจ

1. คุณสมบัติ และข้อกำหนดของแอมเบอร์ไลต์ ไออาร์เอ-67 (Amberlite IRA-67)

เรซินแลกเปลี่ยนประจุลบแอมเบอร์ไลต์ ไออาร์เอ-67 เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Rohm and Haas จำกัด โดยสั่งซื้อผ่านตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย คือ บริษัท คอมเพล็กซ์ เคมีคอล แอนด์ อีคิวปีเมนต์ จำกัด ปริมาณ 500 กรัม ราคา 2,600 บาท ซึ่งมีคุณสมบัติ และข้อกำหนดตามตารางภาพผนวกที่ ข1

ตารางผนวกที่ ข1 คุณสมบัติ และข้อกำหนดของแอมเบอร์ไลต์ ไออาร์เอ-67

คุณสมบัติ	รายละเอียด
Application	Weakly basic anion exchange resin
Matrix	Acrylic divinylbenzene copolymer
Functional groups	Tertiary amines
Physical form	Clear, white, spherical beads
Ionic form as shipped	Free base
Density	700 g/l
Size	500-750 μm
pH rang	0 to 7
Maximum operating temperature	140 °F (60 °C)

2. การเตรียมคอลัมแลกเปลี่ยนประจุ

2.1 การคำนวณปริมาณเรซิน

การคำนวณปริมาณเรซินที่ใช้ในการทดลองที่ 3.3 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จในถังปฏิกรณ์แบบเพื่อกเบดเซลล์ตรึงด้วยระบบแยกกรดแลกติก ได้คำนวณปริมาณเรซินที่ใช้ในการทดลองอาศัยค่า capacity (q) ซึ่งเป็นประสิทธิภาพของเรซินแลกเปลี่ยนประจุต่อกรดแลกติก โดยมีค่า capacity ประมาณ 0.1 กรัมกรดแลกติก/กรัมเรซิน (Modes *et al.*, 2003) และจากการผลิตกรดแลกติกใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัม/ลิตร คิดเป็นมวลของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 37.5 กรัม โดยใช้ปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ 750 มิลลิลิตร และตามทฤษฎีจะได้ผลได้กรดแลกติก ($Y_{p/S}$) เท่ากับ 1.0 กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคส ดังนั้นจะผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 50 กรัม/ลิตร

คิดเป็นมวลของกรดแลกติกเท่ากับ 37.5 กรัม จากปริมาตรน้ำหมัก 750 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นต้องใช้เรซินในการแยกกรดแลกติกเท่ากับ $\frac{1 \times 37.5}{0.1} = 375$ กรัม

แต่ในการทำทดลองกำหนดใช้เรซินเพียง 232.75 กรัม คิดเป็น 62.07 เปอร์เซ็นต์ เพื่อประหยัดปริมาณเรซิน ซึ่งคาดว่าจะสามารถแลกเปลี่ยนประจุกับกรดแลกติกได้ประมาณ 23 กรัม เพราะฉะนั้นจะมีกรดแลกติกเหลืออยู่ในน้ำหมักประมาณ 14.5 กรัม คิดเป็นความเข้มข้นสุดท้ายของกรดแลกติกในน้ำหมักเท่ากับ 19.33 กรัม/ลิตร

2.2 การเตรียมเรซินเพื่อบรรจุคอลัมน์

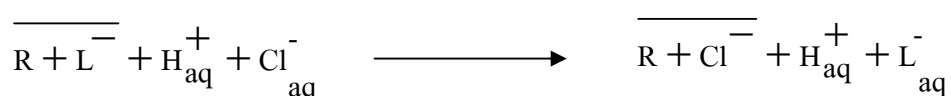
ซังเรซินแอมเบอร์ไรต์ ไออาร์เอ-67 ปริมาณ 232.75 กรัม แช่วในสารละลายต่าง โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ที่ปราศจากเชื้อ (121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ปริมาตร 600 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เรซินปราศจากเชื้อก่อนใช้งาน และทำการ regenerate เรซิน ดังนี้ (1) แช่วในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 600 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที และล้างเรซินด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) และ (2) แช่วเรซินในสารละลายต่าง โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 600 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ล้างเรซินด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อ หลังจากนั้น (3) แช่วเรซินในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 600 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที และ (4) ล้างกรดออกจากเรซินด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ล้างซ้ำจนกระทั่ง pH เท่ากับ 7 ทุกขั้นตอนของการเตรียมเรซินเพื่อใช้ในการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์ เซลล์ตรึงที่มีระบบแยกกรดแลกติกดำเนินการภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ

2.3 การบรรจุเรซินลงคอลัมน์

นำเรซินพร้อมใช้งานที่ปราศจากเชื้อในข้อ 2.2 บรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และส่วนสูงเท่ากับ 4.6x20 เซนติเมตร แสดงดังภาพที่ 11 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ บรรจุเรซินลงในคอลัมน์โดยใช้น้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) เป็นตัวนำพาเรซินลงสู่คอลัมน์จนหมด และต่อคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุกับปั๊ม เพื่อหมุนเวียนน้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อด้วยอัตราไหล 3.60 มิลลิลิตร/นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และตั้งคอลัมน์ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้เรซินเกิดการรวม และเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบพร้อมนำไปใช้งานต่อไป

3. การแยกกรดแลกติกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ

เมื่อสิ้นสุดการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยถังปฏิกรณ์เซลล์ตรงที่มีระบบแยกกรดแลกติก นำคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุมาแยกกรดแลกติกออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 1,103 มิลลิลิตร และอัตราการไหลเท่ากับ 3.60 มิลลิลิตร/นาทีอย่างต่อเนื่อง โดยมีหลักการแยกกรดแลกติกด้วยการแลกเปลี่ยนประจุลบ แสดงดังสมการ



โดย R คือ เรซิน

L_{aq}^- คือ ไอออนของกรดแลกติกในสารละลาย

ผลของการแยกกรดแลกติกออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ แสดงดังตารางผนวกที่ ก12 และภาพผนวกที่ ก1 ตามลำดับ โดยได้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 16.13 กรัม ในสารละลายกรดแลกติก 1,103 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายของสารละลายกรดแลกติกที่แยกได้จากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุเท่ากับ 14.62 กรัม/ลิตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวชลลดา ศิริเสตสุวรรณ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 25 สิงหาคม 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดนครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับปริญญาโท จาก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี งบประมาณ 2549

