



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ
Lactococcus lactis IO-1 โดยวิธี Taguchi

Optimization of Lactic Acid Production by Immobilized
Lactococcus lactis IO-1 Using Taguchi Method

นามผู้วิจัย นางสาวติยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, Dr. rer. nat.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชยศิริรัตน, Ph. D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ธงไชย ศรีนพคุณ, Ph. D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชยศิริรัตน, Ph. D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M. A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 23 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ
Lactococcus lactis IO-1 โดยวิธี Taguchi

Optimization of Lactic Acid Production by Immobilized
Lactococcus lactis IO-1 Using Taguchi Method

โดย

นางสาวติยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1329-6

ดุษฎีบัณฑิตกิตติมศักดิ์ 2549: การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ *Lactococcus lactis* IO-1 โดยวิธี Taguchi ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, Dr. rer. nat. 155 หน้า ISBN 974-16-1329-6

กรดแลกติกมีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น ตลอดจนเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตพอลิแลกเทต ซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพ การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนากรรมวิธีการผลิตกรดแลกติกโดยนำเทคนิคการตรึงเซลล์มาใช้ในการผลิตกรดแลกติก และนำวิธี Taguchi มาใช้ออกแบบการทดลอง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง จากการศึกษา พบว่า การผลิตกรดแลกติกโดยใช้เซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในโครงข่ายแอลจิเนต (entrapment) มีอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงกว่าการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์อิสระ 1.52 เท่า เมื่อปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเซลล์ตรึงเท่ากับ 1.32 กรัม

ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในระดับฟลาสก์ ด้วยการออกแบบการทดลองโดยวิธี Taguchi แปลผัน 8 แฟกเตอร์ แบบ $L_{18}(2^1 \times 3^7)$ orthogonal array ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ชนิดของการตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจินิต (encapsulation), ความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงที่ใช้ 5.28 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคส 45 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นยีสต์สกัด 10 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นบีฟัสกัต 10 กรัม/ลิตร, พีเอชเริ่มต้น 6.85, ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 10 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นเปปโตน 7.5 กรัม/ลิตร และพบว่า ทุกแฟกเตอร์มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นสุดท้ายของกรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงอย่างมีนัยสำคัญ

ในการศึกษาการผลิตรกตแลกติกแบบเบ็ดเสร็จ ต่อเนื่อง และเบ็ดเสร็จซ้ำด้วยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi ในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ที่มีการเวียนกลับน้ำหมัก พบว่าการผลิตรกตแลกติกแบบต่อเนื่องที่อัตราเจือจางเท่ากับ 0.5 ชั่วโมง^{-1} ให้อัตราการผลิตแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ $4.46 \text{ กรัม/ลิตร ชั่วโมง}$ ซึ่งสูงกว่าการผลิตแลกติกแบบเบ็ดเสร็จ และแบบเบ็ดเสร็จซ้ำ 2.10 และ 1.91 เท่า ตามลำดับ ส่วนการผลิตแลกติกแบบเบ็ดเสร็จซ้ำมีประสิทธิภาพในการใช้กลูโคสสูง ทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงขึ้นด้วย โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของกรดแลกติกเท่ากับ 27.58, 23.52 และ 23.00 กรัม/ลิตร ในการผลิตแลกติกครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

กฤษฎิ์ เภาอิมพิณ
ลายมือที่อนิต

นาย สันติสุข
ลายมือชื่อประธานกรรมการ

15 / 2.9. / 49

Tiyaporn Luangpipat 2006: Optimization of Lactic Acid Production by Immobilized *Lactococcus lactis* IO-1 Using Taguchi Method. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Sarote Sirisansaneeyakul, Dr. rer. nat. 155 pages.
ISBN 974-16-1329-6

Lactic acid is commonly used in many industries such as food and beverage industries, textile industry etc. Besides, it is used as a substrate for producing polylactate, which is known as biodegradable plastics. This study expects to improve lactic acid fermentation process by using immobilization technique and Taguchi method to optimize lactic acid production with immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. The result showed that lactic acid production with immobilized *L. lactis* IO-1 increased the volumetric lactic acid productivity 1.52 times higher than that with free cells, when an initial concentration was 1.32 g.

Applying Taguchi method for optimizing the production of lactic acid with immobilized *L. lactis* IO-1, the 8 factors of $L_{18} (2^1 \times 3^7)$ orthogonal array were designed. The following optimal conditions were obtained encapsulation, 5.28 g/l cell concentration of immobilized cells, 10 g/l initial glucose, 10 g/l yeast extract, 10 g/l beef extract, initial pH 6.85, 10 g/l calcium chloride, and 7.5 g/l peptone. All these factors were found to affect on lactic acid concentration and volumetric lactic acid productivity significantly.

Batch, continuous and repeated batch modes of operation for lactic acid production with immobilized *L. lactis* IO-1 in a packed bed reactor with broth recycle were conducted under Taguchi optimized conditions. The continuous lactic acid production at dilution rate of 0.5 h^{-1} gave the higher volumetric lactic acid productivity of 4.46 g/l h, which is higher than batch and repeated batch production of lactic acid 2.10 and 1.91 times, respectively. However, repeated batch lactic acid production showed the most efficiency of glucose consumption. As a result, lactic acid concentration of 27.58, 23.52, and 23.00 g/l were obtained in batch runs of 1, 2, and 3, respectively.

Tiyaporn Luangpipat
Student's signature

Sarote Sirisansaneeyakul
Thesis Advisor's signature

15 / 03 / 06

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาเสียสละเวลา ให้โอกาสและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย และการศึกษาในระดับปริญญาโท ตลอดจนได้ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้จนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี รวมทั้งอบรมสั่งสอนและให้ข้อคิดที่ดีในการดำรงชีวิตด้วยความเมตตา ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิรัตน์ วาณิชศรีรัตนาก กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร. ธงไชย ศรีนพคุณ กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ที่กรุณาให้คำชี้แนะเพิ่มเติมในการวิจัย และการแก้ไขวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หทัยรัตน์ ริมศิริ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น Associate Professor Dr. Henry Ho-Hsien Chen และ Mr. Chung Chao-Chin แห่ง Department of Food Science, National Pingtung University of Science and Technology ที่ได้ให้คำแนะนำ และเอาใจใส่ดูแลในระหว่างที่ไปทำวิจัยที่ประเทศไต้หวันเป็นอย่างดี

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2547 ขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอบคุณน้องชาย น้องสาว ที่เป็นกำลังใจที่ดีที่สุด รวมทั้งสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้าเป็นอย่างดีตลอดมา และขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และคณะอุตสาหกรรมเกษตร สำหรับความช่วยเหลือ คำปรึกษา และกำลังใจที่ดี รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ห้องธุรการ ที่อำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัยอย่างดีตลอดมา

ประโยชน์และคุณความดีที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ และคณาจารย์ทุกท่าน ทั้งในอดีต ปัจจุบัน และอนาคต ที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอน และให้ความรู้อย่างดีมาโดยตลอด

ดิยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์

มีนาคม 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(8)
คำอธิบายสัญลักษณ์	(11)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	57
สรุปผลการทดลอง	92
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	96
ภาคผนวก	107
ภาคผนวก ก ข้อมูลการทดลอง	108
ภาคผนวก ข การประมาณค่าพารามิเตอร์	125
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์	133
ภาคผนวก ง การประมาณค่าพารามิเตอร์และเขียนแบบกระบวนการ โดยใช้โปรแกรม MATLAB™	145
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	155

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตกรดแลกติกแบบไฮโมแลกติกและเฮเทโรแลกติก	8
2	คุณสมบัติของกรดแลกติก	9
3	การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลกติก <i>Lactococcus lactis</i> IO-1	11
4	การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลกติก	12
5	เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวัสดุพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์	16
6	การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงแบคทีเรียกรดแลกติก	23
7	L_4 Orthogonal array	24
8	แฟกเตอร์และระดับของแฟกเตอร์ที่กำหนด	41
9	$L_{18} (2^1 \times 3^7)$ Orthogonal array	42
10	พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจินต <i>L. lactis</i> IO-1 ในระดับฟลask	59
11	พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงที่ประมาณด้วยวิธี non-linear least square error โดยใช้กล่องเครื่องมือ GAOT ของโปรแกรมสำเร็จรูป MATLAB TM	61
12	พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในโครงข่ายแอลจินตและในเยื่อแอลจินตในถังปฏิกรณ์แบบกวน	66
13	ต้นทุนของการเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจินตและในเยื่อแอลจินต	66
14	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงระดับฟลask โดยวิธี Taguchi (ความเข้มข้นกรดแลกติก)	71

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงระดับพลาสม์โดยวิธี Taguchi (อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร, Q_p)	72
16	การวิเคราะห์อิทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่อความเข้มข้นกรดแลกติกในการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงระดับพลาสม์	73
17	การวิเคราะห์อิทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่ออัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรในการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงระดับพลาสม์	74
18	การวิเคราะห์อิทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่อความเข้มข้นกรดแลกติกโดยวิธี ANOVA	76
19	การวิเคราะห์อิทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่ออัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรโดยวิธี ANOVA	77
20	ต้นทุนของการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจีเนต	78
21	พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตระดับพลาสม์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi	81
22	พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi	84
23	พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi	87
24	เปรียบเทียบพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จและแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed	87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก5 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ใน โครงข่ายแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบกวน (ความเข้มข้นกลูโคส เริ่มต้น 7.52 กรัม/ลิตร)	111
ก6 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ใน เยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบกวน (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.15 กรัม/ลิตร)	112
ก7 จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Taguchi	113
ก8 การผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนต ระดับฟลอสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi ชุดที่ 1 (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 38.63 กรัม/ลิตร)	114
ก9 การผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนต ระดับฟลอสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi ชุดที่ 2 (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 36.15 กรัม/ลิตร)	115
ก10 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed รอบที่ 1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (ความเข้มข้น กลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 29.08 กรัม/ลิตร)	116
ก11 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed รอบที่ 2 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (ความเข้มข้น กลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 31.13 กรัม/ลิตร)	117

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า	
ก12	การผลิตรวดแลกดิกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (อัตราการผลิตเท่ากับ 0.5 ต่อชั่วโมง และความเข้มข้นกลูโคสในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ได้เท่ากับ 31.25 กรัม/ลิตร)	118
ก13	การผลิตรวดแลกดิกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (อัตราการผลิตเท่ากับ 1.0 ต่อชั่วโมง และความเข้มข้นกลูโคสในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ได้เท่ากับ 35.48 กรัม/ลิตร)	120
ก14	การผลิตรวดแลกดิกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ครั้งที่ 1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 28.05 กรัม/ลิตร)	122
ก15	การผลิตรวดแลกดิกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ครั้งที่ 2 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 28.05 กรัม/ลิตร)	123
ก16	การผลิตรวดแลกดิกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ครั้งที่ 3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 29.17 กรัม/ลิตร)	124
ข1	สูตรการคำนวณพารามิเตอร์จากผลการทดลองการหมักแบบเบ็ดเสร็จ	126
ข2	สูตรการคำนวณพารามิเตอร์จากผลการทดลองการหมักแบบต่อเนื่อง ณ สภาวะคงตัว	129

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส	137
ค2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานลิเทียมแลกเทต	140

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดแลกติก	5
2	วิธีการสร้างกรดแลกติก	10
3	กลไกการเกิดกรดแลกติก	13
4	โครงสร้างของแอลจิเนต	17
5	การตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจิเนต (entrapment)	18
6	การตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจิเนต (encapsulation)	19
7	ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต (entrapment)	32
8	ขั้นตอนการหดยีสยวณลอยลงในสารละลายไฮเดียมแอลจิเนต	34
9	ขั้นตอนการทำแคปซูลเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนตให้แข็งตัว	34
10	ขั้นตอนการกรองแคปซูลเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต	35
11	ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต (encapsulation)	36
12	สรุปวิธีการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Taguchi	45
13	ถังปฏิกรณ์แบบ packed bed บรรจุเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนตขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและส่วนสูงเท่ากับ 6.04x10.5 เซนติเมตร	49
14	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแบบ packed bed	52
15	แสดงระบบควบคุมการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแบบ packed bed	53
16	การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแบบ packed bed	54
17	แสดงระบบควบคุมการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแบบ packed bed	55
18	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ยีส <i>L. lactis</i> IO-1 ระดับฟลาสก์ (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.40 กรัม/ลิตร)	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเชลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ระดับฟลาสก์	58
20	การเลียนแบบกระบวนการผลิตกรดแลกติกด้วยเชลล์ตรึงด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์อาศัยผลการทดลองจากการผลิตกรดแลกติกที่แปรผันปริมาณเชลล์เริ่มต้น 0.132, 0.66 และ 1.32 กรัม	62
21	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเชลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 (a) โครงข่ายแอลจีเน็ต และ (b) เยื่อแอลจีเน็ต ในถังปฏิกรณ์แบบกวน ปริมาตรทำงาน 1 ลิตร (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 7.52 และ 9.15 กรัม/ลิตร ตามลำดับ)	65
22	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกรดแลกติกในการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง	75
23	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรในการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง	75
24	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเชลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเน็ตระดับฟลาสก์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ (a) 38.63 และ (b) 36.15 กรัม/ลิตร	80
25	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักโดยเชลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเน็ตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (a) 29.08 และ (b) 31.13 กรัม/ลิตร)	83

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi ควบคุมที่อัตราการเจือจางเท่ากับ (a) 0.5 และ (b) 1.0 ต่อชั่วโมง (ความเข้มข้นกลูโคสในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่เติม (a) 35.48 และ (b) 31.25 กรัม/ลิตร ตามลำดับ)	86
27	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเซลล์ตรึง <i>L. lactis</i> IO-1 เยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจาก วิธี Taguchi (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นของการผลิตครั้งที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 28.05, 28.05 และ 29.17 กรัม/ลิตร ตามลำดับ)	90
ภาพผนวกที่		
ค1	กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร และ ความเข้มข้นเซลล์	136
ค2	กราฟมาตรฐานกลูโคส	138
ค3	กราฟมาตรฐานลิเทียมแลกเทต	141
ง1	ไฟล์ “ BatModel.m “	149
ง2	ไฟล์ “ BatSim.m “	151
ง3	ไฟล์ “ ExpFitEval.m “	152
ง4	ไฟล์ “ GABatferm.m “	153

คำอธิบายสัญลักษณ์

สัญลักษณ์

C_p	ค่าความร้อนจำเพาะ (จูล/โมล องศาเซลเซียส)
D	อัตราการเจือจาง (ชั่วโมง ⁻¹)
F	อัตราการไหล (ลิตร/ชั่วโมง)
F_1	อัตราการไหลของน้ำหมักจากถังพักน้ำหมักเข้าสู่ปฏิกรณ์เซลล์ตรึง (ลิตร/ชั่วโมง)
F_2	อัตราการไหลของน้ำหมักออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงเข้าสู่ถังพักน้ำหมัก (ลิตร/ชั่วโมง)
F_3	อัตราการไหลเข้าของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ (ลิตร/ชั่วโมง)
F_4	อัตราการไหลออกของน้ำหมักของถังพักแบบกวน (ลิตร/ชั่วโมง)
k	ระดับของแฟกเตอร์
K_a	ค่าคงที่การแตกตัว
K_S^P	ค่าคงที่อิ่มตัวของสับสเตรตสำหรับการผลิตกรดแลกติก (กรัม/ลิตร)
L	จำนวนระดับของแฟกเตอร์
m_S	สัมประสิทธิ์ของการบำรุงรักษาเซลล์จากสับสเตรต (กรัม/ลิตร)
n	ค่าคงที่การยับยั้งเนื่องจากปริมาณเซลล์
N	จำนวนการทดลอง
P	ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัม/ลิตร)
P_m	ความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุด (กรัม/ลิตร)
q_p	อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (กรัม/กรัม ชั่วโมง)
q_m^P	อัตราจำเพาะสูงสุดของการผลิตกรดแลกติก (กรัม/กรัม ชั่วโมง)
q_S	อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (กรัม/กรัม ชั่วโมง)
Q_p	อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)
r	จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง
r_p	อัตราการผลิตกรดแลกติก (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)
r_S	อัตราการใช้สับสเตรต (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)
S	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัม/ลิตร)

คำอธิบายสัญลักษณ์ (ต่อ)

V	ปริมาตรทำงานของถังหมัก (ลิตร)
X	ความเข้มข้นเซลล์ (กรัม/ลิตร)
X_0	ปริมาณเซลล์เริ่มต้น (กรัม/200 มิลลิลิตร)
X_m	ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ยับยั้งการผลิตกรดแลกติกอย่างสมบูรณ์ (กรัม/200 มิลลิลิตร)
y	ผลการทดลอง
$\bar{y}$	ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง
y_0	ผลการทดลองที่กำหนด
$Y_{P/S}$	ผลได้กรดแลกติก (กรัม/กรัม)
$Y_{X/S}$	ผลได้เซลล์ (กรัม/กรัม)

ตัวอักษรกรีก

μ	อัตราจำเพาะการเติบโต (ชั่วโมง ⁻¹)
-------	---

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ *Lactococcus lactis* IO-1 โดยวิธี Taguchi

Optimization of Lactic Acid Production by Immobilized *Lactococcus lactis* IO-1 Using Taguchi Method

คำนำ

กรดแลกติก (Lactic acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติมีความสำคัญอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมต่าง ๆ พบว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกรดแลกติกที่ผลิตได้ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม โดยใช้เป็นตัวปรับสภาพความเป็นกรด ทำให้พีเอชต่ำลง ซึ่งช่วยในการป้องกันการเสื่อมเสีย ตลอดจนช่วยในการปรุงแต่งรสชาติเปรี้ยวของอาหารและเครื่องดื่ม (Tango and Ghaly, 2002) ทางด้านการแพทย์ใช้กรดแลกติกเป็นแหล่งของแคลเซียมในรูปของแคลเซียมแลกเตต ประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำเฝือกอ่อน และผลิตไหมเย็บแผลชนิดที่ย่อยสลายได้เอง (สารโจน, 2544) รวมทั้งใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมเครื่องหนังอีกด้วย (Mostafa, 1996; Milcent and Carrere, 2001) นอกจากนี้กรดแลกติกยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพอลิแลกเตต (polylactate) ซึ่งเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) ที่เก็บกักและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (สารโจน, 2546; Vickroy, 1985; Lee, 1996; Kasuga *et al.*, 2001)

ปัจจุบัน มีการผลิตกรดแลกติกทั่วโลกประมาณ 80,000 ตัน/ปี (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000) โดยในประเทศไทยยังไม่มีอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลกติก แต่มีการนำเข้ากรดแลกติกจากหลายประเทศ อาทิ สเปน ซึ่งเป็นแหล่งนำเข้ากรดแลกติกปริมาณมากที่สุดถึง 46 เปอร์เซ็นต์ (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2546) ปรากฏว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตกรดแลกติกในอุตสาหกรรมใช้กระบวนการผลิตทางชีวภาพ ที่เหลืออีก 10 เปอร์เซ็นต์ อาศัยกระบวนการผลิตทางเคมี ซึ่งข้อดีของการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการทางชีวภาพคือ สามารถเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกชนิดโฮโมเฟอริกแมนเทฟที่ฟิที่อยู่ในรูป L-form เพียงชนิดเดียว และไม่เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นแก๊สเรือนกระจก (Milcent and Carrere, 2001) จึงเป็นผลดีต่อการลดปัญหามภาวะโลกร้อน การพัฒนากรรมวิธีการผลิตกรดแลกติกมีการศึกษาทั้งในการผลิตแบบ

เบ็ดเสร็จและแบบต่อเนื่อง ตลอดจนการใช้ระบบหมุนเวียนเซลล์ในการผลิตกรดแลกติก เพื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นเซลล์ (เกสร, 2545; มีชัย, 2546; Kwon *et al.*, 2001) ทำให้สามารถเพิ่มอัตราการผลิตเชิงปริมาตรของกรดแลกติก แต่จำเป็นต้องมีการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักในกระบวนการทำยกระแสทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนและค่าใช้จ่ายสูงขึ้น เนื่องจากการหมักแบบความหนาแน่นสูงของเซลล์ต้องใช้อุปกรณ์ในการแยกเซลล์ เช่น เครื่องกรอง หรือ เครื่องเหวี่ยงแยกที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตกรดแลกติก ดังนั้นจึงมีการพัฒนารวมวิธีการผลิตที่เป็นทางเลือกใหม่ที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก (สาโรจน์, 2544; Akerberg and Zacchi, 2000; Nolasco-Hipolito *et al.*, 2002)

การประยุกต์ใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ มีรายงานว่าเทคนิคการตรึงเซลล์ในการเตรียมกล้าเชื้อของผลิตภัณฑ์นมช่วยให้กระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลกติกมีอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงขึ้นกว่าการใช้เซลล์อิสระ (Trauth *et al.*, 2001) สำหรับการผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการตรึงเซลล์โดยใช้แคลเซียมแอลจีเนตเป็นวัสดุพาหะ เป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่ใช้อย่างกว้างขวางและนิยมใช้กับแบคทีเรียกรดแลกติก (Casson and Emery, 1986) การใช้เซลล์ตรึงในกระบวนการผลิตกรดแลกติกจะช่วยเพิ่มความหนาแน่นของปริมาณเซลล์ ทำให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เซลล์ตรึงในระบบการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องจะสามารถหลีกเลี่ยงภาวะการเกิด wash out ทำให้สามารถเลือกสภาวะอัตราการเจือจางสูงขึ้นได้ มีผลทำให้อัตราการผลิตเชิงปริมาตรของกรดแลกติกสูงขึ้น (Chinachoti *et al.*, 1997) และสามารถช่วยลดต้นทุนในขั้นตอนของการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักในการทำกรดแลกติกให้บริสุทธิ์อีกด้วย

การศึกษานี้มุ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกด้วยวิธี Taguchi และศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จ แบบต่อเนื่อง และแบบเบ็ดเสร็จซ้ำที่มีระบบเวียนกลับน้ำหมักภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จเปรียบเทียบกับระบบการผลิตโดยใช้เซลล์อิสระ
2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง ด้วยการออกแบบการทดลองโดยวิธี Taguchi
3. ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ที่มีการเวียนกลับน้ำหมัก ภายใต้อสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi

การตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียกรดแลกติก *Lactococcus lactis* IO-1

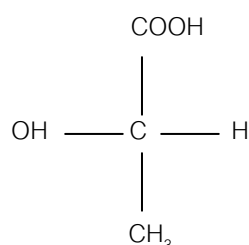
Lactococcus lactis IO-1 จัดเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัส *Streptococcus* สายพันธุ์ที่เติบโตในสภาพที่ไม่มีอากาศ แต่พบว่าในสภาพที่มีอากาศก็สามารถเติบโตได้ ลักษณะจำเพาะของแบคทีเรียกรดแลกติกนี้คือ จะมีเส้นใยเล็ก ๆ งอกออกไปในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและมีโซนสีเหลืองรอบโคโลนี ส่วนลักษณะโคโลนีในจานเพาะเลี้ยงจะมีลักษณะโค้งมนสีเขียว และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า มีลักษณะเป็นรูปไข่ กว้างประมาณ 0.8-0.9 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 1.1-1.2 ไมโครเมตร (Ishizaki *et al.*, 1990a)

L. lactis O-1 สามารถเติบโตและผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการหมักแบบไฮโมเฟอร์-เมนเททิฟ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) เท่ากับ 1.2 ชั่วโมง^{-1} และสามารถมีชีวิตที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่า *L. lactis* IO-1 ใช้แหล่งคาร์บอนในการเติบโตและการผลิตกรดแลกติกได้หลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดก็จะทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีพีเอชสุดท้ายต่างกันดังนี้ เมื่อใช้ฟรุกโทส, กาแลกโทส, กลูโคส, แล็กโทส และไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีพีเอชสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 4.2, 4.2, 4.2, 4.9 และ 4.6 ตามลำดับ เป็นต้น โดย *L. lactis* IO-1 สามารถเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดแลกติกได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และยังต้องการกรดอะมิโนที่จำเป็นคือ กรดกลูตามิก ลิซีน และวาเลอีน สำหรับการเติบโตและการผลิตกรดแลกติกอีกด้วย นอกจากนี้ ยังพบว่า *L. lactis* IO-1 สามารถผลิตไนซินซึ่งเป็นสารยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ร่วมอยู่ด้วย ฉะนั้น *L. lactis* IO-1 จึงเป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาสำหรับประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลกติกควบคู่กับการผลิตไนซิน (Ishizaki *et al.* 1990b)

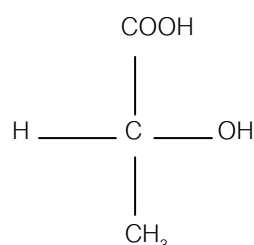
2. กรดแลกติก

กรดแลกติก (lactic acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่พบทั่วไปในธรรมชาติ โดยพบได้ในมนุษย์ สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1780 โดยนักเคมีชาวสวีเดน ซึ่งพบในนมเปรี้ยว กรดแลกติกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid ที่

ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ และมีสูตรโครงสร้างทางเคมี 2 แบบที่เป็น optically isomers ซึ่งกันและกัน ดังนี้คือ



L (+)-lactic acid



D (-)-lactic acid

ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดแลกติก

ที่มา: Ratledge and Kristiansen (2001)

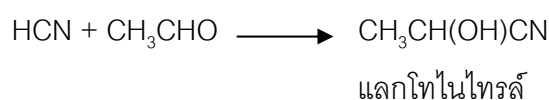
พบว่ากรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงสามารถเกิดเป็นผลึกแบบ monoclinic ที่ไม่มีสี กรดชนิดนี้เมื่อละลายน้ำจะมีสีเหลือง สามารถละลายน้ำได้ทุกส่วน และระเหยได้ยากในสารละลายที่มีกรดแลกติกเข้มข้นตั้งแต่ 20 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป รวมทั้งสามารถเกิดปฏิกิริยา self-esterification ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และ หมู่คาร์บอกซิล (-COOH)

2.1 การผลิตกรดแลกติก

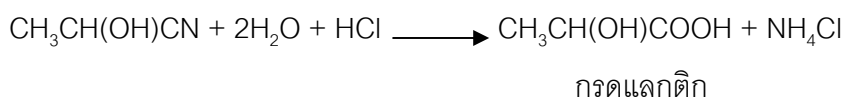
สามารถผลิตได้ 2 วิธีคือ การผลิตด้วยวิธีการทางเคมีและการผลิตด้วยวิธีการหมัก

2.1.1 การผลิตด้วยวิธีการทางเคมี แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นแรก นำกรดไซยานิกมาทำปฏิกิริยากับแอสिटัลดีไฮด์ ได้เป็นแลกโทไนไทรล์ ดังนี้



ขั้นที่สอง นำแลกโทโนไทรล์ที่ได้มาทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสกับกรดเกลือได้เป็นกรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียม ดังนี้



2.1.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการหมัก

กรดแลกติกสามารถผลิตด้วยวิธีการหมักโดยใช้แบคทีเรียกรดแลกติก โดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่สำคัญ ได้แก่ แบคทีเรียตระกูล *Lactobacillaceae* และ แบคทีเรียในจีนัส *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* พบว่าจีนัสเหล่านี้มีการนำไปใช้ในการผลิตกรดแลกติกอย่างกว้างขวางต่างกันไปตามสปีชีส์ เช่น *Lactobacillus casei* (Ha et al., 2003), *Lactobacillus delbrueckii* (Anuradha et al., 1999) และ *Lactobacillus helveticus* (Amrane and Prigent, 1999; Kulozik and Wilde, 1999; Tango and Ghaly, 1999) เป็นต้น *Leuconostoc* และ *Enterococcus faeculis* (Yun and Ryu, 2001) โดยแบคทีเรียกรดแลกติกจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็น diplococci, tetrads, streptococci และ rods ซึ่งอาจจะอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นสาย เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่มีการสร้างสปอร์ และส่วนมากจะเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และสามารถทนต่อความเป็นกรดสูงได้ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000) นอกจากนี้ พบว่ามีการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียกรดแลกติกกลายพันธุ์ *Lactobacillus delbrueckii* (Kadam et al., 2005) หรือการใช้เชื้อรา *Rhizopus oryzae* (Sun et al., 1999)

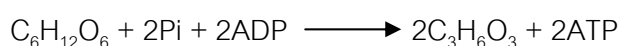
สารอาหารที่ใช้ในการเติบโตของแบคทีเรียกรดแลกติกและการผลิตกรดแลกติก เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับกระบวนการผลิตกรดแลกติก ได้แก่ แหล่งคาร์บอน ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด คือ น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอล์ และคาร์โบไฮเดรต แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์แต่ละสปีชีส์ ถ้าเป็นการเตรียมกล้าเชื้อ จะใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งจะไม่มีผลต่อความสามารถในการหมัก ส่วนใหญ่มักใช้กลูโคสบริสุทธิ์เพื่อทำให้ได้กรดแลกติกบริสุทธิ์ ซึ่งง่ายต่อการแยกและทำให้บริสุทธิ์ แต่ไม่เหมาะกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากกลูโคสบริสุทธิ์มีราคาแพง (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000) จึงได้มีการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน เช่น การใช้ฟรุกโทส (Yun and Ryu, 2001) การใช้แลกโทสในรูปแบบของหาง

นม (whey) (Kulozik and Wilde, 1999) การใช้แป้ง เช่น การใช้แป้งมันฝรั่ง (Anuradha *et al.*, 1999) หรือการใช้วัสดุราคาถูกจากการเกษตรที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (Oh *et al.*, 2005) รวมทั้งการใช้เซลล์จากน้ำเสีย (Nakasaki and Adachi, 2003) เป็นต้น สำหรับแหล่งไนโตรเจน มีการศึกษาการเติมยีสต์สกัด ซึ่งพบว่าเมื่อผลต่อการเติบโตและการผลิตกรดแลกติก (Ha *et al.*, 2003; Schepers *et al.*, 2002a และ Silva and Yang, 1992) วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ รวมทั้งสารช่วยในการเติบโต (growth substances) นอกจากนี้ ยังได้มีการศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมขององค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactobacillus amylophilus* GV6 ได้แก่ เปปโติน ยีสต์สกัด tri-ammonium citrate NaH_2PO_4 และ Tween 80 (Naveena *et al.*, 2005)

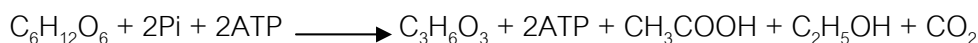
นอกจากนี้ อุณหภูมิและพีเอชก็เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตกรดแลกติก โดยใช้แบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละชนิดที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกจะมีช่วงต่างกันขึ้นอยู่กับจีโนมและสปีชีส์ของแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดนั้น ๆ เช่น จีโนม *Lactobacillus* ที่มีสปีชีส์ต่างกันก็จะมีช่วงของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตต่างกัน แบ่งเป็น 3 ช่วงใหญ่ ๆ คือ ช่วงอุณหภูมิ 28–32 องศาเซลเซียส ได้แก่ *Lactobacillus brevis*, *Lb. casei* และ *Lb. plantarum* ช่วงอุณหภูมิ 35–45 องศาเซลเซียส ได้แก่ *Lactobacillus fermenti*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus* และ *Lb. lactis* และช่วงอุณหภูมิ 45–65 องศาเซลเซียส ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* และ *Lb. thermophilus* โดย Kulozik and Wilde (1999) และ Tango and Ghaly (1999) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกโดย *Lactobacillus helveticus* คือ 42 องศาเซลเซียส เป็นต้น ส่วนพีเอช ได้มีการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดต่าง ๆ เช่น Fu and Mathews (1999) และ Kulozik and Wilde (1999) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตกรดแลกติกของ *Lb. plantarum* ประมาณ 5-6 และ *Lb. delbrueckii* มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 5.5 ตามลำดับ

การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการหมัก สามารถแบ่งตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้หมัก ได้ 2 แบบ คือ

(1) โฮโมเฟอร์เมนเทชัน คือ แบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลกติกได้ร้อยละ 70-90 ด้วยวิถีไกลโคไลซิส ซึ่งน้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไพรูเวต และมีเอนไซม์แลกเตตดีไฮโดรจีเนสเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นแลกเตต จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเทชันแสดงในตารางที่ 1 เรียกแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดนี้ว่า แบคทีเรียโฮโมแลกติก (homolactic bacteria) โดยกลูโคส 1 โมล จะได้แลกเตต 2 โมล ดังนี้



(2) เฮเทโรเฟอร์เมนเทชัน คือ แบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกได้น้อยกว่าร้อยละ 50 นอกจากนั้น จะได้เป็นเอทานอล กรดแอซีติก และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวิถีฟอสโฟคีโตเลส จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกแบบเฮเทโรเฟอร์เมนเทชันแสดงในตารางที่ 1 เรียกแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดนี้ว่า แบคทีเรียเฮเทโรแลกติก (heterolactic bacteria) หรืออาจแสดงสมการการเปลี่ยนกลูโคสเป็นแลกเตตง่าย ๆ ดังนี้



ตารางที่ 1 แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตกรดแลกติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเทชัน และเฮเทโรเฟอร์เมนเทชัน

โฮโมเฟอร์เมนเทชัน	เฮเทโรเฟอร์เมนเทชัน
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus kefer</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Pediococcus sp.</i>	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kašćák *et al.* (1996)

สามารถแสดงวิธีการสร้างและสลายน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งวิธีไกลโคไลซิสและวิธีฟอสโฟคีโตเลส ได้ดังภาพที่ 2

กรดแลกติกที่ผลิตด้วยวิธีการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลกติกมีอยู่ 3 รูป คือ L (+), D (-) หรือ DL แสดงกลไกการเกิดกรดแลกติกได้ดังภาพที่ 3 และจากการที่กรดแลกติกมีสูตรโครงสร้างทางเคมีต่างกันนั้น ทำให้กรดแลกติกมีคุณสมบัติต่างกัน (Vickroy, 1985) แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของกรดแลกติก

คุณสมบัติ	
Molecular weight	90.08
Melting point, D(-) หรือ L(+)	52.8-54.0 °C
Boiling point, DL	82 °C at 0.5 mmHg 122 °C at 14 mmHg
Dissociation constant (K_a at 25 °C)	1.37×10^{-4}
Heat of combustion	1,361 kJmol ⁻¹
Specific heat (C_p at 20 °C)	190 Jmol ⁻¹ °C

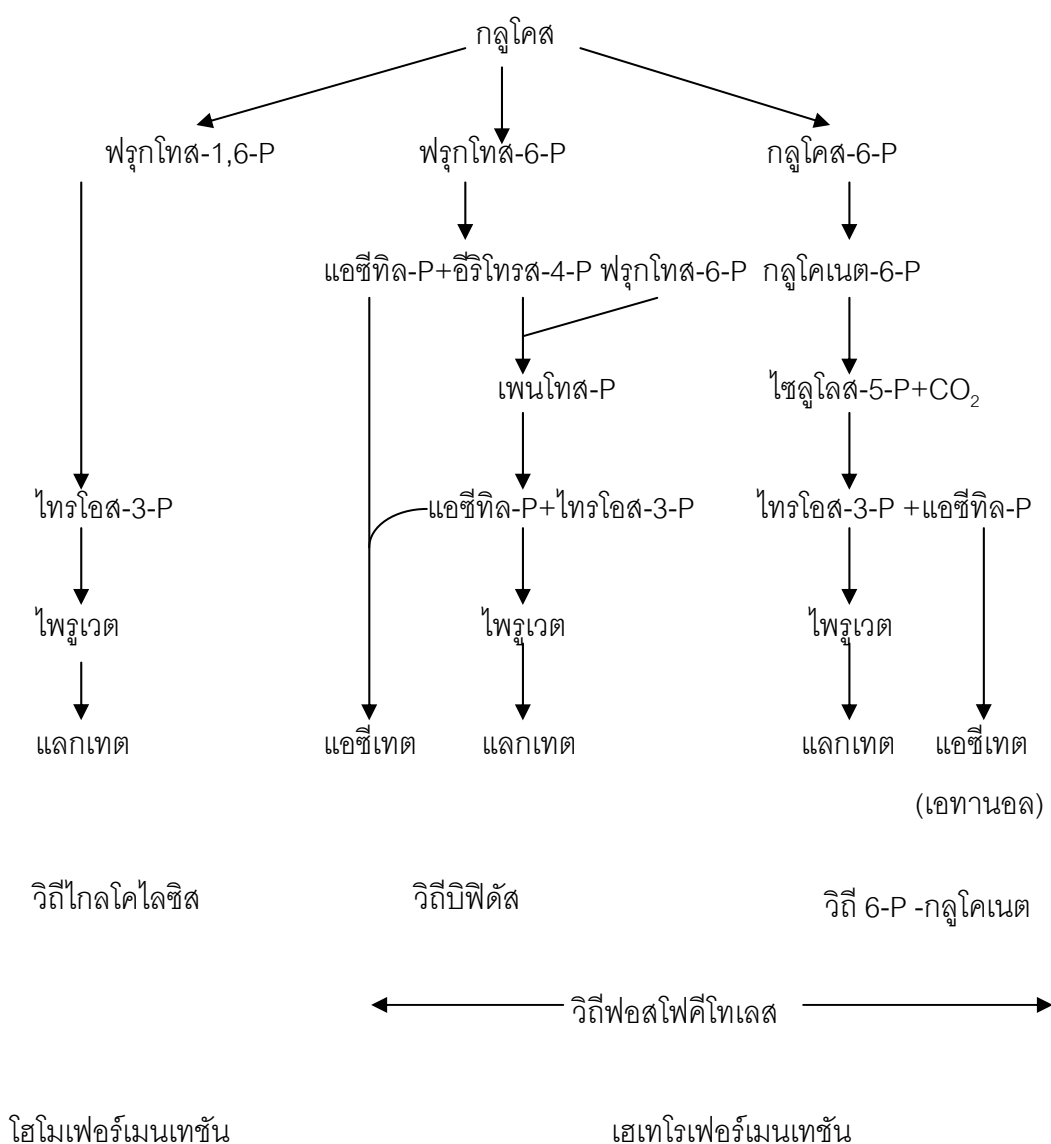
ที่มา: Vickroy (1985)

จากภาพที่ 3 อธิบายกลไกการเกิดกรดแลกติกได้ว่า กรดไพรูวิกจะถูกเปลี่ยนเป็น D (-) กรดแลกติก และ L (+) กรดแลกติก โดยเอนไซม์ D-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์ L-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ ซึ่ง D (-) กรดแลกติก และ L (+) กรดแลกติกจะถูกเปลี่ยนเป็น D (-) และ L (+) กรดแลกติก โดยเอนไซม์แลกเตตราเซเมส

พบว่าในเซลล์สัตว์และในมนุษย์ จะสามารถใช้กรดแลกติกในรูป L (+) ได้เท่านั้น เนื่องจากมีเอนไซม์ L-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส ส่วนในรูป D (-) หรือ DL นั้น องค์การอนามัย

โลก (WHO) กำหนดให้บริโภคได้ไม่เกิน 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัม/วัน เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ในการย่อย ซึ่งถ้าบริโภคมากเกินไปจะทำให้เกิดสภาพเป็นกรดสูงในปัสสาวะ

สามารถสรุปการผลิตกรดแลกติกด้วยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactococcus lactis* IO-1 และแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ



ภาพที่ 2 วิธีการสร้างกรดแลกติก

ที่มา: Buchta อ้างโดยสาโรจน์ (2544)

ตารางที่ 3 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactococcus lactis* IO-1

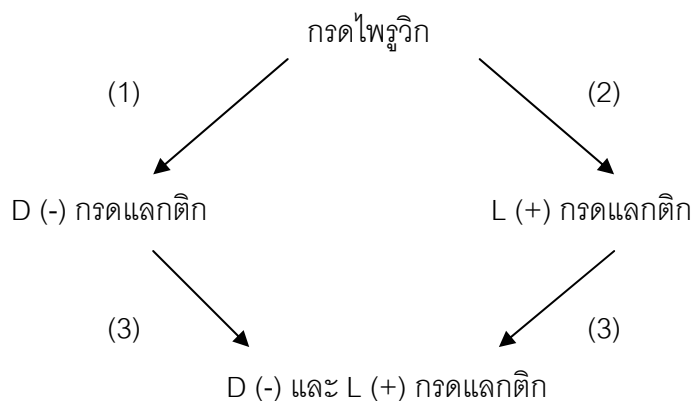
Fermentation system	C -sources	Conditions								References
		Substrate (g/l)	pH	Temp. (°C)	Agitation rate (rpm)	Dilution rate (h ⁻¹)	Lactic acid (g/l)	Y _{p/s} (g/g)	Q _p (g/l h)	
Batch	Sago starch hydrolysate	9.4 ¹	6	37	400	-	N/A	0.96	1.38	Sirisansaneeyakul <i>et al.</i> , 1998
Batch	Cassava starch hydrolysate	25.04 ¹	6	37	400	-	N/A	1.05	3.45	Sirisansaneeyakul <i>et al.</i> , 2000
Continuous with cell recycle and electrodyalysis	glucose	50	6	37	400	0.42	30-46	N/A	19	Isizaki <i>et al.</i> , 1996
Continuous with cell recycle	Sago starch hydrolysate	53 ¹	6	37	400	1.10	30.1	0.91	33.1	Nolasco-Hipolito <i>et al.</i> , 2002

หมายเหตุ ¹ กลูโคส, N/A หมายถึง ไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 4 การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลกติก

Microorganisms	Fermentation system	C -sources	Conditions								References
			Substrate (g/l)	pH	Temp. (°C)	Agitation rate (rpm)	Dilution rate (h ⁻¹)	Lactic acid (g/l)	Y _{p/s} (g/g)	Q _p (g/l h)	
<i>Lb. paracasei</i>	Batch	Wastewater sludge	23.4 ²	5	40	300	-	16.9	0.72	0.23	Nakasaki and Adachi, 2003
<i>Lb. rhamnosus</i>	Batch	Glucose	80	5.5	40	100	-	67	0.84	2.48	Berry <i>et al.</i> , 1999
<i>Lb. casei</i> supsp. <i>rhamnosus</i>	Batch	Glucose	30	6.0	45	N/A	-	27.8	0.89	2.78	Siebold <i>et al.</i> , 1995
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY 1	Batch	Fructose	N/A	7.0	38	200	-	144	0.96	4.12	Yun and Ryu, 2001
<i>Lb. helveticus</i>	Batch	Whey ultrafiltrate	55-60 ¹	5.8	42	N/A	-	N/A	N/A	35	Kulozik and Wilde, 1999
<i>Lb. helveticus</i> (ATCC15009)	Batch	Cheese whey permeate	48 ¹	N/A	42	150	-	10	0.38	N/A	Tango and Ghaly, 1999
<i>Lb. bulgaricus</i>	Continuous with cell recycle	Cheese whey permeate	100 ¹	5.6	45	N/A	0.25	89	0.89	22.5	Tejayadi and Cheryan, 1995
<i>Lb. rhamnosus</i> (ATCC 10863)	Continuous Two-stage	Glucose	105	6	42	N/A	N/A	92	N/A	57	Kwon <i>et al.</i> , 2001
<i>Lb. lactis</i> BME5-18M	Fed-batch	Glucose	50	6.5	37	100	N/A	161.2	N/A	2.02	Bai <i>et al.</i> , 2004

หมายเหตุ *Lb.* หมายถึง *Lactobacillus spp.* , ¹ แล็กโทส, ² เซลลูโลส, N/A หมายถึง ไม่มีข้อมูล



ภาพที่ 3 กลไกการเกิดกรดแลกติก

- (1) คือ เอนไซม์ D-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส
- (2) คือ เอนไซม์ L-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส
- (3) คือ เอนไซม์แลกเตตราเซเมส

ที่มา: ดัดแปลงจากสาริจน์ (2544)

2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก

อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ส่วนใหญ่จะใช้กรดแลกติกเป็นส่วนประกอบของอาหารและเครื่องดื่มโดยตรงในการปรุงแต่งให้เกิดรสเปรี้ยว ซึ่งให้รสเป็นกรดเล็กน้อยและไม่เกิดกลิ่นฉุนรุนแรง รวมทั้งช่วยในการปรับสภาพความเป็นกรดในอาหารและเครื่องดื่มทำให้พีเอชลดต่ำลงซึ่งช่วยในการป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารและเครื่องดื่ม โดยอาจจะใช้ร่วมกับกรดชนิดอื่น เช่น กรดพวอฟิอิก และกรดแอสซิติค เป็นต้น แต่พบว่ากรดแลกติกให้ประสิทธิภาพดีกว่า ดังตัวอย่างการใช้ในการยับยั้งการเติบโตของ *Lactobacillus coagulan* ในน้ำมะเขือเทศ (Davidson, 1997) นอกจากนี้ ยังมีการนำมาใช้ในอาหารแปรรูปและผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ด้วย (Vickroy, 1985)

ด้านการแพทย์

กรดแลกติกสามารถนำมาใช้เป็นสารที่ช่วยในการปรับพีเอช เพื่อใช้ผลิตเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกรดแลกติก นำมาประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำฝือกอ่อน และผลิตไหมเย็บแผลชนิดที่ย่อยสลายได้เอง ใช้เป็นสารห้ามเลือด ในระหว่างการถอนฟัน นอกจากนี้ ยังใช้ในรูปแบบของแคลเซียมไตรไฮเดรต (calcium lactate trihydrate) เพื่อเป็นแหล่งแคลเซียม สำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคขาดแคลเซียม และใช้ในรูปแบบของเอทิลแลกเตต (ethyl lactate) เพื่อใช้ในการผลิตยาแก้อักเสบ (anti-inflammatory)

อุตสาหกรรมพอลิเมอร์

ใช้กรดแลกติกเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตพอลิแลกเตต (polylactate) โดยใช้กรดแลกติกเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไดแลกไทล์ ซึ่งไดแลกไทล์จะถูกพอลิเมอร์ไรซ์เป็นพอลิแลกเตตที่มีคุณสมบัติที่ดีดังนี้คือ แข็งแรงและทนต่อความร้อนได้สูง สามารถขึ้นรูปและยืดหยุ่นได้ตลอดจนมีความโปร่งแสงที่ดี สามารถรองรับการพิมพ์ข้อความ สามารถผนึกปิดได้ด้วยความร้อน เพื่อใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ ทนต่อการพังทลาย รวมถึงป้องกันกลิ่นและรสชาติได้ พอลิเมอร์ชนิดนี้ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สามารถใช้แทนพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเพื่อเป็นการช่วยรักษาสภาพแวดล้อมได้ (สาโรจน์, 2544, 2546)

อุตสาหกรรมอื่น ๆ

กรดแลกติกสามารถใช้ในอุตสาหกรรมเคมี ผลิตภัณฑ์ภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ พรอพิลีน ไกลคอล กรดอะคริลิก เอสเทอร์ และผลิตภัณฑ์อนุพันธ์ อุตสาหกรรมฟอกหนัง ใช้กรดแลกติกช่วยในการล้างสารประกอบแคลเซียมออกจากหนังสัตว์ อุตสาหกรรมสิ่งทอ กรดแลกติกช่วยในการย้อม (Waites *et al.*, 2001) พิมพ์สีผ้า และช่วยทำให้เกิดความเงางามของผ้าไหม และผ้าไหมสังเคราะห์ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ใช้กรดแลกติกเป็นอีมัลซิฟายเออร์ (emulsifier) ในการผลิตยาปราบศัตรูพืช ยาฆ่าแมลง ใช้กรดแลกติกเป็นวัตถุดิบในการผลิต ทางด้านการเกษตรใช้พอลิแลกเตตเป็นฟิล์มช่วยรักษาความชื้นและความร้อนในดิน (Bozoglu and Ray, 1996) นอกจากนี้

ยังใช้กรดแลกติกในการควบคุมพีเอชในการผลิตสารเคลือบฟิล์ม (film coating bath) รวมทั้งการผลิตเรซินของฟีนอลฟอร์มาลดีไฮด์ (phenol-formaldehyde)

3. การตรึงเซลล์ (cell immobilization)

เซลล์ตรึง (immobilized cells) คือ เซลล์ที่ถูกจำกัดขอบเขตให้เคลื่อนที่อยู่ในบริเวณที่กำหนด โดยที่ไม่สูญเสียกิจกรรมของเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่นำมาตรึงนั้นอาจอยู่ในสภาพที่กำลังเติบโตอยู่ในระยะพักตัว (resting cells) หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (death cells) (สมใจ, 2001; Shuler and Kargi, 2002)

3.1 การคัดเลือกวัสดุพาหะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ (สมใจ, 2001) มีหลักเกณฑ์ดังนี้

3.1.1 สมบัติในการละลาย ควรเป็นสารที่ละลายได้ง่าย และสารที่ได้ควรมีความคงตัวอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

3.1.2 สมบัติในการเกิดเจล สารผสมที่ได้ควรเกิดเจลได้ง่ายในสภาวะปกติและไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์

3.1.3 สมบัติของเจล เจลที่ได้ควรมีความแข็งแรง มีความคงตัวสูง และรูที่อยู่ภายในเจลควรมีขนาดเล็กพอที่จะป้องกันการรั่วไหลของเซลล์ได้ ในขณะเดียวกัน สับสเทรตและผลิตภัณฑ์สามารถซึมผ่านได้อย่างอิสระ

มีการนำเอาเทคนิคการตรึงเซลล์มาใช้ในการผลิตกรดแลกติก โดยใช้วัสดุพาหะต่าง ๆ กัน ในการตรึงเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติก Norton *et al.* (1994) และ Schepers *et al.* (2006) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *Lactobacillus helveticus* ซึ่งเป็นการตรึงเซลล์ในโครงข่ายแคปปา-คาร์ราจีแนน (K-carrageenan) และโลคัสบีนกัม (locust bean gum) Roukas and Kotzekidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *Lactobacillus casei* และ *Lactococcus lactis* ในโครงข่ายแอลจีเนต Yoo *et al.* (1996) และ Dembczynski and Jakowski (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *Lactobacillus casei* ในเยื่อแซนแทนกัม (xanthan gum) และเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus* ในเยื่อแอลจีเนต และ

Mostafa (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงในโครงข่ายของวุ้น (agar) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม พบว่าวัสดุพหุพหุที่ใช้มากได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์, แคปตา-คาร์ราจีแนน และแอลจินเนต ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวัสดุพหุพหุที่ใช้ในการตรึงเซลล์

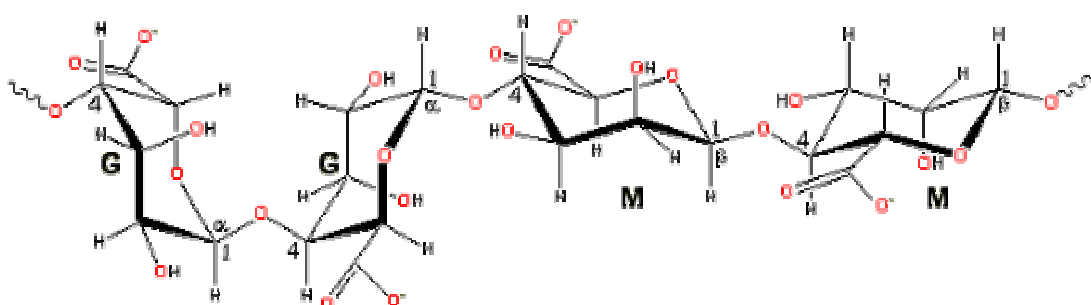
วัสดุพหุพหุ	ข้อดี	ข้อเสีย
พอลิอะคริลาไมด์	มีขนาดของรูกว้าง เจลมีความแข็งแรง	เป็นพิษ เกิดอนุภาคอิสระ ทำลายเซลล์
แคปตา-คาร์ราจีแนน	เป็นวัตถุดิบที่ใช้กับอาหาร ได้เจลที่มีความแข็งแรงดี รักษากิจกรรมของเซลล์	ต้องอาศัยความร้อนใน การเกิดเจล มีผลทำให้ เซลล์ตาย
แอลจินเนต	เป็นวัตถุดิบที่ใช้กับอาหาร ได้เจลที่มีความแข็งแรงดี ไม่ต้องใช้ความร้อนใน กระบวนการเกิดเจล รักษากิจกรรมของเซลล์	ไม่คงตัวเมื่ออยู่ในสาร ละลายประเภท chelating agent

ที่มา: Chibata (1982)

3.2 แอลจินเนต (Alginate)

แอลจินเนตเป็น polyuronic acid ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล เป็นโคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโครงสร้างของ β -D-manuronic acid และ α -L-guluronic acid เชื่อมกันด้วย พันธะ β และ α ตามลำดับ แสดงโครงสร้างของแอลจินเนตดังภาพที่ 4 แอลจินเนตสามารถเกิดเจลชนิดไอโอโนโทรปิกในสารละลายแคลเซียมไอออน หรือสารละลายที่เป็น multivalent cation เช่น Ba^{2+}

Cu^{2+} หรือ Al^{3+} เป็นต้น เกิดเป็นเจลที่เป็นโครงร่างสามมิติที่มีความหนืด และสามารถดักจับเซลล์ไว้ภายในที่สภาวะไม่รุนแรง และพบว่าไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ (ภาวิณี, 2531; Brodelius and Vandamme, 1987; Fukuda, 1995)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของแอลจินेट

ที่มา: Chaplin (2005)

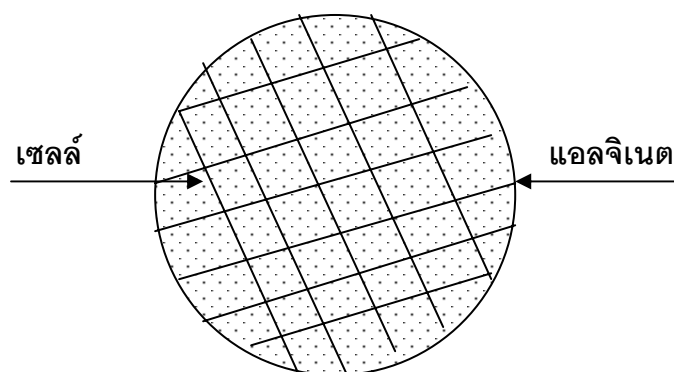
คุณสมบัติของเจลที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของ D-manuronic acid และ L-guluronic acid ในพอลิเมอร์ น้ำหนักโมเลกุล และระดับการกระจายตัว พบว่าเจลของแอลจินेटที่คงตัว ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยสัดส่วนของ guluronic acid สูง และความเข้มข้นของพอลิเมอร์สุดท้ายในเจลจะมีช่วงระหว่าง 1–5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นกับปริมาณของแอลจินेटที่ใช้ในการเตรียม (Brodelius and Vandamme, 1987; Jane and Gordon, 1997)

แอลจินेटถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมต่าง ๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติช่วยให้เกิดลักษณะเหนียวข้น เกิดความคงตัว การเกิดฟิล์มที่ผิว และเป็นอิมัลซิฟายเออร์ช่วยในการละลาย รวมทั้งแอลจินेटเป็นสารที่ปลอดภัย ไม่เป็นพิษ และราคาถูกจึงเหมาะจะใช้ในขั้นตอนของการผลิต (Gemeiner *et al.*, 1994)

3.3 การตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจินेट (entrapment)

Entrapment เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ตรึงเซลล์ได้ดี (ภาวิณี, 2531) และเป็นวิธีที่ใช้อย่างกว้างขวางกับเซลล์จุลินทรีย์ (Shuler and Kargi, 2002) โดยเซลล์จะเข้าไปอยู่ในโครงข่ายตาข่ายของแอลจินेट ซึ่งเป็นการเกิดเจลแบบไอโอโนโทรปิก (ionotropic gel) ของโมเลกุลแอลจินेट

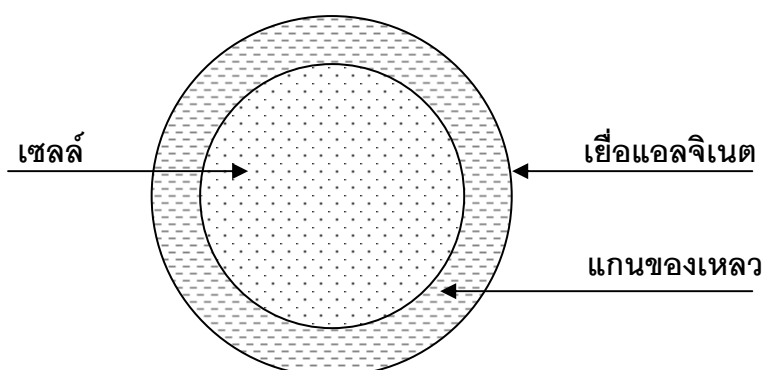
กับ multivalent cation (Fukuda, 1995) ซึ่งต้องมีโครงสร้างที่หนาแน่นพอที่จะป้องกันการรั่วออกมาของเซลล์ ขณะเดียวกันสับสเทรตและผลิตภัณฑ์จะต้องสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้เป็นอย่างดี รวมถึง เซลล์ที่อยู่ภายในโครงร่างตาข่ายนั้น สามารถที่จะมีชีวิตและเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ แสดงการตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจีเนตดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจีเนต (entrapment)

3.4 การตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจีเนต (encapsulation)

Encapsulation เป็นการตรึงเซลล์ที่คล้ายกับวิธีการตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจีเนต แตกต่างตรงที่การตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจีเนตสารละลายเซลล์จะถูกหุ้มด้วยเยื่อของแอลจีเนต โดยเซลล์ที่อยู่ภายในสามารถมีชีวิตและเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ ซึ่งเยื่อของแอลจีเนตจะทำหน้าที่เป็นเยื่อหุ้ม (membrane) มีคุณสมบัติเป็นเยื่อซึมผ่านได้ (semipermeable membrane) สับสเทรตหรือผลิตภัณฑ์สามารถผ่านเข้าออกได้ (Gordon, 1997) แสดงการตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจีเนตดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 การตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจิเนต (encapsulation)

3.5 ข้อดีของการตรึงเซลล์

การใช้เซลล์ตรึงทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ต่อหน่วยปริมาตรของถังหมักสูงขึ้น ซึ่งเป็นการช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ อีกทั้งการใช้เซลล์ตรึงนั้นช่วยลดภาวะการเกิด wash out ทำให้สามารถทำการหมักที่ความเข้มข้นของเซลล์สูงและอัตราการเจือจางสูงได้พร้อม ๆ กัน ทำให้ได้อัตราการผลิตเชิงปริมาตรสูงขึ้น

ในแง่ของการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์นั้น การใช้เซลล์ตรึงจะทำได้ง่ายต่อการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์ เป็นการช่วยลดต้นทุนในกรรมวิธีทำยกระแส (downstream processing) อีกทั้งสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้งานซ้ำได้เป็นเวลานาน

นอกจากนี้ การใช้เซลล์ตรึงยังง่ายต่อการจัดสภาพที่เหมาะสมในการหมัก และในบางกรณีการตรึงเซลล์ยังช่วยป้องกันการถูกทำลายของเซลล์จากแรงเฉือน (shear stress)

3.6 การประยุกต์ใช้เซลล์ตรึง

เซลล์ตรึงสามารถนำมาใช้ในการผลิตสารอินทรีย์ เช่น การผลิตกรดอะมิโน กรดอินทรีย์กรดนิวคลีอิก สารปฏิชีวนะ ฮอริโมน และน้ำตาล เป็นต้น ในการวิเคราะห์ทางคลินิกและทางเคมี เช่น ตัวรับรู้ชีวภาพ (microbial sensor) สำหรับโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์

ชีวภาพ (biodegradable polymer) และการศึกษากลไกปฏิกิริยาของเอนไซม์ ยังมีการใช้เซลล์ตรึงในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตเนยแข็ง และการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น ในทางการแพทย์ประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงในการผลิตอวัยวะเทียม โดยใช้เซลล์ตรึงสำหรับการทำสารประกอบทางชีวภาพให้บริสุทธิ์ และใช้ในการแยกและวิเคราะห์เอนไซม์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี สัมพรรคภาพ (affinity chromatography) นอกจากนี้ ยังใช้เซลล์ตรึงในการย่อยสลายพินอล และไซยาไนด์สำหรับบำบัดน้ำเสีย (Chibata, 1982)

การนำเซลล์ตรึงมาใช้นั้นควรคำนึงถึงความปลอดภัย ความสะดวกในการเตรียม ความมีชีวิตของเซลล์ ความประหยัด และประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงจะต้องไม่ด้อยกว่าการใช้เซลล์อิสระ

3.7 การใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ในกระบวนการผลิตกรดแลกติก

Tango and Ghaly (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus helveticus* ในถังหมักแบบ packed bed พบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 3.9 กรัม/ลิตร ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแลคโทส 100 กรัม/ลิตร และ hydraulic retention time 18 ชั่วโมง

Roukas and Kotzekidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากหางนมโดยใช้ระบบเชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus casei* และ *Lactococcus lactis* แบบเซลล์อิสระและแบบเซลล์ตรึงในการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (batch) และแบบครั้งคราว (fed-batch) เมื่อควบคุมให้ความเข้มข้นสับสเทรตของกระบวนการหมักแบบครั้งคราวเท่ากับ 100 กรัม/ลิตร และอัตราการเติมอาหารใหม่ 250 มิลลิลิตร/ชั่วโมง พบว่าทั้งระบบเชื้อผสมแบบเซลล์อิสระและแบบเซลล์ตรึงแบบครั้งคราว มีประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกดีกว่าในกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของกรดแลกติกเท่ากับ 46 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ ยังพบว่าระบบเชื้อผสมแบบเซลล์ตรึงสามารถทำการผลิตได้นานถึง 20 วัน โดยมีความเข้มข้นรวมของกรดแลกติกมากกว่าระบบเชื้อผสมแบบเซลล์อิสระ

Mostafa (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องจากหางนม ด้วยเซลล์ตรึงในถังหมักแบบ packed tubular ควบคุมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเจือจาง 0.33 ต่อชั่วโมง ที่มีระบบหมุนเวียนเซลล์และไม่มีระบบหมุนเวียนเซลล์ พบว่าอัตราการผลิตเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 9.36 และ 7.28 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

Senthuran *et al.* (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากหางนมแบบเบ็ดเสร็จระบบหมุนเวียนเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 100 กรัม/ลิตร โดยการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* พบว่า สามารถใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลได้สูง และให้อัตราการผลิตกรดแลกติก 4.3 ถึง 4.6 กรัม/ลิตร ชั่วโมง และพบว่าการลดความเข้มข้นของยีสต์สกัดทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง แต่ไม่มีผลต่ออัตราการผลิตของกรดแลกติก และยังสามารถเพิ่มจำนวนรอบของการหมักได้ นอกจากนี้ พบว่าการใช้เซลล์ตรึงช่วยให้เซลล์สามารถทนต่อความเข้มข้นสูงของกรดแลกติกที่ผลิตขึ้น และเซลล์ตรึงที่ได้สามารถนำมาใช้ผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่มีสารอาหารจำกัดได้

Boyaval and Goulet (1988) ศึกษาสภาวะการผลิตกรดแลกติกจากหางนมที่ได้จากการผลิตเนยแข็งด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus helveticus* ในถังหมักแบบ packed bed เมื่อเปรียบเทียบกับระบบเซลล์อิสระ ที่ระดับพีเอชที่เหมาะสม พบว่า ระบบเซลล์ตรึงจะมีการผลิตกรดแลกติกดีกว่าระบบเซลล์อิสระ ส่วนที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส พบว่าทั้ง 2 ระบบให้ผลไม่ต่างกัน แต่เมื่อศึกษาเสถียรภาพของเซลล์ต่อความร้อน พบว่า เซลล์อิสระมีความคงตัวดีกว่าเซลล์ตรึงสามารถสรุปการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงดังตารางที่ 6

4. แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกด้วยกรรมวิธีการหมัก

การศึกษาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของกระบวนการหมัก เป็นเครื่องมือที่ช่วยอธิบายถึงโครงสร้างองค์ประกอบ และผลกระทบที่มีผลต่อกระบวนการหมัก ทำให้สามารถเข้าใจกลไกการหมักได้มากขึ้น ช่วยในการออกแบบการทดลอง คาดเดาผลจากการทดลอง และปัจจัยที่ต้องควบคุม โดยผ่านกระบวนการเลียนแบบ (simulation) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากไม่ต้องทำการทดลองจริง นอกจากนี้ ยังสามารถทำการหาค่าที่เหมาะสม (optimization) ของพารามิเตอร์อย่างน้อย 2 ตัว หรือมากกว่านั้น เพื่อให้ได้ผลได้ของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูง นำมาซึ่งผลกำไร รวมทั้งเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์อย่างง่ายของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง

การหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง เป็นการประยุกต์ใช้เซลล์ที่ไม่มีภาวะของการเติบโต (resting cells) แตกต่างจากการใช้เซลล์อิสระที่เซลล์มีการใช้กลูโคสเพื่อการเติบโต (growing cells) เพราะฉะนั้นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์อย่างง่ายที่ใช้อธิบายการผลิตกรดแลกติกจากกลูโคสด้วยเซลล์ตรึง จึงพิจารณาเฉพาะสมดุลมวลของการใช้กลูโคสและการผลิตกรดแลกติกเท่านั้น โดยที่อัตราการใช้กลูโคส (r_s) ขึ้นอยู่กับอัตราการผลิตกรดแลกติก (r_p) และการใช้กลูโคสเพื่อบำรุงรักษาเซลล์ (m_s) ส่วนอัตราการผลิตกรดแลกติก (r_p) ขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์เริ่มต้น (X_0) และความเข้มข้นกลูโคส (S) โดยอัตราจำเพาะของการผลิตกรดแลกติก (q_p) มีจลนพลศาสตร์อิมิตแบบสมการ Monod โดยปริมาณเซลล์เริ่มต้นแสดงภาวะยับยั้งการผลิตกรดแลกติกที่สามารถแสดงด้วยพจน์ $\left(1 - \frac{X_0}{X_m}\right)^n$ ดังสมการสมดุลต่อไปนี้

การใช้สับสเทรต

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_{P/S}} r_p + m_s X_0 \right) \quad (1)$$

การผลิตกรดแลกติก

$$\frac{dP}{dt} = q_p X_0 \left(1 - \frac{X_0}{X_m} \right)^n \quad (2)$$

เมื่อ

$$q_p = \frac{q_p^m S}{K_S^p + S} \quad (3)$$

ตารางที่ 6 การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์รีแบคทีเรียกรดแลกติก

Microorganisms	Materials	Fermentation system	C-sources	Substrate (g/l)	Lactic acid (g/l)	Y _{P/S} (g/g)	Q _p (g/l h)	References
<i>Lb. rhamnosus</i>	Alginate	Batch	Sweet whey powder	65 ¹	N/A	0.88	0.63	Dembczynski and Jankowski, 2002
<i>Lb. casei</i>	Alginate	Repeat batch	glucose	70	N/A	N/A	> 2.7	Yoo <i>et al.</i> , 1996
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Pora-Bact A	Recycle batch	Whey hydrolysate	40 ¹	N/A	0.90	4.6	Senthuran <i>et al.</i> , 1997
<i>Lb. casei</i> and <i>L. lactis</i>	Alginate	Fed batch	Cheese whey permeate	100 ¹	46	0.77	1.91	Roukas and Kotzekidou, 1998
<i>Lb. helveticus</i>	Alumina	Continuous	Cheese whey permeate	100 ¹	N/A	0.855	3.90	Tango and Ghaly, 2002
<i>Lb. helveticus</i>	K-carrageenan and Locst bean gum	Continuous (1.21 h ⁻¹)	Whey permeate	48-50 ¹	N/A	N/A	28.5	Norton <i>et al.</i> , 1994
<i>Lb. helveticus</i>	Agar	Continuous with cell recycle (0.33 h ⁻¹)	Cheese whey permeate	N/A	N/A	N/A	9.36	Mostafa, 1996

หมายเหตุ *Lb.* หมายถึง *Lactobacillus spp.*, ¹ แล็กโทส, N/A หมายถึง ไม่มีข้อมูล

5. การออกแบบการทดลองโดยวิธี Taguchi

วิธี Taguchi เป็นวิธีออกแบบการทดลองที่พัฒนาโดย Dr. Genichi Taguchi เมื่อปี ค. ศ. 1980 เพื่อใช้ในการหาค่าที่เหมาะสมของกระบวนการทางวิศวกรรม โดยมีความต้องการที่จะพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ หรือกระบวนการผลิตให้ได้ตามที่กำหนดไว้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ วิธี Taguchi มีการออกแบบการทดลองโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ fractional factorial ร่วมกับ orthogonal array (OA) (Box *et al.*, 1988) ซึ่งเป็นตารางที่ประกอบไปด้วยการทดลองและระดับของแฟกเตอร์ในแต่ละการทดลอง มีหลายประเภทขึ้นกับจำนวนแฟกเตอร์และระดับของแฟกเตอร์นั้น โดย OA จะมีจำนวนน้อยที่สุดเท่ากับ L_4 (Lochner and Matar, 1990) แสดงตัวอย่าง OA (L_4) ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 L_4 Orthogonal array

การทดลอง	แฟกเตอร์		
	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ross (1996)

การวัดค่าในวิธี Taguchi จะแสดงในรูปของ Signal/Noise ratio (S/N ratio) ซึ่งถูกใช้เพื่อวัดอิทธิพลของ noise factor (ตัวแปรที่ไม่สามารถควบคุมได้ในกระบวนการ) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ หรือกระบวนการ โดยอาศัยการวัดลักษณะของคุณภาพ (quality characteristic, QC) ซึ่งสามารถแสดงถึงความต้องการการเปลี่ยนแปลงของผลการทดลองที่ต้องการต่างกันออกไป ประกอบด้วย 3 รูปแบบ ดังนี้

1. QC = B Bigger is better

$$S/N \text{ ratio} = -10 \log \left(\frac{\sum \left(\frac{1}{y} \right)^2}{N} \right) \quad (4)$$

2. QC = S Smaller is better

$$S/N \text{ ratio} = -10 \log \left(\frac{\sum y^2}{N} \right) \quad (5)$$

3. QC = N Nominal is best

$$S/N \text{ ratio} = -10 \log \left(\frac{\sum (y - y_0)^2}{N} \right) \quad (6)$$

โดย y , y_0 และ N หมายถึง ผลการทดลอง ผลการทดลองที่กำหนด และจำนวนการทดลองตามลำดับ

นอกจากนี้ วิธี Taguchi ยังนำเอาการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) มาใช้เพื่อพิจารณาอิทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่อการทดลองที่ได้

5.1 ขั้นตอนการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Taguchi ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน (Roy, 2001) ดังนี้

5.1.1 การวางแผนการทดลอง (planning experiment) เป็นขั้นตอนกำหนดจุดประสงค์ที่ต้องการ รวมทั้งพิจารณาแฟกเตอร์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบ

5.1.2 การออกแบบการทดลอง (designing experiment) เป็นขั้นตอนของการกำหนดหรือเลือก OA ที่เหมาะสมกับระบบ รวมทั้งกำหนดแฟกเตอร์และระดับของแฟกเตอร์

5.1.3 การทำการทดลอง (conducting experiment) เป็นขั้นตอนของการทำการทดลองตามสภาวะของแฟกเตอร์และระดับของแฟกเตอร์ที่กำหนดใน OA

5.1.4 การวิเคราะห์ผลการทดลอง (analysing experiment) เป็นขั้นตอนของการพิจารณาผลของแฟกเตอร์ และระดับของแฟกเตอร์ว่าแฟกเตอร์ใดมีผลความสำคัญกับระบบ รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบที่ทำให้ได้ผลได้สูงที่สุด

5.1.5 การทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง (confirming or predicted) เป็นขั้นตอนของการพิสูจน์ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อระบบที่หาได้นั้น มีความเหมาะสม และได้ผลได้ตามที่ต้องการจริงหรือไม่ รวมทั้งใช้สภาวะนั้นศึกษาผลที่เกิดขึ้นต่อระบบ

5.2 ข้อดีของวิธี Taguchi

วิธี Taguchi ใช้จำนวนการทดลองน้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี one-factor-at-a-time และ full factorial combination ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย สามารถบ่งบอกถึงแฟกเตอร์ที่มีผลต่อผลิตภัณฑ์ และกระบวนการผลิต ทำให้แก้ปัญหาได้เร็วและตรงจุดยิ่งขึ้น นอกจากนี้พบว่าวิธี Taguchi สามารถนำมาใช้ในการวางแผนการทดลองของกระบวนการทางการเกษตรและกระบวนการทางชีวภาพได้ (Tsui, 1988)

5.3 การใช้วิธี Taguchi สำหรับออกแบบการทดลอง

Nagarjun *et al.* (2005) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกด้วย *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 โดยอาศัยวิธี Taguchi ในการออกแบบการทดลองซึ่งประกอบด้วย 8 แฟกเตอร์ คือ อุณหภูมิ, พีเอช, ปริมาณกล้ำเชื้อ, ปริมาณความชื้น, ปริมาณยีสต์สกัด, ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต, ปริมาณ Tween 80 และ ปริมาณ corn steep liquor โดย

อาศัย $L_{18} (2^1 \times 3^7)$ orthogonal array พบว่าการผลิตกรดแลกติกภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้ผลได้กรดแลกติกสูงขึ้นเท่ากับ 93.50 เปอร์เซ็นต์

Prasad *et al.* (2005) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์แลกเคสด้วย *Pleurotus ostreatus* 1804 โดยอาศัย Taguchi ในการออกแบบการทดลองซึ่งประกอบด้วย 8 แฟกเตอร์ คือ พีเอช, ปริมาณกลูโคส, ปริมาณ wheat bran, ปริมาณยูเรีย, ปริมาณกล่ำเชื้อ, ปริมาณยีสต์สกัด, ปริมาณของตัวเหนียวน้ำ และปริมาณ KH_2PO_4 โดยอาศัย $L_{18} (2^1 \times 3^7)$ orthogonal array พบว่าการผลิตเอนไซม์แลกเคสภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะได้กิจกรรมของเอนไซม์แลกเคสเพิ่มขึ้น 32.9 เปอร์เซ็นต์ จาก 538.8 เป็น 803.3 หน่วย

Rao *et al.* (2004) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอลด้วย *Candida sp.* โดยวิธี Taguchi ประกอบด้วย 8 แฟกเตอร์คือ อุณหภูมิ, พีเอช, ปริมาณ corn steep liquor, ปริมาณกล่ำเชื้อ, ปริมาณไซโลส, ปริมาณยีสต์สกัด, อัตราการกวน และปริมาณ KH_2PO_4 โดยอาศัย $L_{18} (2^1 \times 3^7)$ orthogonal array พบว่าการผลิตไซลิทอลภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะได้ผลได้ไซลิ-ทอลสูงขึ้นเท่ากับ 78.90 เปอร์เซ็นต์

Dasu *et al.* (2003) ศึกษาผลของพารามิเตอร์ต่อการผลิต griseofulvin แบบเบ็ดเสร็จ ด้วย *Penicillium griseofulvum* MTCC 1898 ในถังหมัก โดยอาศัยวิธี Taguchi ในการออกแบบการทดลองซึ่งประกอบด้วย 7 แฟกเตอร์ คือ ปริมาณซูโครส, ปริมาณ K_2HPO_4 , ปริมาณ NaNO_3 , ปริมาณ FeSO_4 , พีเอช, อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ โดยอาศัย $L_8 (2^7)$ orthogonal array พบว่า พารามิเตอร์ทางกายภาพ ซึ่งประกอบด้วย พีเอช อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ มีอิทธิพลต่อการผลิต griseofulvin อย่างมีนัยสำคัญ

อุปกรณ์และวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถังหมัก (Biostat B, B. Braun Biotech International, Germany) ขนาด 2 ลิตร พร้อมระบบควบคุมการกวน ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ
2. เครื่องสูบบแบบ Peristaltic pump (AC-2110, Perista[®] Pump, Chromatograph Atto, Japan)
3. เครื่องสูบบแบบ Roller pump (RP-1000 และ RP-2000, Eyela, Japan)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Micro Centrifuge); (Spectrafuge 16 M, Labnet, USA และ Sigma 203, B. Braun Biotech International, Germany)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Refrigerated Centrifuge); (Sorvall RC26 Plus, USA)
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer); (UV-1201, Shimadzu Corporation, Japan)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath); (280 series water bath, Pricision, USA)
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Water bath shaker); (Unithermo Shaker NTS-1300, Eyela, Japan)
9. เครื่องกวน (Hotplate and Stirrer); (Schott, Scientific Promotion, Germany)
10. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter); (M-11, Horiba, Japan)
11. Aspirator pump (A-3S, Eyela, Japan) พร้อมชุดกรอง
12. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator); (Mettler, Germany)
13. เครื่องชั่ง (Balance); (Sartorius CP 323S, Scientific Promotion, Germany)
14. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave); (Labo Autoclave, Sanyo, Japan)
15. เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับการทดลองและวิเคราะห์
16. เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์ (Celeron[®], CPU 2.20 GHz, 256 MB of RAM, Intel[®])
17. โปรแกรม MATLAB[™] Toolbox of Genetic Algorithm for Optimization.

สารเคมีที่ใช้ในการตรึงเซลล์

1. Alginic acid sodium salt (A-7128, Sigma, USA)
2. Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) (Fluka)
3. Calcium chloride (A127, Ajax Finechem, Australia)

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก คือ *Lactococcus lactis* IO-1 ที่แยกโดย Ishizaki *et al.* (1990a) เก็บรักษาไว้ที่ Bangkok MIRCEN ประเทศไทย ภายใต้รหัสของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) คือ *Lactococcus lactis* IO-1 TISTR 1401

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเป็น stock culture ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลว thioglycolate (TGC) medium (Difco)

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการเตรียมกล้าเชื้อ การเตรียมเซลล์ และการผลิตกรดแลกติก ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ประกอบด้วย peptone 10 กรัม, beef extract 10 กรัม, yeast extract 5 กรัม, K_2HPO_4 2 กรัม, sodium acetate 5 กรัม, tri-ammonium citrate 2 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.2 กรัม, Tween 80 1 มิลลิลิตร และ glucose 10 กรัม หรือแปรผันตามการทดลอง

การเตรียมกล้าเชื้อ

นำ stock culture จำนวน 250 ไมโครลิตร ถ่ายลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและส่วนสูงเท่ากับ 16x150 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกล้าเชื้อดังกล่าวจำนวน 250 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มี

ความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรอีกครั้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นก้ำเชื้อสำหรับการเตรียมเซลล์ต่อไป

การเตรียมเซลล์

เติมก้ำเชื้อที่เตรียมได้ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) จากหลอดทดลอง 2 หลอด ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 190 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบนิ่ง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะได้น้ำหมักที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.66 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นจึงนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อัตราเร็ว 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำเซลล์ที่ได้มาเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ปริมาตรแปรผันไปตามแต่ละการทดลอง) เพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเซลล์ หรือใช้เซลล์เปียกโดยตรง สำหรับใช้ในการเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต หรือการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต ตามลำดับ สามารถสรุปการเตรียมเซลล์ของแต่ละการทดลองได้ดังนี้

การศึกษาเบื้องต้นการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในโครงข่ายแอลจิเนตระดับฟลาस्क เตรียมเซลล์ดังวิธีการข้างต้น โดยเติมก้ำเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 190 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 17 ฟลาस्क ใช้สำหรับศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์อิสระ 1 ฟลาस्क และใช้สำหรับศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง 1, 5 และ 10 ฟลาस्क ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.132, 0.66 และ 1.32 กรัม ตามลำดับ

การศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในโครงข่ายแอลจิเนต และในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบกวน เตรียมเซลล์ดังวิธีการข้างต้น โดยเตรียมก้ำเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร จำนวน 1 ฟลาस्क และ 175 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาस्क ลงในฟลาस्कขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 2.85 ลิตร จำนวน 1 ฟลาस्क และ 3.325 ลิตร จำนวน 2 ฟลาस्क เตรียมทั้งหมด 2 ชุด เพื่อใช้ในการศึกษา 2 ข้ำ สำหรับตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจิเนตและในเยื่อแอลจิเนต ตามลำดับ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ระดับพลาสติกด้วยวิธี Taguchi เตรียมเซลล์ดังวิธีการข้างต้น โดยเตรียมกล้าเชื้อปริมาตร 180 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ ลงในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 3.42 ลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ เตรียมทั้งหมด 2 ชุด เพื่อใช้ในการศึกษา 2 ซ้ำ สำหรับตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจิเนตและในเยื่อแอลจิเนต สำหรับการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi เตรียมเซลล์ดังวิธีการข้างต้น โดยเตรียมกล้าเชื้อปริมาตร 40 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ ลงในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 760 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์

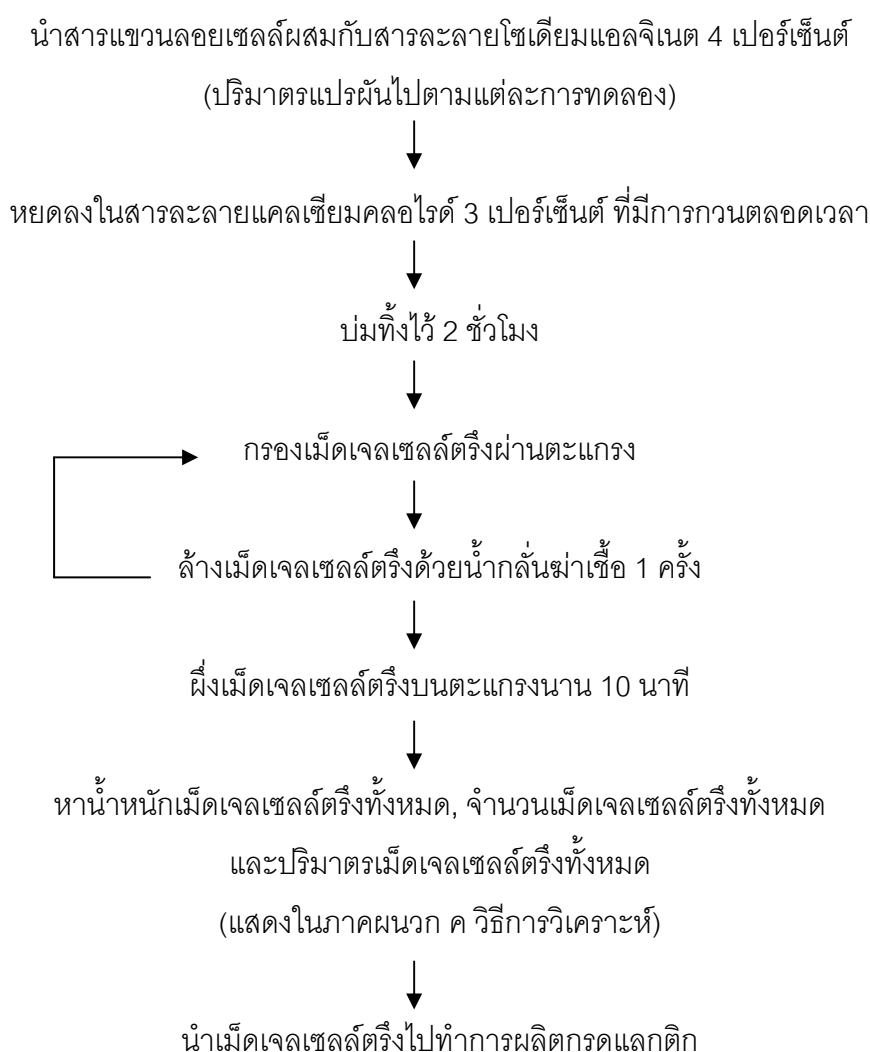
การผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed เตรียมเซลล์ดังวิธีการข้างต้น โดยเตรียมกล้าเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ ลงในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 3.8 ลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์

การเตรียมเซลล์ในการศึกษาข้างต้นทั้งหมด ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบนิ่งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะได้น้ำหมักที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.66 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นจึงนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อัตราเร็ว 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อ ใช้เซลล์ที่ได้เตรียมสารแขวนลอยเซลล์ หรือใช้เซลล์เปียกโดยตรง สำหรับใช้ในการเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต หรือการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต ตามลำดับ

การเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต (ดัดแปลงจาก Jane and Gordon, 1997)

เตรียมเซลล์ตรึงโดยการนำสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมได้ข้างต้นมาผสมกับสารละลายไฮเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรแปรผันไปตามแต่ละการทดลอง) หยดสารผสมนี้ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สายยางซิลิโคนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4x7 มิลลิเมตร และเข็มฉีดยาขนาด 1.2x25 มิลลิเมตร โดยการปั๊ม (AC-2110, Perista pump, Chromatograph Atto, Japan) ควบคุมอัตราการไหลคงที่เท่ากับ 0.06 ลิตร/ชั่วโมง บ่มเม็ดเจลเซลล์ตรึงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

จากนั้นกรองเม็ดเจลเซลล์ที่ได้อันผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว ล้างเม็ดเจลเซลล์
 ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำเม็ดเจลเซลล์ที่ได้อัน
 น้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเปียกของเม็ดเจลเซลล์ตริงทั้งหมด, จำนวนของเม็ดเจลเซลล์ตริงทั้งหมด
 และปริมาตรของเม็ดเจลเซลล์ตริงด้วยการแทนที่น้ำ แสดงในภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ โดยทุก
 ขั้นตอนทำภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ นำเม็ดเจลเซลล์ตริงที่ได้ไปใช้ในการผลิตกรดแลกติกต่อไป
 แสดงขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตริงในโครงข่ายแอลจีเนตดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตริงในโครงข่ายแอลจีเนต

การเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจีเนต (ดัดแปลงจาก Koyama and Seki, 2004)

เตรียมเซลล์ตรึงโดยการนำเซลล์เป็ยที่เตรียมได้ข้างต้นมาผสมกับสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรแปรผันไปตามแต่ละการทดลอง) ได้เป็นสารผสมแขวนลอยเซลล์ หยดสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้ลงในสารละลายโซเดียมแอลจีเนตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการเติม Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการกวนตลอดเวลา โดยใช้สายยางซิลิโคนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4x7 มิลลิเมตร และเข็มฉีดยาขนาด 0.7x25 มิลลิเมตร โดยการใช้ปั๊ม (AC-2110, Perista pump, Chromatography Atto, Japan) ควบคุมอัตราการไหลคงที่เท่ากับ 0.06 ลิตร/ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปเพื่อเจือจางความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมแอลจีเนต กรองแคปซูลเซลล์ตรึงผ่านตะแกรงและล้างแคปซูลเซลล์ตรึงด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นแช่แคปซูลเซลล์ตรึงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที เพื่อให้แคปซูลเซลล์ตรึงแข็งตัวแสดงดังภาพที่ 9 กรองแคปซูลเซลล์ตรึงที่ได้ผ่านตะแกรงและล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีกครั้งทิ้งไว้ 10 นาที แสดงดังภาพที่ 10 นำแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมดไปชั่งน้ำหนักเพื่หาน้ำหนักเปียกของแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมด, จำนวนของแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมด และปริมาตรของแคปซูลเซลล์ตรึงด้วยการแทนที่น้ำ แสดงในภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ โดยทุกขั้นตอนทำภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ นำเซลล์ตรึงที่ได้ไปใช้ในการผลิตกรดแลกติกต่อไป แสดงขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจีเนตดังภาพที่ 11



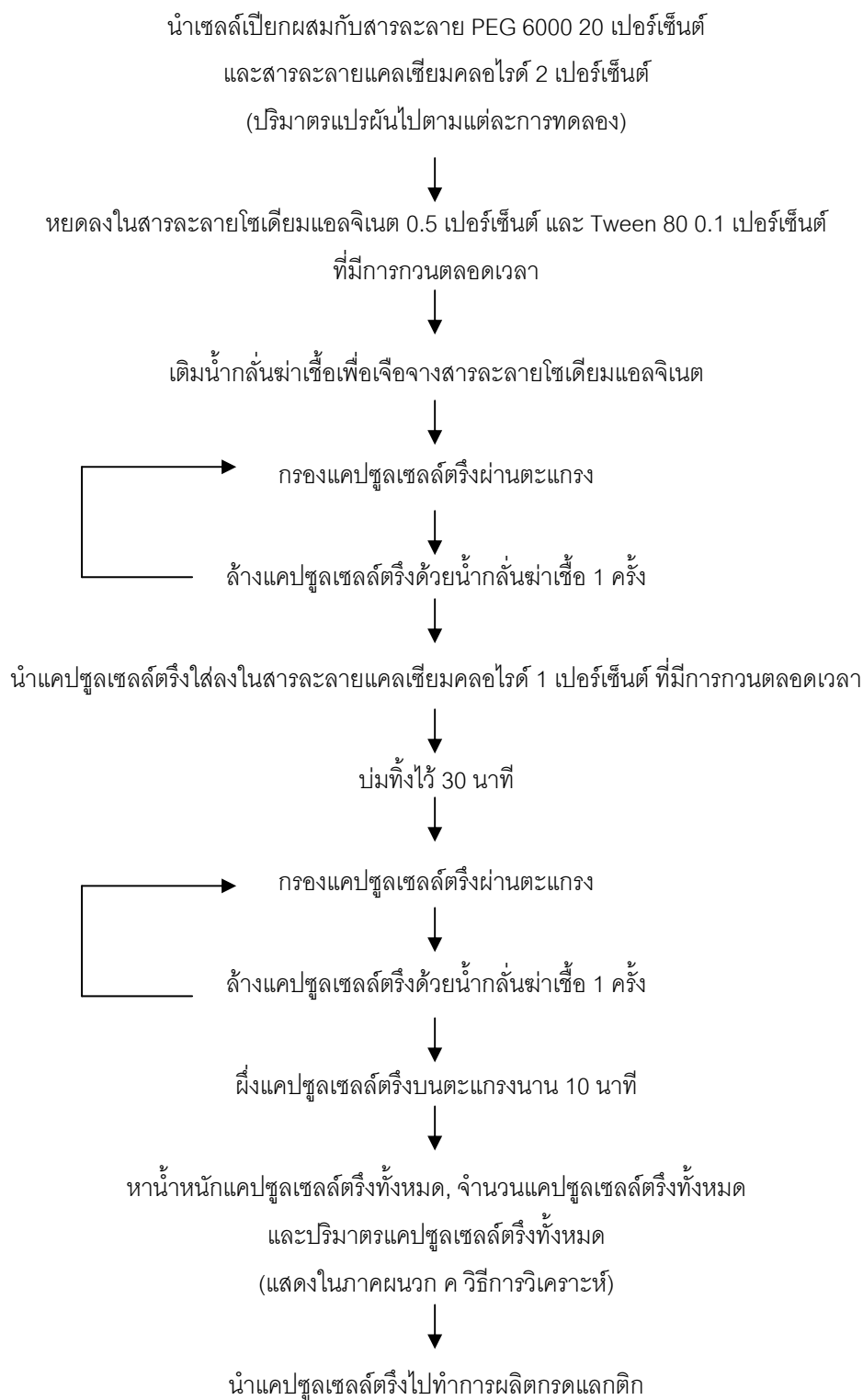
ภาพที่ 8 ขั้นตอนการหยดสารแขวนลอยลงในสารละลายโซเดียมแอลจีเนต



ภาพที่ 9 ขั้นตอนการทำแคปซูลเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจีเนตให้แข็งตัว



ภาพที่ 10 ขั้นตอนการกรองแคปซูลเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจีเนต

1. การศึกษาเบื้องต้นการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ใน โครงข่ายแอลจินเตระดับฟลาสก์

1.1 การเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่างเชลล์อิสระและเชลล์ตรึง

การเตรียมกล้าเชื้อ

นำ stock culture จำนวน 250 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกล้าเชื้อดังกล่าวจำนวน 250 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิตร อีกครั้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการเตรียมเชลล์ต่อไป

การเตรียมเชลล์

เติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 190 มิลลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิตร จำนวน 17 ฟลาสก์ ใช้สำหรับศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์อิสระ 1 ฟลาสก์ และใช้สำหรับศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง 1, 5 และ 10 ฟลาสก์ ที่มีปริมาณเชลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.132, 0.66 และ 1.32 กรัม ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบนิ่งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะได้น้ำหมักที่มีน้ำหนักเชลล์แห้งเท่ากับ 0.66 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นจึงนำไปเหวี่ยงแยกเชลล์ที่อัตราเร็ว 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเชลล์ 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำเชลล์ที่ได้มาเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 10, 50 และ 100 มิลลิตร ในปิเก็ตขนาด 50, 150 และ 400 มิลลิตร สำหรับปริมาณเชลล์ตรึงที่มีเชลล์เริ่มต้น 0.132, 0.66 และ 1.32 กรัม ตามลำดับ เพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเชลล์ที่มีน้ำหนักเชลล์แห้งเท่ากับ 13.20 กรัม/ลิตร ส่วนการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์อิสระให้นำเชลล์เปียกที่ได้มาผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิตร

การเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเน็ต

นำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้ข้างต้นผสมกับสารละลายโซเดียมแอลจีเนตความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10, 50 และ 100 มิลลิลิตร ในปิกรอร์ขนาด 50, 150 และ 400 มิลลิลิตร สำหรับปริมาณเซลล์ตรึงที่มีเซลล์เริ่มต้น 0.132, 0.66 และ 1.32 กรัม ตามลำดับ ทำการเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเน็ตดังวิธีการข้างต้น (ภาพที่ 7) ได้น้ำหนักเปียกของเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 11.00, 49.66 และ 120.75 กรัม และมีจำนวนเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 523, 2,364 และ 5,750 เม็ด ที่มีปริมาตรแทนที่น้ำเท่ากับ 10.46, 47.28 และ 115.00 มิลลิลิตร สำหรับปริมาณเซลล์ตรึงที่มีเซลล์เริ่มต้น 0.132, 0.66 และ 1.32 กรัม ตามลำดับ คำนวณเป็นปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเจลเซลล์ตรึงเท่ากับ 0.02 มิลลิลิตร/เม็ดเจล

การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนตระดับฟลาสก์

นำเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเน็ตที่เตรียมได้ใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.85 ปริมาตร 180 และ 200 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราเขย่า 100 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลาต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสและกรดแลกติก

1.2 การประมาณค่าพารามิเตอร์ของจลนพลศาสตร์ และการเลียนแบบกระบวนการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง

ประมาณค่าพารามิเตอร์ของจลนพลศาสตร์ และเลียนแบบกระบวนการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงดังสมการ (1), (2) และ (3) ด้วยวิธี non-linear least square error อาศัยกล่องเครื่องมือ (toolbox) ที่เรียกว่า Genetic Algorithm for Optimization Toolbox (GAOT) ของโปรแกรมสำเร็จรูป MATLABTM (The Math Works, INC.) จากข้อมูลของผลการทดลองการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึงระดับฟลาสก์ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.132, 0.66 และ 1.32 กรัม (แสดงดังภาคผนวก ง)

2. การศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในโครงข่ายแอลจิเนต และในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบกวน

การเตรียมกล้าเชื้อ

นำ stock culture จำนวน 250 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกล้าเชื้อดังกล่าวจำนวน 250 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อีกครั้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการเตรียมเชลล์ต่อไป

การเตรียมเชลล์

เตรียมกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่มีปริมาตร 150 จำนวน 1 ฟลาสก์ และ 175 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ เติมนลงในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 2.85 ลิตร จำนวน 1 ฟลาสก์ และ 3.325 ลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ ตามลำดับ เตรียมทั้งหมด 2 ชุด เพื่อใช้ในการศึกษา 2 ชุด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบนิ่งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะได้น้ำหมักที่มีน้ำหนักเชลล์แห้งเท่ากับ 0.66 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นจึงนำไปเหวี่ยงแยกเชลล์ที่อัตราเร็ว 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเชลล์ 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ต่อมานำเชลล์ชุดที่ 1 มาเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในปิเกเตอร์ขนาด 2 ลิตร เพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเชลล์ที่มีน้ำหนักเชลล์แห้งเท่ากับ 13.20 กรัม/ลิตร และเชลล์ชุดที่ 2 ใช้เชลล์เปียกโดยตรง ซึ่งมีน้ำหนักเปียก 29.02 กรัม (คิดเป็นน้ำหนักเชลล์แห้งเท่ากับ 6.6 กรัม) สำหรับใช้ในการเตรียมเชลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนตและการเตรียมเชลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต ตามลำดับ

การเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนต

นำสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมได้ข้างต้นผสมกับสารละลายโซเดียมแอลจีเนตความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในปิกเกอร์ขนาด 2 ลิตร ทำการเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนตดังวิธีการข้างต้น (ภาพที่ 7) ได้น้ำหนักเปียกของเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 604.77 กรัม และจำนวนเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 23,750 เม็ด ที่มีปริมาตรแทนที่น้ำเท่ากับ 475 มิลลิลิตร คำนวณเป็นปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเจลเซลล์ตรึงเท่ากับ 0.02 มิลลิลิตร/เม็ดเจล

การเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจีเนต

นำเซลล์เปียกที่เตรียมได้ข้างต้นมาผสมกับสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในปิกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร ได้เป็นสารผสมแขวนลอยเซลล์ ทำการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจีเนตดังวิธีการข้างต้น (ภาพที่ 11) ได้น้ำหนักเปียกของแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 298.43 กรัม และจำนวนแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 11,555 แคปซูล ที่มีปริมาตรแทนที่น้ำเท่ากับ 312 มิลลิลิตร คำนวณเป็นปริมาตรเฉลี่ยของแคปซูลเซลล์ตรึงเท่ากับ 0.027 มิลลิลิตร/แคปซูล

เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนตและในเยื่อแอลจีเนต

นำเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนต และเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจีเนตที่เตรียมได้ใส่ลงในถังปฏิกรณ์แบบกวนขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 50 รอบ/นาที ควบคุมพีเอชเท่ากับ 6 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัล เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลาต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก และเก็บตัวอย่างเซลล์ตรึงที่ชั่วโมงแรก เพื่อหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ระดับฟาสก์ด้วยวิธี Taguchi

3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธี Taguchi

การออกแบบการทดลองโดยวิธี Taguchi

ในการทดลองนี้พิจารณาแฟกเตอร์และระดับของแฟกเตอร์ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 จำนวน 8 แฟกเตอร์ประกอบด้วย ชนิดของการตรึงเชลล์ 2 ชนิดคือ เชลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต (entrapment) และเชลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต (encapsulation), ความเข้มข้นเชลล์ของเชลล์ตรึงที่ใช้, ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น, ความเข้มข้นยีสต์สกัด, ความเข้มข้นบีฟัสกัต, พีเอชเริ่มต้น, ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ และความเข้มข้นเปปโตน โดยแต่ละแฟกเตอร์จะมี 3 ระดับ แสดงดังตารางที่ 8 ซึ่งวิธี Taguchi จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนการทดลอง, แฟกเตอร์ และระดับของแฟกเตอร์ในรูปของ orthogonal array (OA) โดยจะเห็นได้ว่าการทดลองที่ประกอบด้วยแฟกเตอร์ที่มี 2 ระดับ 1 แฟกเตอร์ และแฟกเตอร์ที่มี 3 ระดับ 7 แฟกเตอร์ สามารถใช้ OA แบบ $L_{18} (2^1 \times 3^7)$ แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 8 แฟกเตอร์และระดับของแฟกเตอร์ที่กำหนด

แฟกเตอร์	ระดับ		
	1	2	3
1. ชนิดของการตรึงเชลล์: (A)	Entrapment	Encapsulation	-
2. ความเข้มข้นเชลล์ของเชลล์ตรึงที่ใช้(กรัม/ลิตร): (B)	3.96	5.28	6.6
3. ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัม/ลิตร): (C)	25	35	45
4. ความเข้มข้นยีสต์สกัด (กรัม/ลิตร): (D)	2.5	5	10
5. ความเข้มข้นบีฟัสกัต (กรัม/ลิตร): (E)	5	7.5	10
6. พีเอชเริ่มต้น: (F)	6	6.5	6.85
7. ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (กรัม/ลิตร): (G)	2.5	5	10
8. ความเข้มข้นเปปโตน (กรัม/ลิตร): (H)	5	7.5	10

ตารางที่ 9 $L_{18} (2^1 \times 3^7)$ Orthogonal array

การทดลอง	แฟกเตอร์							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	1	3	3	3	3	3	3
4	1	2	1	1	2	2	3	3
5	1	2	2	2	3	3	1	1
6	1	2	3	3	1	1	2	2
7	1	3	1	2	1	3	2	3
8	1	3	2	3	2	1	3	1
9	1	3	3	1	3	2	1	2
10	2	1	1	3	3	2	2	1
11	2	1	2	1	1	3	3	2
12	2	1	3	2	2	1	1	3
13	2	2	1	2	3	1	3	2
14	2	2	2	3	1	2	1	3
15	2	2	3	1	2	3	2	1
16	2	3	1	3	2	3	1	2
17	2	3	2	1	3	1	2	3
18	2	3	3	2	1	2	3	1

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ross (1996)

การเตรียมกล้าเชื้อ

นำ stock culture จำนวน 250 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกล้าเชื้อดังกล่าวจำนวน 250 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิตร อีกครั้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการเตรียมเซลล์ต่อไป

การเตรียมเซลล์

เตรียมกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่มีปริมาตร 180 มิลลิตร จำนวน 2 ฟลาस्क เติมนลงในฟลาस्कขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 3.42 ลิตร จำนวน 2 ฟลาस्क เตรียมทั้งหมด 2 ชุด เพื่อใช้ในการศึกษา 2 ขั้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบนิ่งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะได้น้ำหมักที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.66 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นจึงนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อัตราเร็ว 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำเซลล์ชุดที่ 1 มาเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 360 มิลลิตร ในปิอกเกอร์ขนาด 1 ลิตร เพื่อทำเป็นสารแขวนลอยเซลล์ที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 13.20 กรัม/ลิตร และเซลล์ชุดที่ 2 ใช้เซลล์เปียกโดยตรง ซึ่งมีน้ำหนักเปียกรวม 20.89 กรัม (คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.752 กรัม) สำหรับใช้ในการเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต และการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต ตามลำดับ

การเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต

นำสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมได้ข้างต้นผสมกับสารละลายโซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 360 มิลลิตร ในปิอกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ทำการเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนตดังวิธีการข้างต้น (ภาพที่ 7) ได้น้ำหนักเปียกของเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 339.69 กรัม และจำนวนเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 16,985 แคปซูล ที่มีปริมาตรแทนที่น้ำเท่ากับ 321 มิลลิตร คำนวณเป็นปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเจลเซลล์ตรึงเท่ากับ 0.019 มิลลิตร/เม็ด

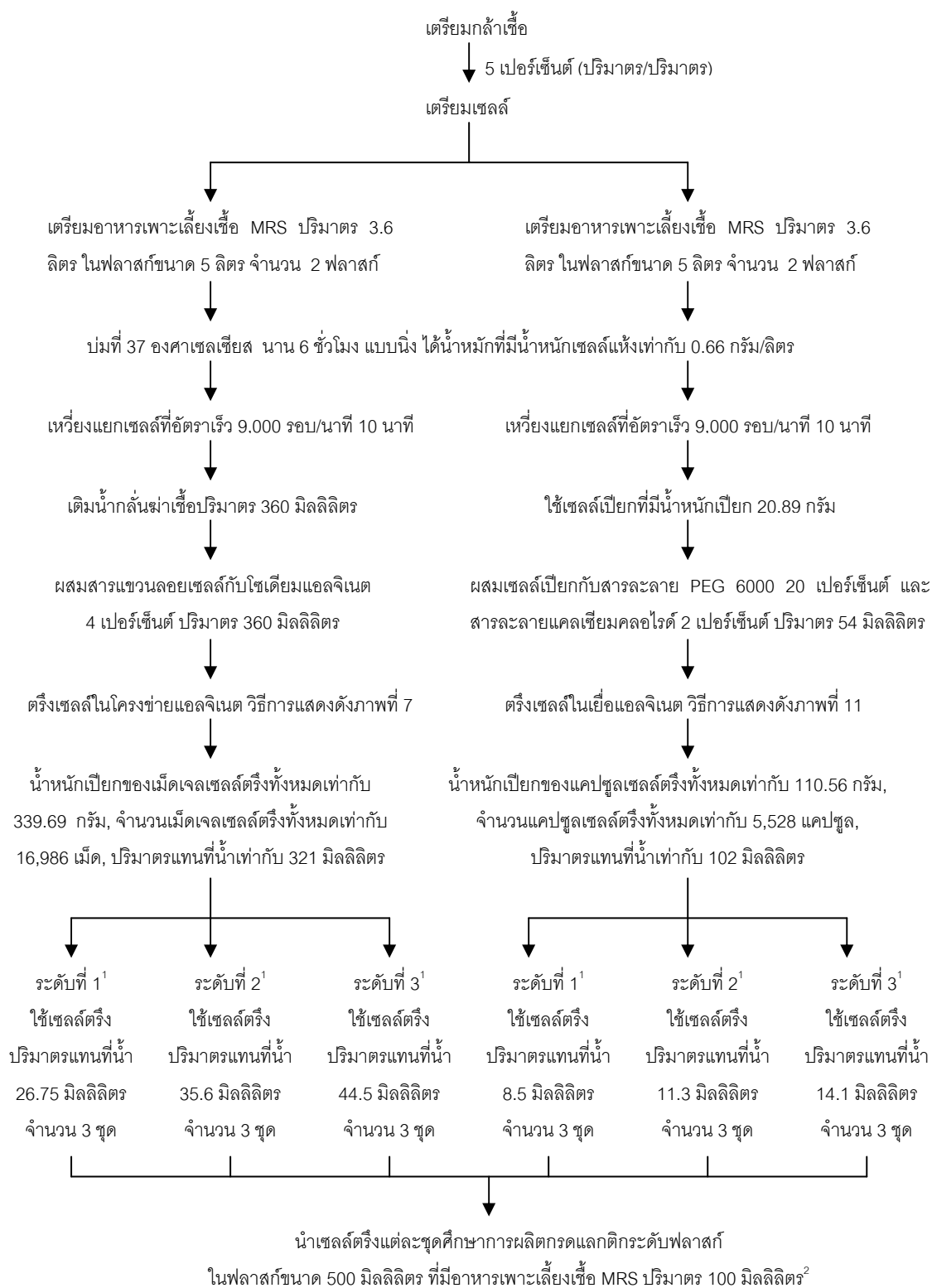
เจล แบ่งเม็ดเจลเซลล์ตรึงที่ได้โดยวัดปริมาตรแทนที่น้ำเท่ากับ 26.75, 35.6 และ 44.5 มิลลิลิตร สำหรับความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงที่ใช้เท่ากับ 3.96, 5.28 และ 6.6 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จำนวนอย่างละ 3 ชุดดังที่ออกแบบด้วยวิธี Taguchi ในตารางที่ 8 และ 9

การเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต

นำเซลล์เปือกที่เตรียมได้ข้างต้นมาผสมกับสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 54 มิลลิลิตร ในปิเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร ได้เป็นสารผสมแขวนลอยเซลล์ ทำการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนตดังวิธีการข้างต้น (ภาพที่ 11) ได้น้ำหนักเปียกของแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 110.56 กรัม และจำนวนแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 5,528 แคปซูล ที่มีปริมาตรแทนที่น้ำเท่ากับ 102 มิลลิลิตร คำนวณเป็นปริมาตรเฉลี่ยของแคปซูลเซลล์ตรึงเท่ากับ 0.018 มิลลิลิตร/แคปซูล แบ่งแคปซูลเซลล์ตรึงที่ได้โดยวัดปริมาตรแทนที่น้ำเท่ากับ 8.5, 11.3 และ 14.1 มิลลิลิตร สำหรับความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงที่ใช้เท่ากับ 3.96, 5.28 และ 6.6 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จำนวนอย่างละ 3 ชุด ดังที่ออกแบบด้วยวิธี Taguchi ในตารางที่ 8 และ 9

การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงระดับฟลาสก์

นำเซลล์ตรึงที่เตรียมได้แต่ละชุดใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราเขย่า 100 รอบ/นาที และตามสภาวะที่ออกแบบในตารางที่ 9 เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลาต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสและกรดแลกติก สามารถสรุปวิธีการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Taguchi แสดงดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 สรุปวิธีการผลิตกรดแลคติกด้วยเซลล์ตริงโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Tagichi

หมายเหตุ ¹ และ ² ระดับและสภาวะของการทดลองแสดงในตารางที่ 8 และ 9

3.2 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตระดับฟลask ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi

การเตรียมกล้าเชื้อ

นำ stock culture จำนวน 250 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกล้าเชื้อดังกล่าวจำนวน 250 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิตร อีกครั้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการเตรียมเซลล์ต่อไป

การเตรียมเซลล์

เตรียมกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่มีปริมาตร 40 มิลลิตร จำนวน 2 ฟลask เติมน้ำในฟลask ขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 760 มิลลิตร จำนวน 2 ฟลask บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบนิ่งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะได้น้ำหนักที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.66 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นจึงนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อัตราเร็ว 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ได้น้ำหนักเซลล์เปียกรวมกันเท่ากับ 6.28 กรัม (คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.056 กรัม)

การเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต

นำเซลล์เปียกที่เตรียมได้ข้างต้นมาผสมกับสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 12 มิลลิตร ในปิอกเกอร์ขนาด 50 มิลลิตร ได้เป็นสารผสมแขวนลอยเซลล์ ทำการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนตดังวิธีการข้างต้น (ภาพที่ 11) ได้น้ำหนักเปียกของแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 71.07 กรัม และจำนวนแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 3,354 แคปซูล ที่มีปริมาตรแทนที่น้ำเท่ากับ 67.09 มิลลิตร คำนวณเป็นปริมาตรเฉลี่ยของแคปซูลเซลล์ตรึงเท่ากับ 0.02 มิลลิตร/แคปซูล

การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi ระดับ
ฟลอสก์

นำเซลล์ตรึงที่เตรียมได้ทั้งหมดแบ่งเป็น 2 ชุดโดยการชั่งน้ำหนัก ได้น้ำหนักเปียกของ
แคปซูลเซลล์ตรึงชุดละเท่ากับ 35.53 กรัม ใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ปริมาตร 100
มิลลิลิตร ในฟลอสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ชุดละ 1 ฟลอสก์ ทำการหมักที่สภาวะ 37 องศา
เซลเซียส อัตราเขย่า 100 รอบ/นาที และภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi เก็บตัวอย่าง
น้ำหมักที่เวลาต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสและกรดแลกติก และเก็บตัวอย่างแคปซูลเซลล์
ตรึง 30 แคปซูล ที่ชั่วโมงแรกและชั่วโมงสุดท้าย เพื่อหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณกรดแลก-
ติก ตามลำดับ

4. การผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจินัตในถัง ปฏิกรณ์แบบ packed bed

การเตรียมกล้าเชื้อ

นำ stock culture จำนวน 250 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยง
เชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา
เซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกล้าเชื้อดังกล่าวจำนวน 250 ไมโครลิตร ลงในหลอด
ทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
อีกครั้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการเตรียม
เซลล์ต่อไป

การเตรียมเซลล์

เตรียมกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่มีปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 2
ฟลอสก์ เติมน้ำลงในฟลอสก์ขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10
กรัม/ลิตร ปริมาตร 3.8 ลิตร จำนวน 2 ฟลอสก์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบนิ่งเป็นเวลา
6 ชั่วโมง จะได้น้ำหมักที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.66 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นจึงนำไปเหวี่ยงแยก

เซลล์ที่อัตราเร็ว 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อ ได้เซลล์เปียกซึ่งมีน้ำหนักเปียกรวมเท่ากับ 23.22 กรัม (คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.28 กรัม)

การเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต

นำเซลล์เปียกที่เตรียมได้ข้างต้นมาผสมกับสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ในปิอกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร ได้เป็นสารผสมแขวนลอยเซลล์ ทำการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนตดังวิธีการข้างต้น (ภาพที่ 11) ได้น้ำหนักเปียกของแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 262.74 กรัม และจำนวนแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมดเท่ากับ 12,070 แคปซูล ที่มีปริมาตรแทนที่น้ำเท่ากับ 250 มิลลิลิตร คำนวณเป็นปริมาตรเฉลี่ยของแคปซูลเซลล์ตรึงเท่ากับ 0.02-0.027 มิลลิลิตร/แคปซูล บรรจุแคปซูลเซลล์ตรึงที่ได้ทั้งหมดลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและส่วนสูงเท่ากับ 6.04×10.5 เซนติเมตร แสดงดังภาพที่ 13

4.1 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed (A packed bed reactor with broth recycle-batch production)

นำถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนตปริมาตร 250 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับถังหมักแบบกวนขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS 1 ลิตร ซึ่งทำหน้าที่เป็นถังพักน้ำหมักระหว่างการหมักที่มีระบบเวียนกลับน้ำหมัก ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบ/นาที และพีเอช 6.85 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัล ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi เริ่มการผลิตโดยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS จากถังพักจะถูกปั๊มด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F1 เข้าสู่ถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงทางด้านบนและจะถูกปั๊มออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงด้านล่างกลับเข้าสู่ถังพักด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F2 ($F2=F1$) กำหนดให้มีอัตราการไหลเข้า (F1) และออก (F2) จากคอลัมน์เท่ากับ 0.96 ลิตร/ชั่วโมง ตลอดเวลา รูปแบบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก แสดงดังภาพที่ 14 และ 15 เก็บตัวอย่างน้ำหมัก ที่เวลาต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก และเก็บตัวอย่าง

แคปซูลเซลล์ตรึง 30 แคปซูล ที่ชั่วโมงแรกและชั่วโมงสุดท้าย เพื่อหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณกรดแลกติก ตามลำดับ



ภาพที่ 13 ถังปฏิกรณ์แบบ packed bed บรรจุเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนตขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและส่วนสูงเท่ากับ 6.04x10.5 เซนติเมตร

4.2 การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed

นำถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนตปริมาตร 250 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับถังหมักแบบกวนขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS 1 ลิตร ซึ่งทำหน้าที่เป็นถังพักน้ำหมักระหว่างการหมักที่มีระบบเวียนกลับน้ำหมัก ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบ/นาที และพีเอช 6.85 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัล ทำการ

เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi เริ่มการผลิตโดยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS จากถังพักจะถูกปั๊มด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F_1 เข้าสู่ถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงทางด้านบนและจะถูกปั๊มออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงด้านล่างกลับเข้าสู่ถังพักด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F_2 ($F_2=F_1$) กำหนดให้มีอัตราการไหลเข้า (F_1) และออก (F_2) จากคอลัมน์เท่ากับ 0.96 ลิตร/ชั่วโมง ตลอดเวลา ทำการหมักเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก จนความเข้มข้นเหลือของกลูโคสคงที่ จึงเปลี่ยนการหมักเป็นแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมัก โดยการเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ใหม่ด้วยอัตราการไหล F_3 ที่ได้จากการคำนวณจากอัตราการเจือจางที่กำหนดได้แก่ อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 และ 1.0 ชั่วโมง⁻¹ และมีการดึงน้ำหมักออกจากถังหมักด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F_4 ซึ่งเท่ากับอัตราการไหลของการเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ใหม่ ($F_4=F_3$) จะได้ว่า การหมักแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักที่ควบคุมอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 และ 1.0 ชั่วโมง⁻¹ จะต้องควบคุมอัตราการไหลเข้าของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ใหม่ที่เดิม (F_3) และอัตราการไหลออกของน้ำหมักออกจากถังหมัก (F_4) เท่ากับ 0.499 และ 1 ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ และทำการหมักแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักจนเข้าสู่สภาวะคงตัว (steady state) โดยพิจารณาได้จากความเข้มข้นคงที่ของกลูโคส หรือกรดแลกติก ระหว่างการหมัก ภายใต้สภาวะคงตัว รูปแบบการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักแสดงดังภาพที่ 16 และ 17 ในระหว่างการหมักแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักจะเก็บตัวอย่างน้ำหมัก โดยจะทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นกลูโคสและกรดแลกติก เพื่อเปลี่ยนการหมักไปเป็นแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมัก และเก็บตัวอย่างแคปซูลเซลล์ตรึงที่ชั่วโมงแรก เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนในระหว่างการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักจะเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลาต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก และเก็บตัวอย่างแคปซูลเซลล์ตรึง 30 แคปซูล ที่ชั่วโมงแรกและชั่วโมงสุดท้ายเพื่อหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณกรดแลกติก ตามลำดับ

4.3 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed (A packed bed reactor with broth recycle-repeated batch production)

นำถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงในเยื่อแอลจีเนตปริมาตร 250 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับถังหมักแบบกวนขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS 1 ลิตร ซึ่งทำหน้าที่เป็นถังพักน้ำหมักระหว่างการหมักที่มีระบบเวียนกลับน้ำหมัก ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการ

กวน 400 รอบ/นาที่ และพีเอช 6.85 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัล ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi เริ่มการผลิตโดยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS จากถังพักจะถูกปั๊มด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F1 เข้าสู่ถังปฏิกรณ์เซลล์ตั้งทางด้านบนและจะถูกปั๊มออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ตั้งด้านล่างกลับเข้าสู่ถังพักด้วยอัตราการไหลเท่ากับ F2 ($F2=F1$) กำหนดให้มีอัตราการไหลเข้า (F1) และออก (F2) จากคอลัมน์เท่ากับ 0.96 ลิตร/ชั่วโมง ตลอดเวลา รูปแบบการผลิตเหมือนกับรูปแบบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก แสดงดังภาพที่ 14 และ 15 ทำการหมักจนกลูโคสถูกใช้หมดจึงถ่ายน้ำหมักออก ล้างถังพักน้ำหมัก และแคปซูลเซลล์ตั้งในถังปฏิกรณ์เซลล์ตั้งด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ใหม่ ปริมาตร 1 ลิตร เพื่อทำการผลิตกรดแลกติกอีกครั้ง โดยจะทำการผลิตกรดแลกติกทั้งหมด 3 ครั้ง โดยทุกครั้งจะเก็บตัวอย่างน้ำหมัก ที่เวลาต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก และเก็บตัวอย่างแคปซูลเซลล์ตั้ง 30 แคปซูล ที่ชั่วโมงแรกและชั่วโมงสุดท้าย เพื่อหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณกรดแลกติก ตามลำดับ

การวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสและกรดแลกติก

นำตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บในแต่ละเวลาของการหมักมาเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปวิเคราะห์กลูโคส และกรดแลกติกโดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (Miller, 1959) และวิธีของ Barker and Summerson (1941) ตามลำดับ แสดงในภาคผนวก ค

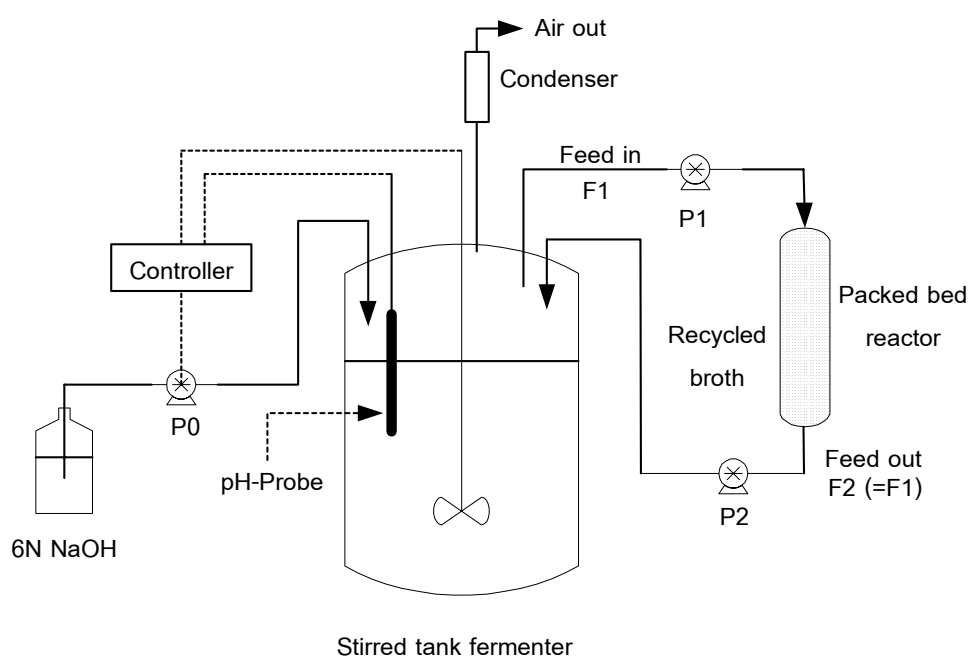
นำตัวอย่างแคปซูลเซลล์ตั้งที่เก็บในชั่วโมงสุดท้ายของการหมักมาละลายในสารละลายไตรโซเดียมซิเตรต (tri-sodium citrate) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ได้สารละลายแขวนลอยเซลล์ นำไปเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วนำไปวิเคราะห์กรดแลกติกโดยวิธีของ Barker and Summerson (1941) ตามลำดับ แสดงในภาคผนวก ค

การหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

นำตัวอย่างเม็ดเจลเซลล์ตรึง หรือแคปซูลเซลล์ตรึงที่เก็บในแต่ละเวลาของการหมักมาละลายในสารละลายไตรโซเดียมซีเทรตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิตร ได้สารละลายแขวนลอยเซลล์ แล้วจึงนำไปหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต แสดงในภาคผนวก ค

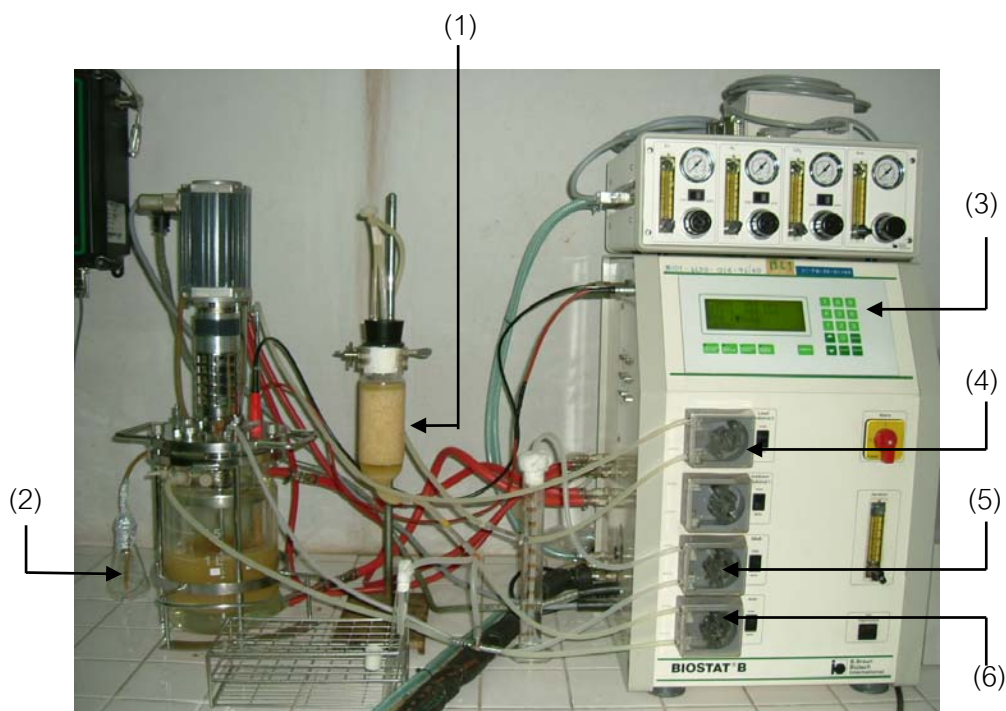
การประมาณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติก

การประมาณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จ และแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมัก ซึ่งประกอบด้วย ผลได้เซลล์ (Y_{XS}) เฉพาะในกรณีของเซลล์อิสระ ผลได้กรดแลกติก (Y_{PS}) อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_S) อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_P) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_P) ได้จากการคำนวณ แสดงในภาคผนวก ข



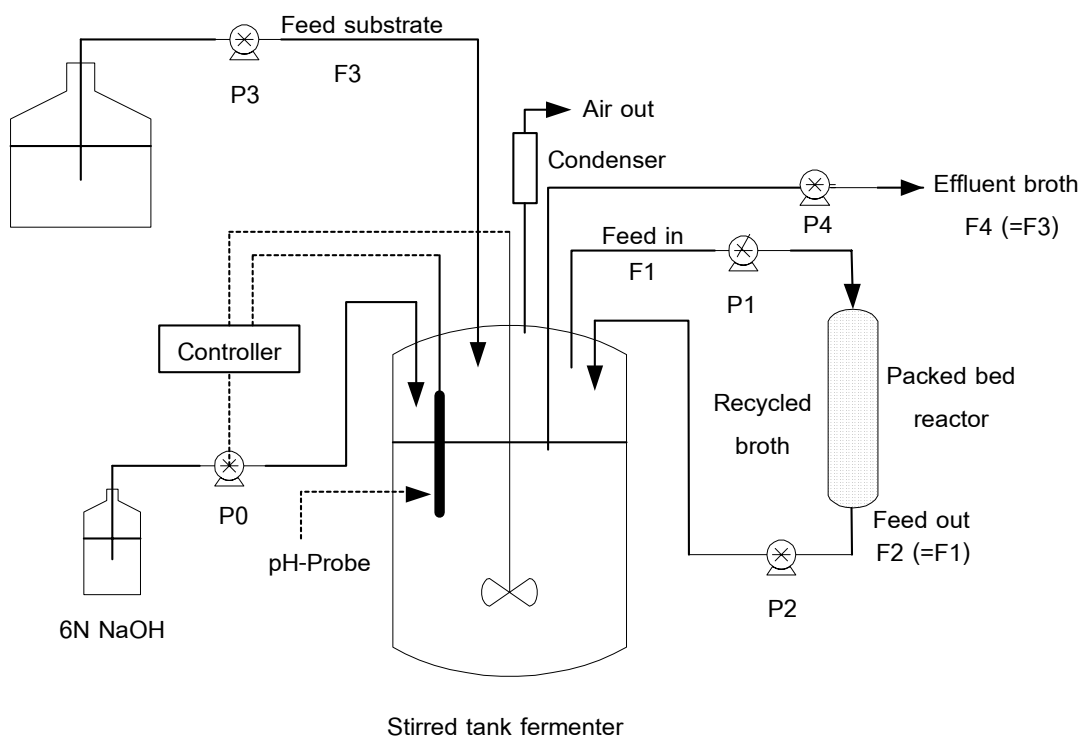
ภาพที่ 14 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงแบบ packed bed

หมายเหตุ F1 และ F2 อัตราการไหลเข้าและออกของน้ำหมักเวียนกลับของถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึง
P0, P1 และ P2 เครื่องสูบ (Peristaltic pumps)



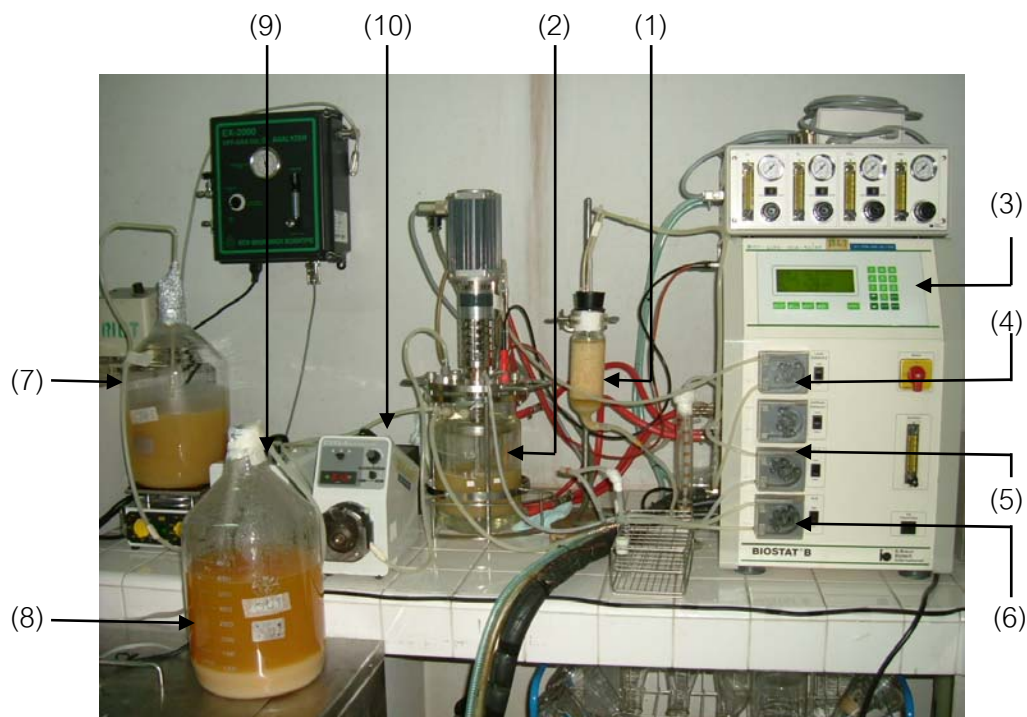
ภาพที่ 15 แสดงระบบควบคุมการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ เซลล์ตรึงแบบ packed bed

- (1) ถังปฏิกรณ์แบบ packed bed บรรจุแคปซูลเซลล์ตรึง
- (2) ถังหมักแบบกวนที่ทำหน้าที่เป็นถังพักน้ำหมัก (Storage stirred tank) ควบคุมพีเอช และอุณหภูมิ
- (3) อุปกรณ์ควบคุมอัตโนมัติ
- (4) เครื่องสูบน้ำหมักเข้าถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึง ควบคุมอัตราการไหลเข้า (F1)
- (5) เครื่องสูบโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัล เพื่อควบคุมพีเอชในถังพักน้ำหมัก
- (6) เครื่องสูบน้ำหมักออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงเวียนกลับสู่ถังพักน้ำหมัก ควบคุมอัตราการไหลออก (F2)



ภาพที่ 16 การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์เซลล์ตั้งแบบ packed bed

หมายเหตุ F1 และ F2 อัตราการไหลเข้าและออกของน้ำหมักเวียนกลับของถังปฏิกรณ์เซลล์ตั้ง
 F3 และ F4 อัตราการไหลเข้าของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ และอัตราการไหลออกของ
 น้ำหมักของถังพักแบบกวน
 P0, P1, P2, P3 และ P4 เครื่องสูบ (Peristaltic pumps)



ภาพที่ 17 แสดงระบบควบคุมการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ เซลล์ตรึงแบบ packed bed

- (1) ถังปฏิกรณ์แบบ packed bed บรรจุแคปซูลเซลล์ตรึง
- (2) ถังหมักแบบกวนที่ทำหน้าที่เป็นถังพักน้ำหมัก (Storage stirred tank) ควบคุมพีเอช และอุณหภูมิ
- (3) อุปกรณ์ควบคุมอัตโนมัติ
- (4) เครื่องสูบน้ำหมักเข้าถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึง ควบคุมอัตราการไหลเข้า (F1)
- (5) เครื่องสูบโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัล เพื่อควบคุมพีเอชในถังพักน้ำหมัก
- (6) เครื่องสูบน้ำหมักออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ตรึงเวียนกลับสู่ถังพักน้ำหมัก ควบคุมอัตราการไหลออก (F2)
- (7) ถังเติม (Feed tank) อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่
- (8) ถังเก็บ (Storage tank) น้ำหมัก
- (9) เครื่องสูบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่เข้าสู่ถังพักน้ำหมัก ควบคุมอัตราการไหลเข้า (F3)
- (10) เครื่องสูบน้ำหมักออก ควบคุมอัตราการไหลออก (F4)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และ Department of Food Science, National Pingtung University of Science and Technology, Taiwan.

ระยะเวลาทำการวิจัย

ระยะเวลาการวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2545 ถึงเดือนตุลาคม 2548

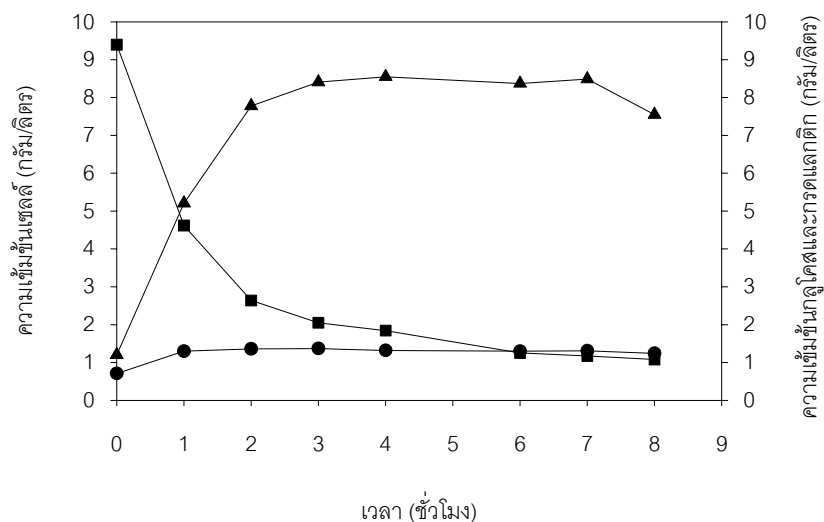
ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาเบื้องต้นการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ใน โครงข่ายแอลจีเนตระดับฟลาสก์

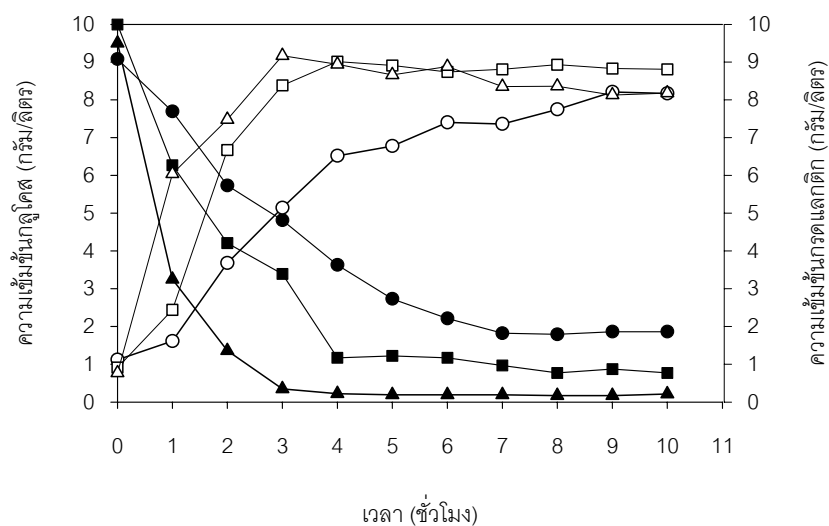
1.1 การเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในโครงข่าย แอลจีเนต

การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ระดับฟลาสก์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราเขย่า 100 รอบ/นาที และ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS เท่ากับ 6.85 โดยเซลล์ตรึงมีการแปรผันปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.132, 0.66 และ 1.32 กรัม พบว่า ตามขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนตที่อธิบายไว้ในอุปกรณ์และวิธีการ: ภาพที่ 7 เซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนตที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลประมาณ 3 มิลลิเมตร สามารถสรุปผลการทดลองแสดงถึงความเข้มข้นกลูโคสและกรดแลกติกของการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงดังภาพที่ 18 และ 19 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จะเห็นว่าการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์อิสระ (ภาพที่ 18) มีความเข้มข้นของเซลล์ กลูโคส และกรดแลกติกเริ่มคงที่ ชั่วโมงที่ 4 โดยมีความเข้มข้นเซลล์ กลูโคส และกรดแลกติกเท่ากับ 1.32, 1.84 และ 8.55 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1) เมื่อเปรียบเทียบกับ การผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง (ภาพที่ 19) พบว่า เริ่มมีการผลิตกรดแลกติกตั้งแต่ชั่วโมงแรก และมีปริมาณกรดแลกติก คงที่ ที่เวลาการหมัก 6, 4 และ 3 ชั่วโมง เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 0.132, 0.66 และ 1.32 กรัม ตามลำดับ โดยมีความเข้มข้นกลูโคสเหลือเท่ากับ 2.88, 1.17 และ 0.35 กรัม/ลิตร และมีความเข้มข้นกรดแลกติกที่ผลิตได้เท่ากับ 6.72, 9.01 และ 9.17 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก2, ก3 และ ก4 ตามลำดับ) สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแลกติกโดยเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 สรุปได้ดังตารางที่ 10



ภาพที่ 18 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์อิสระ *L. lactis* IO-1 ระดับฟลask ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.40 กรัม/ลิตร (สัญลักษณ์ ●, ■ และ ▲ ความเข้มข้นเซลล์, กลูโคส และกรดแลกติก ตามลำดับ)



ภาพที่ 19 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ระดับฟลask (สัญลักษณ์ ●, ■, ▲ และ ○, □, △ ความเข้มข้นกลูโคสและกรดแลกติกที่ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.132, 0.66, 1.32 กรัม ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.08, 9.99, 9.50 กรัม/ลิตร ตามลำดับ)

ตารางที่ 10 พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนต *L. lactis* IO-1 ในระดับฟลาสก์

พารามิเตอร์	เซลล์อิสระ ¹ ($\bar{x}$ = 1.02 กรัม/ลิตร) ²	เซลล์ตรึง		
		0.132 กรัม ³	0.66 กรัม ⁴	1.32 กรัม ⁵
$Y_{X/S}$ (กรัม/กรัม)	0.08	-	-	-
$Y_{P/S}$ (กรัม/กรัม)	0.97	0.91	0.92	0.92
q_s (กรัม/กรัม ชั่วโมง)	1.85 ^ก	1.73 ^ข	0.67 ^ค	0.46 ^ง
q_p (กรัม/กรัม ชั่วโมง)	1.80 ^ก	1.59 ^ข	0.61 ^ค	0.42 ^ง
Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	1.84	1.05	2.03	2.80

หมายเหตุ^{1,4,5} ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 9.40, 9.99 และ 9.50 กรัม/ลิตร
² $\bar{x}$ หมายถึง ความเข้มข้นเฉลี่ยของเซลล์ระหว่างการเพาะเลี้ยงที่เวลา 0 และ 4 ชั่วโมง (ภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1)
³ คำนวณจากการทดลอง 2 ข้ำ ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 9.08 กรัม/ลิตร
^{ก, ข, ค และ ง} คำนวณจากความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 1.02, 0.66, 3.3 และ 6.6 กรัม/ลิตรตามลำดับ

จากตารางที่ 10 เมื่อพิจารณาผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) พบว่า การผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์อิสระมีผลได้ของกรดแลกติกสูงกว่ากรณีของการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงเล็กน้อย ซึ่งมีผลได้กรดแลกติกเท่ากับ 0.91-0.92 กรัม/กรัม แต่เมื่อพิจารณาสมมูลมวลของการใช้ซับสเตรตโดยรวมกับผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$) จะเห็นว่ากรณีของเซลล์อิสระที่คำนวณได้มีค่าสูงกว่าทางทฤษฎี อย่างไรก็ตาม อาจแสดงให้เห็นว่า เซลล์ในระบบเซลล์อิสระสามารถใช้กลูโคสในการผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าเซลล์ในระบบเซลล์ตรึง เนื่องจากเซลล์ในระบบเซลล์ตรึงถูกหุ้มไว้ด้วยเจลของแอลจีเนตซึ่งมีผลต่อการแพร่ของกลูโคสเข้าสู่เซลล์ จึงทำให้อัตราการใช้กลูโคสลดลงได้ ตลอดจนการใช้กลูโคสสังเคราะห์พลังงานในกระบวนการขนส่งและบำรุงรักษาเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับอัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_s) และการผลิตกรดแลกติก (q_p) พบว่าการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เซลล์ตรึง มีค่าอัตราจำเพาะการใช้กลูโคสและการผลิตกรดแลกติก ต่ำกว่าการใช้เซลล์อิสระ นอกจากนี้การผลิตกรดแลกติกโดยใช้เซลล์ตรึงมีอัตราจำเพาะการใช้กลูโคส และการผลิตกรด

แลกติกลดลงเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้เห็นถึงภาวะยับยั้งเนื่องจากความหนาแน่นเซลล์สูงขึ้นภายในโครงข่ายแอลจีเน็ต เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นในการตรึง ตลอดจนแสดงให้เห็นชัดถึงอิทธิพลร่วมของภาวะยับยั้งจากกลูโคส และกรดแลกติกเพิ่มขึ้นจากข้อจำกัดของการแพร่ ส่วนอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรของระบบเซลล์ตรึงเพิ่มขึ้น 1.9 และ 2.7 เท่า เมื่อมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเพิ่มขึ้นเป็น 5 และ 10 เท่า ตามลำดับ โดยเซลล์ตรึงที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.32 กรัม มีอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 2.80 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ 1.52 เท่า แสดงให้เห็นถึงข้อได้เปรียบของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงที่มีความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้น

1.2 แบบจำลองจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง

จากผลการทดลองการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในโครงข่ายแอลจีเน็ตที่ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.132, 0.66 และ 1.32 กรัม ระดับฟลัสก์ (ในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก2, ก3 และ ก4 ตามลำดับ) สามารถสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์อย่างง่ายเพื่อใช้อธิบายการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง โดยพิจารณาผลของปริมาณเซลล์เริ่มต้นและความเข้มข้นกลูโคสต่อการผลิตกรดแลกติกดังสมการ (2)-(3) และการใช้กลูโคสขึ้นอยู่กับอัตราการผลิตกรดแลกติกโดยตรงและการบำรุงรักษาเซลล์ดังสมการ (1)

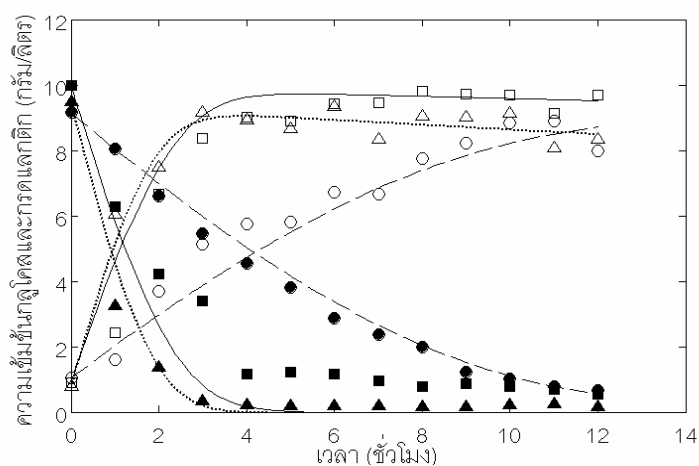
ในการประมาณค่าพารามิเตอร์ของจลนพลศาสตร์การหมัก และการเลียนแบบกระบวนการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จด้วยเซลล์ตรึง อาศัยวิธี non-linear least square error โดยใช้กล่องเครื่องมือ (toolbox) ที่เรียกว่า Genetic Algorithm for Optimization Toolbox (GAOT) ของโปรแกรมสำเร็จรูป MATLAB™ (แสดงในภาคผนวก ง) สรุปค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมแสดงดังตารางที่ 11 และสามารถแสดงผลของการประมาณค่าด้วยวิธีเส้นโค้งที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองที่ได้ และผลการทดลองที่ได้จากการคำนวณจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์อย่างง่ายดังภาพที่ 20

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลที่ได้จากการทดลอง และค่าที่คำนวณได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (ภาพที่ 20) จะเห็นว่า แบบจำลองจลนพลศาสตร์อย่างง่ายที่สร้างขึ้น

สามารถอธิบายการใช้กลูโคสและการผลิตกรดแลกติกได้ดี เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.132 และ 1.32 โดยมีค่า Sum of weighed square error (SSE) เท่ากับ 0.375 ยกเว้นกรณีที่ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.66 กรัม แบบจำลองดังกล่าวอธิบายการผลิตกรดแลกติกได้ดี แต่อธิบายการใช้กลูโคสได้ไม่เหมาะสม

ตารางที่ 11 พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ที่ปริมาณด้วยวิธี non-linear least square error โดยใช้กล่องเครื่องมือ GAOT ของโปรแกรมสำเร็จรูป MATLABTM

พารามิเตอร์	ค่าที่ประมาณได้
α_m^P (กรัม/กรัม ชั่วโมง)	12.0
K_S^P (กรัม/ลิตร)	3.67
X_m (กรัม/200 มล.)	2.30
$Y_{P/S}$ (กรัม/กรัม)	0.95
m_S (กรัม/กรัม ชั่วโมง)	0.06
n	1
SSE	0.375



ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงกระบวนการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์อาศัยผลการทดลองจากการผลิตกรดแลกติกที่แปรผันปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.132, 0.66 และ 1.32 กรัม (ตารางผนวกที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ) (สัญลักษณ์ ●, ■, ▲ และ ○, □, △ ความเข้มข้นกลูโคสและกรดแลกติกเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.132, 0.66, 1.32 กรัม ตามลำดับ จากผลการทดลอง, สัญลักษณ์ — — — , ——— , การเปลี่ยนแปลงเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.132, 0.66, 1.32 กรัม ตามลำดับ คำนวณจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์อย่างง่าย)

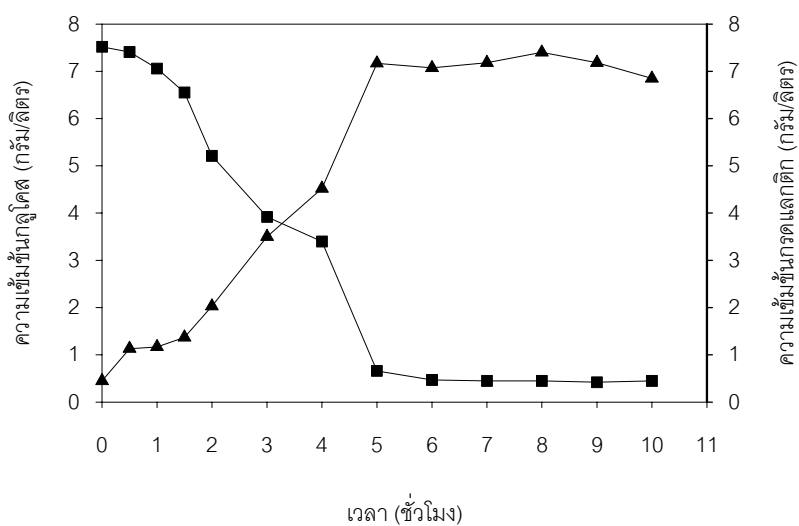
2. การศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในโครงข่ายแอลจิเนต และในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบกวน

การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเชลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในโครงข่ายแอลจิเนต และในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบกวนที่ใช้ปริมาตรทำงาน 1 ลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 50 รอบ/นาที และควบคุมพีเอชเท่ากับ 6 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัล มีจำนวนเชลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นของเชลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต และในเยื่อแอลจิเนต เท่ากับ 1.30×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตรเม็ดเจล และ 7.75×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตรแคปซูล ตามลำดับ (เม็ดเจลและแคปซูลเชลล์ตรึงมีปริมาตรเฉลี่ยเท่ากับ 0.02 และ 0.027 มิลลิลิตร ตามลำดับ) จะเห็นได้ว่า จำนวนเชลล์ที่มีชีวิตของเชลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนตมีจำนวนสูงกว่าจำนวนเชลล์ที่มีชีวิตของเชลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต แสดงให้เห็นว่า การตรึงเชลล์ในเยื่อแอลจิเนตสามารถบรรจุเชลล์ความหนาแน่นสูงกว่าการตรึงเชลล์ในโครงข่ายแอลจิเนต โดยผลการทดลองแสดงความเข้มข้นกลูโคสและกรดแลกติกดังภาพที่ 21 พิจารณาภาพที่ 21 (a) และภาพที่ 21 (b) ซึ่งเป็นการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในโครงข่ายแอลจิเนตและในเยื่อแอลจิเนต ตามลำดับ พบว่า เริ่มมีการใช้กลูโคสและการผลิตกรดแลกติกตั้งแต่วินาทีแรก โดยไม่มีระยะปรับตัว โดยมีการผลิตกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 7.17 และ 8.77 กรัม/ลิตร และมีความเข้มข้นกลูโคสเหลืออยู่เพียง 0.66 และ 1.20 กรัม/ลิตร ที่เวลาการหมัก 5 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ และหลังจากนั้นมีความเข้มข้นคงที่ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก5 และ ก6 ตามลำดับ) จากผลการทดลองที่ได้สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในโครงข่ายแอลจิเนตและในเยื่อแอลจิเนตสรุปได้ดังตารางที่ 12

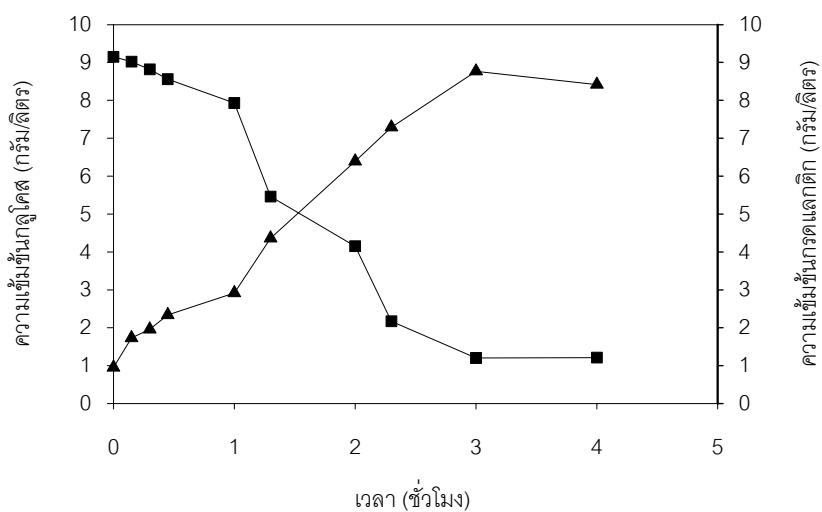
พิจารณาผลได้กรดแลกติก ($Y_{p/s}$) พบว่าการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนต มีผลได้กรดแลกติกเท่ากับ 0.98 กรัม/กรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่ากรณีของการใช้เชลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต โดยจะเห็นได้ว่าค่าที่ได้สอดคล้องกับค่าอัตราจำเพาะการใช้ซับสเตรต (q_s), อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.40 กรัม/กรัม ชั่วโมง, 0.39 กรัม/กรัม ชั่วโมง และ 2.61 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ โดยจะเห็นว่า อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรของเชลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนตมีค่าสูงกว่าเชลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต เท่ากับ 1.95 เท่า ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Yoo *et al.* (1996) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *Lactobacillus casei* ในเยื่อแอลจิเนต พบว่าการตรึงเชลล์ในเยื่อแอลจิเนตซึ่งประกอบด้วยแกนของเหลวช่วยให้เชลล์มีพื้นที่ในการเจริญเติบโตมาก

ขึ้น และสามารถเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ได้มากขึ้น ส่งผลให้การใช้เซลล์ตรึงในเยื่อแอลจินเตมีอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงกว่าการใช้เซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจินเต โดยสามารถใช้กลูโคสจนหมดและมีอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรมากกว่า 2.7 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นข้อดีของการตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจินเตที่สามารถบรรจุเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงกว่าการตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจินเต (Dembczynski and Jakowski, 2002) และ Norton *et al.* (1994) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *Lactobacillus helveticus* ในโครงข่ายแคปซูล-คาราจีแนนและไคคัสปีนกัน ได้รายงานว่าการตรึงเซลล์ในโครงข่ายแคปซูล-คาราจีแนนและไคคัสปีนกันสามารถเกิดภาวะยับยั้งจากความเข้มข้นของกรดแลกติกสูงได้ในบริเวณส่วนกลางของเม็ดเจล เนื่องจากข้อจำกัดของการแพร่ออกสู่ภายนอกเม็ดเจล นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนในการเตรียมเซลล์ตรึงทั้ง 2 ชนิดแสดงในตารางที่ 13 จะเห็นว่า การตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจินเตมีต้นทุนในการเตรียมเซลล์ตรึงต่ำกว่าการตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจินเตอีกด้วย

(a)



(b)



ภาพที่ 21 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 (a) โครงข่ายแอลจีเน็ต และ (b) เยื่อแอลจีเน็ต ในถังปฏิกรณ์แบบกวน ปริมาตรทำงาน 1 ลิตร ความเข้มข้น กลูโคสเริ่มต้น 7.52 และ 9.15 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคสและกรดแลกติก)

ตารางที่ 12 พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง
L. lactis IO-1 ในโครงข่ายแอลจีเนตและในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบกวน

พารามิเตอร์	เซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนต ¹	เซลล์ตรึงในเยื่อแอลจีเนต ²
$Y_{P/S}$ (กรัม/ลิตร)	0.94	0.98
q_s (กรัม/กรัม ชั่วโมง) ³	0.21	0.40
q_p (กรัม/กรัม ชั่วโมง) ³	0.20	0.39
Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	1.34	2.61

หมายเหตุ¹ และ ² ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 7.52 และ 9.15 กรัม/ลิตร

³ คำนวณจากความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 6.6 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 13 ต้นทุนของการเตรียมเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนต และในเยื่อแอลจีเนต

ชนิดของการตรึงเซลล์	สารเคมีที่ใช้ ¹	ราคา (บาท) ²
โครงข่ายแอลจีเนต	แอลจีเนต 2 เปอร์เซ็นต์ (20 กรัม)	257
	แคลเซียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ (45 กรัม)	23
	รวม	280
เยื่อแอลจีเนต	แอลจีเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ (12.5 กรัม)	161
	แคลเซียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (1.5 กรัม)	1
	แคลเซียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ (25 กรัม)	12
	PEG 6000 20 เปอร์เซ็นต์ (15 กรัม)	45
	รวม	219

หมายเหตุ¹ สำหรับการเตรียมเซลล์ตรึงเพื่อผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบกวนที่มีอาหาร
เพาะเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร

² คำนวณราคาในปี พ. ศ. 2546; โซเดียมแอลจีเนต (Sigma) ราคา 3,210 บาท/250
กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ (Ajax Finechem) ราคา 250 บาท/ 500 กรัม และ PEG
6000 (Fluka) ราคา 3,000 บาท/1 กิโลกรัม

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ระดับฟลาสก์ ด้วยวิธี Taguchi

3.1 การผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ระดับฟลาสก์

การศึกษากการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเชลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ระดับฟลาสก์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราเขย่า 100 รอบ/นาที ซึ่งออกแบบการทดลองด้วยวิธี Taguchi ประกอบด้วย 8 แฟกเตอร์ (2 ระดับ 1 แฟกเตอร์ และ 3 ระดับ 7 แฟกเตอร์) แสดงในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 8) อาศัยตาราง $L_{18} (2^1 \times 3^7)$ มีทั้งหมด 18 การทดลอง แสดงในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 9 พิจารณารูปความเข้มข้นกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) ได้ผลการทดลองทั้งหมดดังตารางที่ 14 และ 15 ตามลำดับ โดยแสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าอัตราส่วน Signal/Noise (S/N ratio) ส่วนพารามิเตอร์জনপলাস্ট্রিকারমাক্ ได้แก่ อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_s) และอัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_p) แสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก7 จากนั้นจึงนำค่าอัตราส่วน S/N มาคำนวณค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของแฟกเตอร์ เพื่อพิจารณาอิทธิพลของแฟกเตอร์ และระดับของแฟกเตอร์ที่เหมาะสมแสดงดังตารางที่ 16 และ 17 และภาพที่ 22 และ 23 ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์อิทธิพลของแฟกเตอร์ต่อความเข้มข้นกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร โดยวิธี ANOVA แสดงดังตารางที่ 18 และ 19 ตามลำดับ

จากผลการทดลองในตารางที่ 14 จะเห็นว่า มีความเข้มข้นเฉลี่ยของกรดแลกติกที่ได้ อยู่ระหว่าง 1.98-13.81 กรัม/ลิตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 0.0094-1.3540 ส่วนผลการทดลองในตารางที่ 15 พบว่า อัตราการผลิตเชิงปริมาตรเฉลี่ยของกรดแลกติกที่ได้ อยู่ระหว่าง 0.25-1.73 กรัม/ลิตร ชั่วโมง และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรอยู่ระหว่าง 0-0.1697 ส่วนอัตราส่วน S/N จะมีความสัมพันธ์กับผลการทดลองดังนี้ หากการทดลองใดมีค่าความเข้มข้นกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูง การทดลองนั้นก็จะมีค่าอัตราส่วน S/N สูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการออกแบบการทดลองเป็นแบบ QC=B (Bigger is better) โดยการทดลองที่ 9 ซึ่งประกอบด้วยสภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก คือ ชนิดของการตรึงเชลล์ในโครงข่ายแอลจีเนต, ความเข้มข้นเชลล์ของเชลล์ตรึงที่ใช้ 6.6 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 45 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นยีสต์สกัด 2.5 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นฟอสเฟต 10 กรัม/ลิตร, พีเอชเริ่มต้น 6.5, ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 2.5

กรัม/ลิตร และความเข้มข้นเปปโติน 7.5 กรัม/ลิตร มีความเข้มข้นและอัตราการผลิตเชิงปริมาตรของกรดแลกติกเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 13.81 กรัม/ลิตร และ 1.73 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์หิทธิพลของแต่ละแฟกเตอร์ในตารางที่ 16 และ 17 พบว่า แฟกเตอร์ที่มีค่าอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ประกอบด้วย 7 แฟกเตอร์ ได้แก่ ความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงที่ใช้, ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น, ความเข้มข้นยีสต์สกัด, ความเข้มข้นบีฟสด, พีเอชเริ่มต้น, ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ และความเข้มข้นเปปโติน โดยความเข้มข้นยีสต์สกัดมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nagarjun *et al.* (2005) ที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในสับสเตรตที่เป็นของแข็งโดย *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 ที่อาศัยวิธี Taguchi ในการออกแบบการทดลองเช่นเดียวกัน พบว่า เปอร์เซ็นต์ของยีสต์สกัดมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อเปอร์เซ็นต์การผลิตกรดแลกติกมากที่สุด ส่วนชนิดของการตรึงเซลล์ ได้แก่ การตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจิเนตและเยื่อแอลจิเนตมีอิทธิพลน้อยที่สุดโดยมีค่าอิทธิพลต่ำเพียง 1.30 และ 1.62 เปอร์เซ็นต์ ต่อความเข้มข้นกรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาค่า sum of squares ของแต่ละแฟกเตอร์จากผลการวิเคราะห์ ANOVA ในตารางที่ 18 และ 19 จะเห็นว่า แฟกเตอร์ D คือ ความเข้มข้นยีสต์สกัด มีค่า sum of squares สูงสุดเท่ากับ 60.43 และ 0.94 ตามลำดับ แสดงว่าความเข้มข้นยีสต์สกัดมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของกรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรมากที่สุด ส่วนแฟกเตอร์ A คือ ชนิดของการตรึงเซลล์ มีค่า sum of squares น้อยที่สุดเท่ากับ 4.0048 และ 0.0455 ตามลำดับ มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของกรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรน้อยที่สุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์หิทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีต่อความเข้มข้น และอัตราการผลิตเชิงปริมาตรของกรดแลกติกในตารางที่ 16 และ 17 ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่า ทุกแฟกเตอร์มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ ยกเว้น แฟกเตอร์ของชนิดของการตรึงเซลล์เท่านั้นที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นและอัตราการผลิตเชิงปริมาตรของกรดแลกติกอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ

จากภาพที่ 22 และ 23 สามารถพิจารณาระดับของแต่ละแฟกเตอร์ที่มีอัตราส่วน Signal/Noise สูงสุด ซึ่งสามารถสรุประดับของแต่ละแฟกเตอร์ที่เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกที่สอดคล้องกันได้นี้ ชนิดของการตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจิเนต, ความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงที่ใช้ 5.28 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 45 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นยีสต์สกัด 10 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นบีฟสด 10 กรัม/ลิตร, พีเอชเริ่มต้น 6.85, ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 10 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นเปปโตเน 7.5 กรัม/ลิตร โดยการวิเคราะห์แฟกเตอร์ที่มีผลต่อความเข้มข้นกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณในการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงระดับพลาสม์ ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกัน

หากพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้กับสภาวะในการทดลองที่ 9 ซึ่งมีความเข้มข้นกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณเฉลี่ยสูงสุด พบว่า มีบางสภาวะที่มีค่าแตกต่างกัน ได้แก่ ชนิดของการตรึงเซลล์ โดยในการทดลองที่ 9 ใช้เซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจิเนต ส่วนสภาวะที่เหมาะสมได้เซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต อธิบายได้ว่าการตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจิเนตมีข้อดีมากกว่าการตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจิเนต ดังที่กล่าวมาแล้วในการทดลองที่ 2 รวมทั้งพบว่า ชนิดของการตรึงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกน้อยที่สุด (ตารางที่ 16 และ 17), ความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงที่ใช้ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ สามารถลดความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงจากที่ใช้ในการทดลองที่ 2 เท่ากับ 6.6 กรัม/ลิตร เหลือ 5.28 กรัม/ลิตร ทำให้ต้นทุนในการเตรียมเซลล์ตรึงลดลง แสดงดังตารางที่ 20 เนื่องจากปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ตรึงมีส่วนลดลงตามความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงที่ใช้, ความเข้มข้นยีสต์สกัด พบว่าในการทดลองที่ 9 ใช้ความเข้มข้นยีสต์สกัดต่ำกว่าในสภาวะที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Kadam *et al.* (2005) พบว่า การใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดเท่ากับ 10 กรัม/ลิตร ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงที่สุดในการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียกรดแลกติกกลายพันธุ์ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 Mutant Uc-3 ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 135 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ Schepeers *et al.* (2005) ได้ศึกษาผลของหางนมและยีสต์สกัดในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *Lactobacillus helveticus* ในโครงข่ายแคปซาร์-คาราจีแนนและไลคัสปีนัม พบว่า หากลดความเข้มข้นของยีสต์สกัดจาก 10 กรัม/ลิตร เป็น 1 กรัม/ลิตร มีอิทธิพลให้อัตราการผลิตกรดแลกติกลดลง เนื่องจากทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียกิจกรรม รวมทั้งความเข้มข้นยีสต์สกัดมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกสูงที่สุด (ตารางที่ 16 และ 17), พีเอชเริ่มต้น พบว่าทั้งสองสภาวะที่ได้มีค่าไม่ต่างกันมาก คือ 6.5

และ 6.85 สำหรับการทดลองที่ 9 และจากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม หากทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดเจือจาง อาจช่วยให้กรดแลกติกที่สะสมในแคปซูลเซลล์ตรึงสามารถแพร่ออกมาได้ดียิ่งขึ้น โดยพีเอชเริ่มต้นมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกสูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16 และ 17) และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งพบว่า สภาวะที่เหมาะสมได้ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์สูงกว่าสภาวะที่ใช้ในการทดลองที่ 9 อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Dembczynski and Jankowski (2002) ซึ่งศึกษาลักษณะการเติบโตและการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus* ในเยื่อแอลจิเนตที่มีแบ่งเป็นแกนของเหลว โดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัม/ลิตร และมีความเข้มข้นน้อยกว่าการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตในการศึกษาของ Yoo *et al.* (1996) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus casei* ในเยื่อแอลจิเนต มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นสูงในช่วง 62.5-125 กรัม/ลิตร โดยมีจุดประสงค์เดียวกันเพื่อช่วยรักษาความคงตัวของเซลล์ตรึง รวมทั้งจากการวิเคราะห์ในตารางที่ 16 และ 17 พบว่า ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ในการศึกษาสามารถลดความเข้มข้นเปปโตโนจากความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร ที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS เหลือเท่ากับ 7.5 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นการข้อดีประการหนึ่งของการเลือกใช้วิธี Taguchi ในการออกแบบการทดลอง เพื่อคัดเลือกองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ช่วยให้สามารถลดต้นทุนของการผลิตกรดแลกติกลงได้ โดยสามารถคำนวณความเข้มข้นกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรที่คาดไว้ เมื่อทำการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi เท่ากับ 18 กรัม/ลิตร และ 2.30 กรัม/ลิตร ชั่วโมงตามลำดับ (สูตรคำนวณในภาคผนวก ข)

ตารางที่ 14 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงระดับฟลาสก์โดยวิธี Taguchi (ความเข้มข้นกรดแลกติก)

การทดลอง	ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัม/ลิตร): ชุดที่ 1	ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัม/ลิตร): ชุดที่ 2	ค่าเฉลี่ย	SD	S/N ratios (dB)
1	1.2082	2.7526	1.9804	1.0921	0.4389
2	6.9510	6.9377	6.9444	0.0094	6.9112
3	12.8972	13.3139	13.1055	0.2946	9.6677
4	7.7189	8.0483	7.8836	0.2330	7.4593
5	11.7372	11.4720	11.6046	0.1875	9.1403
6	12.4873	11.0447	11.7660	1.0201	9.1766
7	8.6985	8.2977	8.4981	0.2834	7.7844
8	12.5180	12.4571	12.4875	0.0430	9.4596
9	13.9411	13.6748	13.8080	0.1883	9.8955
10	8.2836	7.0482	7.6659	0.8735	7.2981
11	10.1611	9.9962	10.0786	0.1166	8.5284
12	7.3602	7.2246	7.2924	0.0958	7.1230
13	12.9994	11.0846	12.0420	1.3540	9.2606
14	10.4579	10.1079	10.2829	0.2475	8.6141
15	9.1519	9.7991	9.4755	0.4577	8.2533
16	10.6131	12.4428	11.5279	1.2937	9.0713
17	4.8431	4.5751	4.7091	0.1895	5.2190
18	8.6733	9.3270	9.0001	0.4623	8.0287
		ค่าเฉลี่ย	9.4529	0.4690	7.8517

หมายเหตุ ระดับของแต่ละแฟกเตอร์ของแต่ละการทดลองแสดงในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 9

ตารางที่ 15 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงระดับฟลาสก์โดยวิธี Taguchi (อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร, Q_p)

การทดลอง	Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	ค่าเฉลี่ย	SD	S/N ratios (dB)
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2			
1	0.15	0.34	0.245	0.1344	-8.6253
2	0.87	0.87	0.87	0	-2.1099
3	1.61	1.66	1.635	0.0354	0.6285
4	0.97	1.01	0.99	0.0283	-1.5515
5	1.47	1.39	1.43	0.0566	0.0431
6	1.56	1.38	1.47	0.1273	0.1436
7	1.09	1.04	1.065	0.0354	-1.2352
8	1.56	1.56	1.56	0	0.4261
9	1.74	1.71	1.725	0.0212	0.8622
10	1.11	0.88	0.995	0.1626	-1.6141
11	1.32	1.3	1.31	0.0141	-0.3328
12	0.92	0.9	0.91	0.0141	-1.9155
13	1.63	1.39	1.51	0.1697	0.2434
14	1.31	1.26	1.285	0.0354	-0.4186
15	1.14	1.22	1.18	0.0566	-0.7938
16	1.33	1.56	1.445	0.1626	0.0522
17	0.61	0.57	0.59	0.0283	-3.8041
18	1.08	1.17	1.125	0.0636	-1.0041
		ค่าเฉลี่ย	1.1856	0.0636	-1.1670

หมายเหตุ ระดับของแต่ละแฟกเตอร์ของแต่ละการทดลองแสดงในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 9

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์หือทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่อความเข้มข้นกรดแลกติกในการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงระดับฟลาสก์

ระดับ	A	B	C	D	E	F	G	H
1	7.7704	6.6612	6.8854	6.6324	7.0952	6.7796	7.3805	7.1031
2	7.9330	8.6507	7.9788	8.0414	8.0463	8.0345	7.4404	8.8073
3	-	8.2431	8.6908	8.8813	8.4136	8.7409	8.7341	7.6446
ค่าต่ำสุด	7.7704	6.6612	6.8854	6.6324	7.0952	6.7796	7.3805	7.1031
ค่าสูงสุด	7.9330	8.6507	8.6908	8.8813	8.4136	8.7409	8.7341	8.8073
ค่าอิทธิพล ¹	0.1626	1.9895	1.8054	2.2489	1.3183	1.9613	1.3535	1.7041
% ค่าอิทธิพล ²	1.30%	15.86%	14.39%	17.93%	10.51%	15.64%	10.79%	13.59%

หมายเหตุ ¹ ค่าอิทธิพลเท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

² % ค่าอิทธิพล คำนวณดังสูตรคำนวณในภาคผนวก ข โดยใช้ค่าอิทธิพลรวมเท่ากับ 12.5436

อักษรย่อ A, B, C, D, E, F, G, และ H หมายถึง แฟกเตอร์ของการผลิตกรดแลกติก แสดงไว้ในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 8

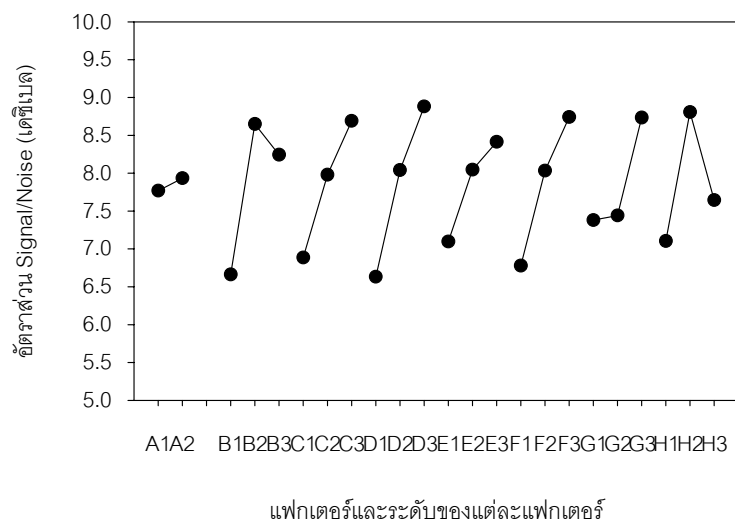
ตารางที่ 17 การวิเคราะห์หือทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่ออัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณในการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงระดับพลาสก์

ระดับ	A	B	C	D	E	F	G	H
1	-1.2687	-2.3282	-2.1217	-2.3742	-1.9121	-2.2553	-1.6670	-1.9280
2	-1.0653	-0.3890	-1.0327	-0.9964	-0.9821	-0.9727	-1.5689	-0.1902
3	-	-0.7838	-0.3465	-0.1304	-0.6068	-0.2730	-0.2650	-1.3827
ค่าต่ำสุด	-1.2687	-2.3282	-2.1217	-2.3742	-1.9121	-2.2553	-1.6670	-1.9280
ค่าสูงสุด	-1.0653	-0.3890	-0.3465	-0.1304	-0.6068	-0.2730	-0.2650	-0.1902
ค่าอิทธิพล ¹	0.2034	1.9392	1.7752	2.2438	1.3052	1.9823	1.4019	1.7378
% ค่าอิทธิพล ²	1.62%	15.40%	14.10%	17.82%	10.37%	15.75%	11.14%	13.80%

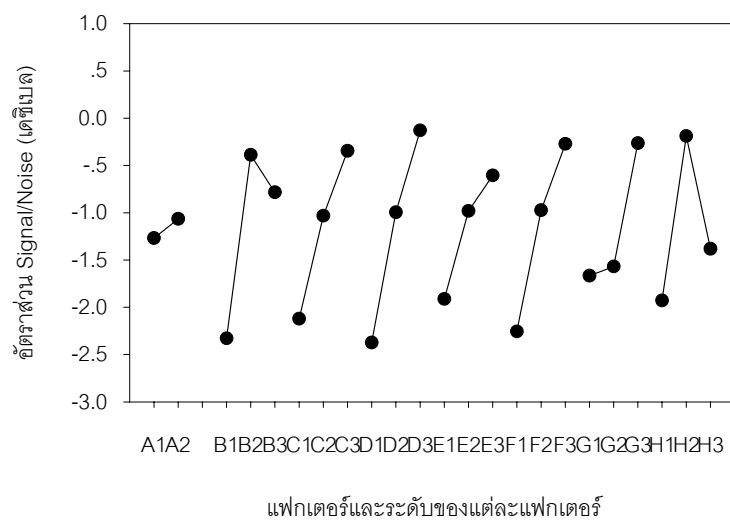
หมายเหตุ ¹ ค่าอิทธิพลเท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

² % ค่าอิทธิพล คำนวณดังสูตรคำนวณในภาคผนวก ข โดยใช้ค่าอิทธิพลรวมเท่ากับ 12.5890

อักษรย่อ A, B, C, D, E, F, G, และ H หมายถึง แฟกเตอร์ของการผลิตกรดแลกติก
แสดงไว้ในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 8



ภาพที่ 22 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกรดแลกติกในการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง



ภาพที่ 23 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรในการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์หือทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่อความเข้มข้นกรดแลกติกโดยวิธี ANOVA

แฟกเตอร์	Sum of Squares ¹	DOF ¹	Variance ¹	F-Ratio ¹	Confidence ¹	Significant
A	4.0048	1	4.00	9.82	99.4261%	**
B	48.0884	2	24.04	58.96	100.0000%	***
C	36.9377	2	18.47	45.29	100.0000%	***
D	60.4310	2	30.22	74.09	100.0000%	***
E	22.0025	2	11.00	26.98	99.9996%	***
F	33.3679	2	16.68	40.91	100.0000%	***
G	40.2650	2	20.13	49.37	100.0000%	***
H	44.6777	2	22.34	54.78	100.0000%	***
other	29.5497	2	14.77	36.23	100.0000%	***
Error	7.3403	18	0.41			
Total	326.6650	35				

หมายเหตุ ** และ *** มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ

¹ วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์หือทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่ออัตราการผลิตรวดแลกติกเชิงปริมาตร
โดยวิธี ANOVA

แฟกเตอร์	Sum of Squares ¹	DOF ¹	Variance ¹	F-Ratio ¹	Confidence ¹	Significant
A	0.0455	1	0.05	6.18	97.7013%	*
B	0.6803	2	0.34	46.18	100.0000%	***
C	0.5393	2	0.27	36.61	100.0000%	***
D	0.9411	2	0.47	63.87	100.0000%	***
E	0.3322	2	0.17	22.55	99.9987%	***
F	0.5357	2	0.27	36.36	100.0000%	***
G	0.6430	2	0.32	43.64	100.0000%	***
H	0.7407	2	0.37	50.28	100.0000%	***
other	0.5010	2	0.25	34.00	99.9999%	***
Error	0.1326	18	0.01			
Total	5.0915	35				

หมายเหตุ * และ *** มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ

¹ วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข

ตารางที่ 20 ต้นทุนของการเตรียมเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนต

ชนิดของการตรึงเซลล์	สารเคมีที่ใช้ ¹	ราคา (บาท) ²
เยื่อแอลจิเนต	แอลจิเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ (10 กรัม)	128
	แคลเซียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (1.2 กรัม)	1
	แคลเซียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ (20 กรัม)	10
	PEG 6000 20 เปอร์เซ็นต์ (12 กรัม)	36
รวม		175

หมายเหตุ ¹ สำหรับการเตรียมเซลล์ตรึงเพื่อผลิตกรดแลกติกในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร

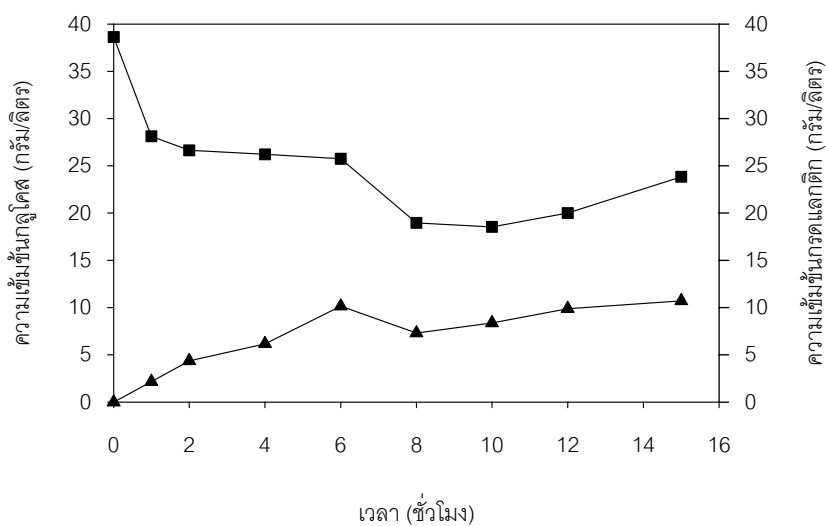
² คำนวณราคาในปี พ. ศ. 2546; ราคาสารเคมีดูรายละเอียดในตารางที่ 13

3.2 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi

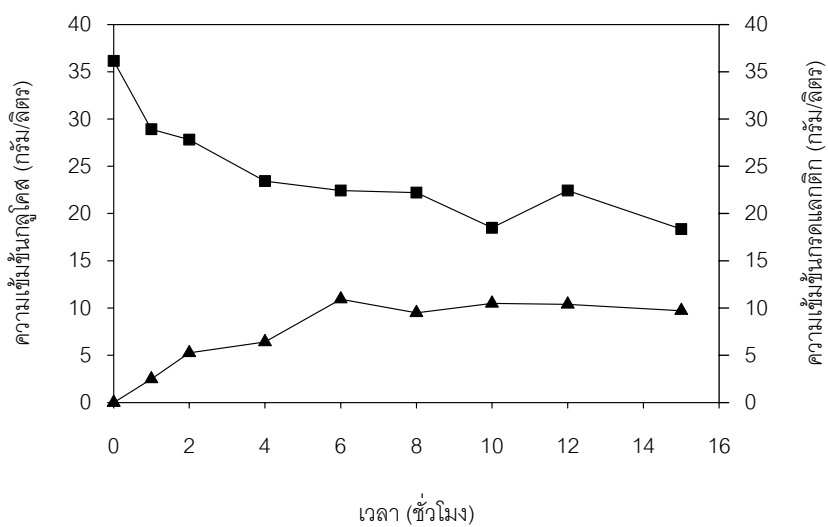
การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตระดับพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรทำงาน 100 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้รับ การออกแบบการทดลองโดยวิธี Taguchi ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ อัตราเขย่า 100 รอบ/นาที มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากับ 1.73×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตรแคปซูล (แคปซูลเซลล์ตรึงมีปริมาตรเฉลี่ยเท่ากับ 0.02 มิลลิลิตร) ผลการทดลองแสดงความเข้มข้นกลูโคส และกรดแลกติกของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จทั้ง 2 ชุด ดังภาพที่ 24 (a) และ 24 (b) ซึ่ง จะเห็นว่า มีการใช้กลูโคสและการผลิตกรดแลกติกตั้งแต่ชั่วโมงแรก โดยมีความเข้มข้นกลูโคสเหลือ เท่ากับ 25.74 และ 22.44 กรัม/ลิตร และมีความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 10.15 และ 10.94 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่เวลาการหมักเท่ากับ 6 ชั่วโมง (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก8 และ ก9 ตามลำดับ) จากผลการทดลองที่ได้สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์ จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิ- เนตภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi สรุปได้ดังตารางที่ 21

พิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ที่คำนวณได้จากการทดลอง พบว่า อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) ที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากค่าที่คำนวณได้จากการทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Taguchi ที่มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.74 กรัม/ลิตร ชั่วโมง (ในชุดที่ 1 การทดลองที่ 9: ตารางที่ 15) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.76 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ส่วนค่าผลได้กรดแลกติก ($Y_{p/s}$) ที่ได้มีค่าลดลงเท่ากับ 0.8 กรัม/กรัม จาก 0.94 กรัม/กรัม (ในชุดที่ 2 การทดลองที่ 8, ภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก7) และพบว่า ความเข้มข้นกรดแลกติกของการทดลองนี้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 10.94 กรัม/ลิตร (ภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก9) ซึ่งต่ำกว่าการทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Taguchi ที่ได้ความเข้มข้นกรดแลกติก สูงสุดเท่ากับ 13.9411 กรัม/ลิตร (ในชุดที่ 1 การทดลองที่ 9: ตารางที่ 14) โดยความเข้มข้นกรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรที่ได้มีค่าต่ำกว่าค่าที่คาดหวังที่คำนวณได้ ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการทดลองในระดับฟลask ซึ่งไม่มีการควบคุมพีเอช อีกทั้งยังใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นสูง โดย Roukas and Kotzekidou (1998) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *Lactobacillus casei* และ *Lactococcus lactis* ในโครงข่ายแอลจิเนต พบว่า ความเข้มข้นสับสเตรตเริ่มต้นสูง จะทำให้การใช้สับสเตรตลดลง ซึ่งเป็นผลของแรงดันออสโมติก ของเชลล์ที่เกิดขึ้นภายในสภาวะความเข้มข้นสูงของสารละลายน้ำตาล นอกจากนี้ ยังเป็นผลมาจากการเกิดภาวะยับยั้งโดยกรดแลกติกในระหว่างการผลิตกรดแลกติกที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสสูง ซึ่งมีความเข้มข้นกรดแลกติกภายในแคปซูลเชลล์ตรึงเท่ากับ 49.09 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 โดยจากการทดลองของ Senthuran *et al.* (1999) ได้มีการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชลล์ตรึง *Lactobacillus casei* subsp. *rharnosus* ที่ยึดเกาะกับ Pora-Bact A Beads พบว่า ความเข้มข้นของแลกเทตในน้ำหมักเป็นตัวยับยั้งการเติบโตของเชลล์ และมีผลกระทบต่อกลไกการถ่ายโอนสารละลายในเชลล์

(a)



(b)



ภาพที่ 24 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตระดับ
 ฟลาสิกภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ
 (a) 38.63 และ (b) 36.15 กรัม/ลิตร
 (สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคสและกรดแลกติก)

ตารางที่ 21 พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตระดับพลาสติกภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi

พารามิเตอร์	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จระดับพลาสติก	
	ชุดที่ 1 ¹	ชุดที่ 2 ²
$Y_{p/s}$ (กรัม/กรัม)	0.79	0.80
q_s (กรัม/กรัม ชั่วโมง) ³	0.41	0.43
q_p (กรัม/กรัม ชั่วโมง) ³	0.32	0.35
Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	1.69	1.82

หมายเหตุ¹ และ ² ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 38.63 และ 36.15 กรัม/ลิตร

³ คำนวณจากความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 5.28 กรัม/ลิตร

4. การผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed

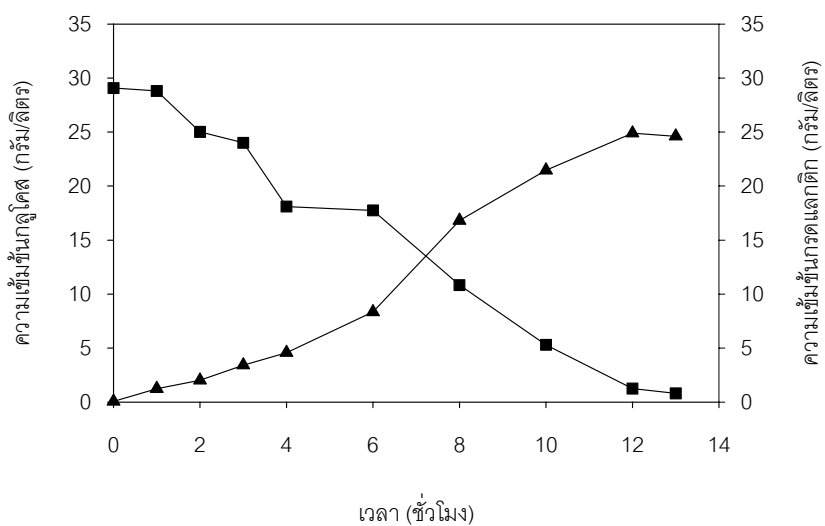
4.1 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed

การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรการทำงานของถังพักน้ำหมัก 1 ลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สรุปได้จากวิธี Taguchi ควบคุมสภาวะของการหมักในถังพักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบ/นาที และควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.85 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัล และควบคุมอัตราการไหลเข้าและออกจากคอลัมน์เซลล์ตรึงเยื่อแอลจิเนตเท่ากับ 0.96 ลิตร/ชั่วโมง โดยทำการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำ 2 ครั้ง มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากับ 6.72×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตรแคปซูล (แคปซูลเซลล์ตรึงมีปริมาตรเฉลี่ยเท่ากับ 0.02 มิลลิลิตร) ผลการทดลองแสดงความเข้มข้นกลูโคสและกรดแลกติกของการผลิตกรดแลกติกครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ดังภาพที่ 25 (a) และ 25 (b) ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าการผลิตกรดแลกติกทั้ง 2 ครั้ง มีการใช้กลูโคสและการผลิตกรดแลกติก

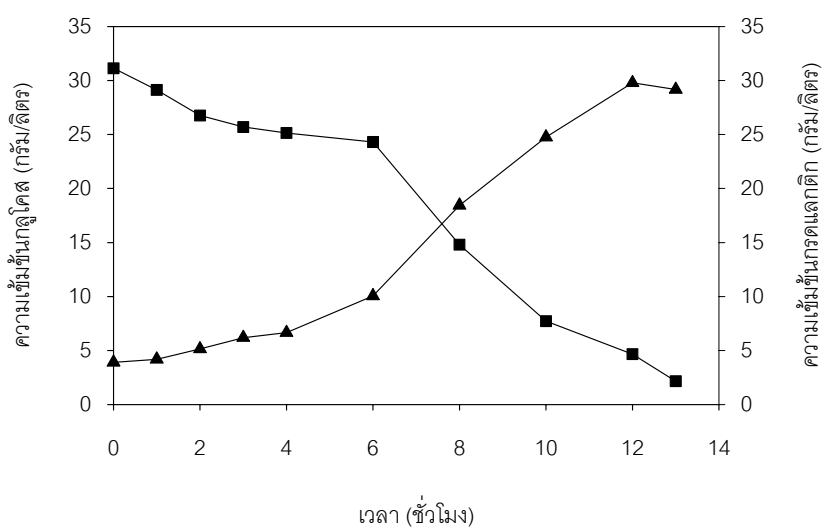
ตั้งแต่ชั่วโมงแรก จนถึงชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีความเข้มข้นกลูโคสเหลือเท่ากับ 1.25 และ 4.66 กรัม/ลิตร โดยมีความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 24.89 และ 29.78 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก10 และ ก11 ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าค่าความเข้มข้นกรดแลกติกที่คาดไว้ที่คำนวณได้ จากการทดลองที่ได้สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักของเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi สรุปได้ดังตารางที่ 22

พิจารณาผลได้กรดแลกติก ($Y_{P/S}$) พบว่า การหมักกรดแลกติกในครั้งที่ 2 มีค่าผลได้กรดแลกติก สูงขึ้นจาก 0.89 เป็น 0.98 กรัม/กรัม ซึ่งสอดคล้องกับอัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) ซึ่งมีค่าสูงกว่าการผลิตครั้งที่ 1 แต่พบว่า ค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรของทั้งสองครั้งมีค่าต่ำกว่าค่าที่คาดไว้ที่คำนวณได้ ส่วนอัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_s) ในครั้งที่ 2 มีค่าน้อยกว่าครั้งที่ 1 เล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากการล้างถังหมักและคอลัมน์ของแคปซูลเซลล์ตรึงเซลล์ตรึง รวมทั้งเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ ช่วยให้กรดแลกติกที่สะสมในแคปซูลเซลล์ตรึงแพร่ออกมาส่งเสริมประสิทธิภาพของการผลิตกรดแลกติก ทำให้ได้ค่าผลได้กรดแลกติก อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ทำให้เห็นความเป็นไปได้ของการผลิตกรดแลกติก แบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำ โดยการเพิ่มจำนวนครั้งของการผลิต ซึ่งก็อาจจะช่วยลดการสะสมของกรดแลกติกในแคปซูลเซลล์ตรึงได้ โดย Senthuran *et al.* (1997) ได้เสนอว่าการใช้ถังพักน้ำหมักที่มีใบพัดช่วยในการกวนเพื่อควบคุมพีเอชร่วมกับการใช้ถังหมักชนิด packed bed ที่ช่วยในการรักษาความคงตัวของเซลล์ตรึง หรือใช้ทางเลือกของการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง ซึ่งมีการเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ร่วมกับมีการดึงน้ำหมักในถังพักน้ำหมักออก อาจช่วยลดภาวะการสะสมของกรดแลกติกในแคปซูลเซลล์ตรึงลงได้

(a)



(b)



ภาพที่ 25 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi ความชื้นกูลโคสเริ่มต้น (a) 29.08 และ (b) 31.13 กรัม/ลิตร

(สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความชื้นกูลโคสและกรดแลกติก)

ตารางที่ 22 พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก
โดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed
ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi

พารามิเตอร์	การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก	
	ครั้งที่ 1 ¹	ครั้งที่ 2 ^{2,4}
$Y_{P/S}$ (กรัม/กรัม)	0.89	0.98
q_s (กรัม/กรัม ชั่วโมง) ³	0.44	0.42
q_p (กรัม/กรัม ชั่วโมง) ³	0.39	0.41
Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	2.07	2.16

หมายเหตุ^{1 และ 2} ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 29.08 และ 31.13 กรัม/ลิตร

³ คำนวณจากความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 5.28 กรัม/ลิตร

⁴ การผลิตครั้งที่ 2 ได้จากการดื่มน้ำหมักในรอบที่ 1 ออกจนหมด ล้างถังพักน้ำหมัก
และคอลัมน์เซลล์ตรึงเยื่อแอลจิเนตด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วจึงเติมอาหารเพาะ
เลี้ยงเชื้อใหม่ปริมาตร 1 ลิตร

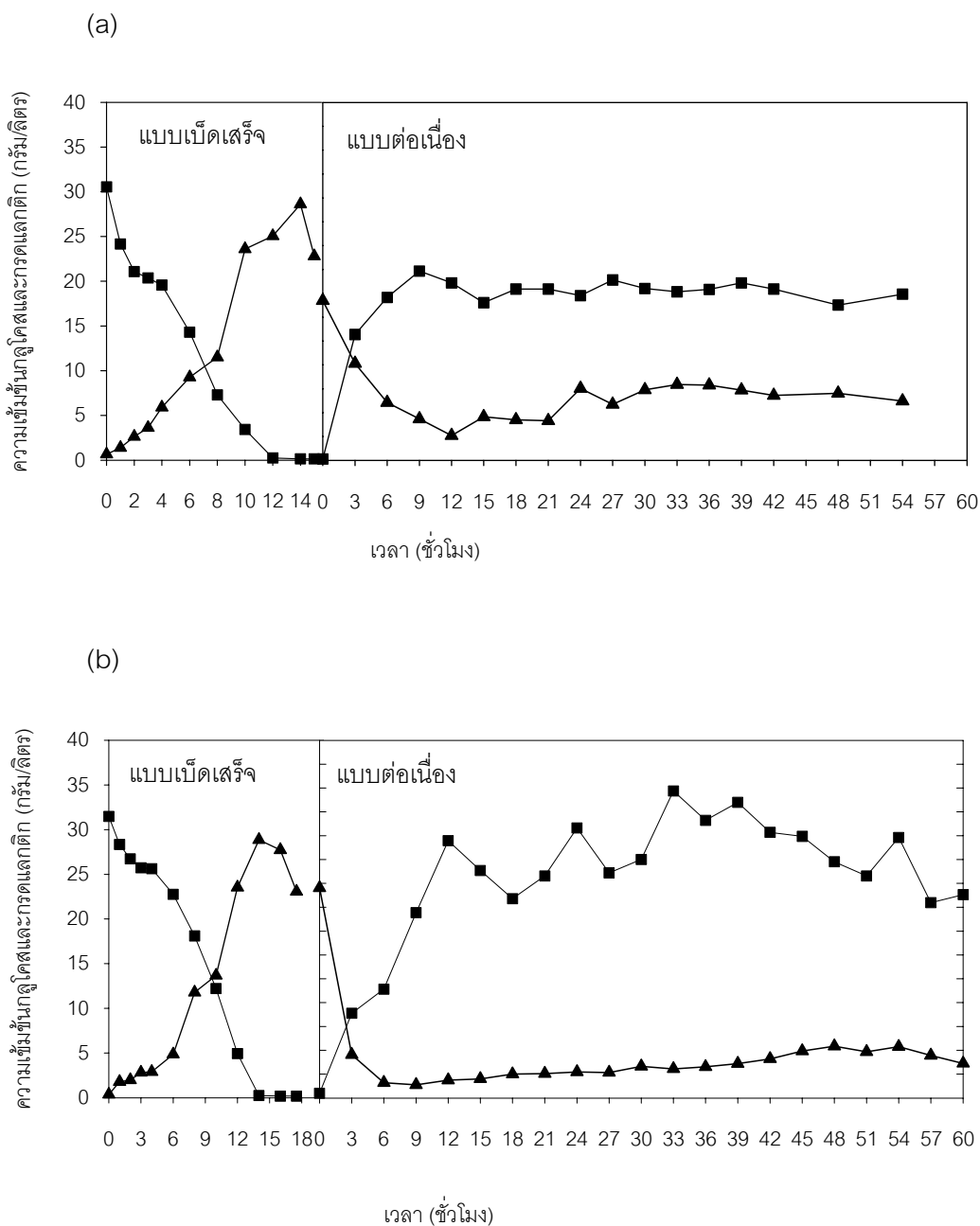
4.2 การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *Lactococcus*
lactis IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed

การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ใน
เยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ที่มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยการแปรผันอัตรา
การเจือจางเป็น 0.5 และ 1.0 ชั่วโมง⁻¹ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สรุปได้จากวิธี Taguchi ควบคุม
สภาวะของการหมักในถังพักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบ/นาที และ
ควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.85 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัล โดยควบคุมอัตราการ
ไหลเข้าและออกจากคอลัมน์เท่ากับ 0.96 ลิตร/ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากับ
 9.05×10^{10} และ 2.48×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตรแคปซูล (แคปซูลเซลล์ตรึงมีปริมาตรเฉลี่ยเท่ากับ 0.02
มิลลิลิตร) ของอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 และ 1.0 ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ แสดงผลการทดลองดัง
ภาพที่ 26 (a) และ 26 (b) ตามลำดับ พบว่า ณ สภาวะคงตัว (steady state) ความเข้มข้นกรด

แลกติกมีค่าเท่ากับ 8.91 และ 3.45 กรัม/ลิตร โดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับ 21.20 และ 31.27 กรัม/ลิตร ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 และ 1.0 ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก12 และ ก13 ตามลำดับ) จากผลการทดลองที่ได้สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์ของจลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจินเตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed สรุปได้ดังตารางที่ 23

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมัก ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 และ 1.0 ชั่วโมง⁻¹ พบว่า ผลได้กรดแลกติกของทั้งสองอัตราการเจือจางอยู่ระหว่าง 0.82-0.89 กรัม/กรัม โดยที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชั่วโมง⁻¹ มีอัตราจำเพาะการใช้สับสเทรต (q_s) และอัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_p) สูงกว่าการผลิตที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1.0 ชั่วโมง⁻¹ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) ของการผลิตกรดแลกติกที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชั่วโมง⁻¹ มีค่าเท่ากับ 4.46 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการผลิตที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1.0 ชั่วโมง⁻¹ เท่ากับ 1.29 เท่า เนื่องจากการผลิตกรดแลกติกที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชั่วโมง⁻¹ มี retention time ในถังหมักนานกว่าทำให้เซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถใช้กลูโคสและเปลี่ยนไปเป็นกรดแลกติกได้มากขึ้น โดยสอดคล้องกับการทดลองของ Tango and Ghaly (2002) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 ที่ยัดเกาะบนอลูมินา พบว่า เมื่อเพิ่ม hydraulic retention time ทำให้มีการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักทั้งสองอัตราการเจือจางมีอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงกว่าค่าที่คาดไว้ที่คำนวณได้

นอกจากนี้ สามารถเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักและแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจินเต สรุปดังตารางที่ 24 พบว่าผลได้กรดแลกติกของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักมีค่าเท่ากับ 0.94 กรัม/กรัม ซึ่งสูงกว่าการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.89 กรัม/กรัม และการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักมีอัตราจำเพาะการใช้กลูโคสและอัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก สูงกว่าการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักเท่ากับ 2.21 และ 2.10 เท่า ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร ซึ่งการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชั่วโมง⁻¹ มีค่าสูงกว่าการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักเท่ากับ 2.10 เท่า



ภาพที่ 26 การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi ควบคุมที่อัตราการเจือจางเท่ากับ (a) 0.5 และ (b) 1.0 ชั่วโมง⁻¹ ความเข้มข้นกลูโคสในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่เดิม (a) 31.25 และ (b) 35.48 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

(สัญลักษณ์ ■ และ ▲ ความเข้มข้นกลูโคสและการดแลกติก)

ตารางที่ 23 พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมัก
โดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed
ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi

พารามิเตอร์	อัตราการเจือจาง (ชั่วโมง ⁻¹)	
	0.5 ¹	1.0 ²
$Y_{P/S}$ (กรัม/กรัม)	0.89	0.82
q_s (กรัม/กรัม ชั่วโมง) ³	0.95	0.80
q_p (กรัม/กรัม ชั่วโมง) ³	0.84	0.65
Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	4.46	3.45

หมายเหตุ¹ และ ² ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ใช้เติมเท่ากับ 31.25 และ
35.48 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

³ คำนวณจากความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 5.28 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 24 เปรียบเทียบพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จและ
แบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตใน
ถังปฏิกรณ์แบบ packed bed

พารามิเตอร์	แบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก ¹	แบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมัก ²
$Y_{P/S}$ (กรัม/กรัม)	0.94	0.89
q_s (กรัม/กรัม ชั่วโมง)	0.43	0.95
q_p (กรัม/กรัม ชั่วโมง)	0.40	0.84
Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	2.12	4.46

หมายเหตุ¹ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ชุด (ตารางที่ 22)

² อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชั่วโมง⁻¹

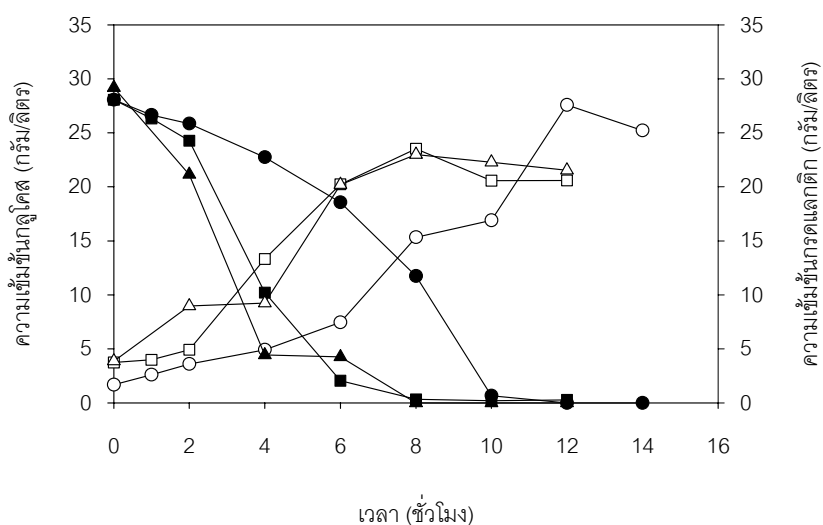
4.3 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเชลล์ตรึง *Lactococcus lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจินเตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed

การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเชลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจินเตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ที่มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi ควบคุมสภาวะของการหมักในถังพักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบ/นาที และควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.85 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มัล และมีอัตราการไหลเข้าและออกจากคอลัมน์เชลล์ตรึงเท่ากับ 0.96 ลิตร/ชั่วโมง มีจำนวนเชลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากับ 6.74×10^{10} เชลล์/มิลลิลิตรแคปซูล (แคปซูลเชลล์ตรึงมีปริมาตรเฉลี่ยเท่ากับ 0.027 มิลลิลิตร) ได้ผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกลูโคส และความเข้มข้นกรดแลกติกของการผลิตครั้งที่ 1, 2 และ 3 ดังภาพที่ 27 พบว่าการผลิตครั้งที่ 1 และ 2 มีระยะปรับตัวจนถึงชั่วโมงที่ 2 ส่วนครั้งที่ 3 ไม่มีระยะปรับตัว โดยการผลิตครั้งที่ 1, 2 และ 3 มีความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 27.58, 23.52 และ 23.00 กรัม/ลิตร ซึ่งทั้งสามรอบการผลิตมีความเข้มข้นกรดแลกติกสูงกว่าค่าที่คาดไว้ที่คำนวณได้ โดยมีความเข้มข้นกลูโคสเหลือเท่ากับ 0, 0.33 และ 0 กรัม/ลิตร ณ ชั่วโมงที่ 12, 8 และ 8 ของการหมัก ตามลำดับ จากนั้นความเข้มข้นกลูโคสและกรดแลกติกจึงคงที่จนกระทั่งถึงชั่วโมงการหมักที่ 12-14 (ข้อมูลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก14, ก15 และ ก16 ตามลำดับ) จากผลการทดลองที่ได้สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเชลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจินเตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed สรุปดังตารางที่ 25

เมื่อพิจารณาค่าผลได้กรดแลกติก ($Y_{P/S}$) จะเห็นว่า ค่าผลได้กรดแลกติกลดลงเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งของการผลิต โดยครั้งที่ 1 มีค่าผลได้กรดแลกติกเท่ากับ 0.92 กรัม/กรัม และมีค่าลดลงเหลือเท่ากับ 0.71 และ 0.66 กรัม/กรัม เมื่อทำการผลิตในครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนอัตราจำเพาะการใช้กลูโคสมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งของการผลิต แสดงให้เห็นว่าเชลล์ตรึงเยื่อแอลจินเตมีการใช้กลูโคสเพิ่มขึ้น เนื่องจากการล้างคอลัมน์ของเชลล์ตรึงแต่ละครั้งเป็นการเจือจางความเข้มข้นกลูโคสภายในแคปซูลเชลล์ตรึง เมื่อมีการเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ใหม่ ทำให้กลูโคสสามารถแพร่เข้าไปในแคปซูลเชลล์ตรึงได้เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เชลล์ตรึงสามารถใช้กลูโคสได้ดีขึ้น เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ พบว่าอัตราการผลิตเชิงปริมาณของกรดแลกติกครั้งที่ 2 และ 3 มีค่าสูงกว่าการผลิตครั้งที่ 1 เท่ากับ 1.14 และ 1.11 เท่า ตามลำดับ โดย

การผลิตครั้งที่ 2 มีอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 2.47 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการผลิตครั้งที่ 3 เพียงเล็กน้อย จะเห็นว่าครั้งที่ 2 และ 3 มีอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรสูงกว่าค่าที่คาดไว้ที่คำนวณได้ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับอัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก เนื่องจากเมื่อทำการผลิตซ้ำ กรดแลกติกที่สะสมอยู่ในแคปซูลเซลล์ตรึงจะแพร่ออกมา ทำให้ในน้ำหมักมีความเข้มข้นกรดแลกติกเพิ่มขึ้น ดังจะเห็นได้จากผลการทดลอง (ภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก14, ก15 และ ก16) โดยความเข้มข้นกรดแลกติกในชั่วโมงที่ 0 ของการผลิตครั้งที่ 2 และ 3 สูงขึ้นกว่าการผลิตครั้งที่ 1 จึงทำให้ค่าผลได้กรดแลกติกมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งของการผลิตกรดแลกติก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Amrane and Prigent (1999) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactobacillus helveticus* พบว่า ความเข้มข้นกรดแลกติกเริ่มต้นสูงส่งผลให้การผลิตกรดแลกติกลดลงจากภาวะยับยั้งของกรดแลกติก

สามารถเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักแบบต่อเนื่อง เวียนกลับน้ำหมัก และแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำด้วยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed สรุปได้ดังตารางที่ 26 พบว่า การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักมีอัตราจำเพาะการใช้กลูโคส, อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร สูงกว่าการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก และแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำ เท่ากับ 2.21 และ 1.58, 2.10 และ 1.91 และ 2.10 และ 1.91 เท่า ตามลำดับ



ภาพที่ 27 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 เยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจาก วิธี Taguchi ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นของการผลิตครั้งที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 28.05, 28.05 และ 29.17 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (สัญลักษณ์ ●, ■, ▲ และ ○, □, △ ความเข้มข้นกลูโคสและกรดแลกติกของการผลิตครั้งที่ 1, 2, 3 ตามลำดับ)

ตารางที่ 25 พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก
ซ้ำโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed
ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi

พารามิเตอร์	การผลิตแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำ		
	ครั้งที่ 1 ¹	ครั้งที่ 2 ¹	ครั้งที่ 3 ²
$Y_{P/S}$ (กรัม/กรัม)	0.92	0.71	0.66
q_s (กรัม/กรัม ชั่วโมง) ³	0.44	0.66	0.69
q_p (กรัม/กรัม ชั่วโมง) ³	0.41	0.47	0.45
Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	2.16	2.47	2.39

หมายเหตุ¹ และ ² ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 28.05 และ 29.17 กรัม/ลิตร ตามลำดับ
³ คำนวณจากความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 5.28 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 26 เปรียบเทียบพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียน
กลับน้ำหมัก แบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมัก และแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำ
ด้วยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed

พารามิเตอร์	แบบเบ็ดเสร็จ เวียนกลับน้ำหมัก ¹	แบบเบ็ดเสร็จ เวียนกลับน้ำหมักซ้ำ ²	แบบต่อเนื่อง เวียนกลับน้ำหมัก ³
$Y_{P/S}$ (กรัม/กรัม)	0.94	0.76	0.89
q_s (กรัม/กรัม ชั่วโมง)	0.43	0.60	0.95
q_p (กรัม/กรัม ชั่วโมง)	0.40	0.44	0.84
Q_p (กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	2.12	2.34	4.46

หมายเหตุ¹ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ชุด (ตารางที่ 22)

² ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง (ตารางที่ 25)

³ อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชั่วโมง⁻¹ (ตารางที่ 23)

สรุปผลการทดลอง

การผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนตของแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactococcus lactis* IO-1 พบว่าค่าผลได้กรดแลกติก ($Y_{P/S}$) ของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) ของเซลล์ตรึงในโครงข่ายแอลจีเนตที่เพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 0.66 และ 1.32 กรัม มีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระ 1.10 และ 1.52 เท่าตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงสามารถเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรได้ด้วยการเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้น ผลการทดลองที่ได้สามารถอธิบายด้วยแบบจำลองจลนพลศาสตร์อย่างง่าย เมื่อเลียนแบบกระบวนการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงโดยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่าอธิบายการผลิตกรดแลกติกได้ดี แต่อธิบายการใช้กลูโคสได้ไม่เหมาะสมเฉพาะกรณีที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.66 กรัม ถ้าพิจารณาภาวะยับยั้งที่เกิดขึ้นจากความเข้มข้นของกลูโคสและกรดแลกติกร่วมด้วย จะทำให้แบบจำลองจลนพลศาสตร์อธิบายการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม การพัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง จะต้องคำนึงถึงสภาวะทางกายภาพของเม็ดเจลเซลล์ตรึงและอิทธิพลของการแพร่ของกลูโคสและกรดแลกติกด้วย

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ระหว่างการตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจีเนต และการตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบกวนปริมาตรทำงาน 1 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงเริ่มต้นเท่ากัน คือ 6.6 กรัม/ลิตร พบว่า การตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจีเนตมีค่าผลได้การผลิตกรดแลกติก, อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส, อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก และอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร สูงกว่าการตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจีเนต โดยเฉพาะค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร สูงกว่าการตรึงเซลล์ในโครงข่ายแอลจีเนตเท่ากับ 1.95 เท่า

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกโดยใช้วิธี Taguchi ในระดับฟลาค์ โดยศึกษาชนิดของการตรึงเซลล์, ความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงที่ใช้, ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น, ความเข้มข้นยีสต์สกัด, ความเข้มข้นบีฟสด, พีเอชเริ่มต้น, ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ และความเข้มข้นเปปโตเน สรุปได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก ในระดับฟลาค์ ดังนี้ ชนิดของการตรึงเซลล์ในเยื่อแอลจีเนต, ความเข้มข้นเซลล์ของเซลล์ตรึงที่ใช้

เท่ากับ 5.28 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 45 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นยีสต์สกัดเท่ากับ 10 กรัม/ลิตร, ความเข้มข้นฟอสเฟตเท่ากับ 10 กรัม/ลิตร, พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.85, ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 10 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นเบปโตเนเท่ากับ 7.5 กรัม/ลิตร เมื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ดังกล่าวในระดับฟลasks พบว่า มีอัตราการการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรเฉลี่ยเท่ากับ 1.76 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ซึ่งมีค่าสูงขึ้นเล็กน้อย ส่วนผลได้กรดแลกติกที่ได้มีค่าน้อยลงเล็กน้อย เนื่องจากการผลิตกรดแลกติกที่ไม่มีการควบคุมพีเอชระหว่างการผลิต ซึ่งทำให้เกิดภาวะยับยั้งโดยกรดแลกติกได้ในระหว่างการผลิตกรดแลกติกภายใต้สภาวะเหมาะสมดังกล่าว นอกจากนี้ ยังพบว่าทั้ง 8 แพกเตอร์ที่ศึกษานั้นมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกรดแลกติก และอัตราการการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรในการผลิตกรดแลกติกอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัดมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงมากที่สุด

การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักด้วยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi พบว่า การผลิตกรดแลกติกในครั้งที่ 2 ให้ค่าผลได้กรดแลกติก, อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก และอัตราการการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรไม่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงครั้งแรก แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะทำการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำ เพื่อช่วยลดการสะสมความเข้มข้นของกรดแลกติกในแคปซูลเซลล์ตรึง โดยการผลิตรั้งใหม่ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ช่วยให้อัตราการการผลิตกรดแลกติกไม่ลดลงจากภาวะยับยั้งโดยกรดแลกติกที่สะสมภายในแคปซูลเซลล์ตรึง ส่วนการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมัก สามารถช่วยลดความเข้มข้นกรดแลกติกในแคปซูลเซลล์ตรึงและเพิ่มอัตราการการผลิตกรดแลกติกขึ้นได้เช่นเดียวกัน

การศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยแปรผันอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 และ 1.0 ชั่วโมง⁻¹ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi พบว่า การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึงที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชั่วโมง⁻¹ มีอัตราการการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรเท่ากับ 4.46 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างกับการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์อิสระ *L. lactis* IO-1 แบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.81 ชั่วโมง⁻¹ ซึ่งอัตราการการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรเท่ากับ 4.42 กรัม/ลิตร ชั่วโมง (เกสร, 2545) นอกจากนี้ ยัง

พบว่า การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักมีอัตราจำเพาะการใช้กลูโคส และอัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติกสูงกว่าการผลิตแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมัก โดยที่อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรของการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชั่วโมง^{-1} สูงกว่าการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักประมาณ 2.10 เท่า

อย่างไรก็ตาม การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 และ 1.0 ชั่วโมง^{-1} ยังคงมีความเข้มข้นกลูโคสเหลืออยู่สูง 21.20 และ 31.27 กรัม/ลิตรตามลำดับ จึงได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed แบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำ โดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธี Taguchi ในสามรอบของการผลิต พบว่า อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อทำการผลิตในครั้งที่ 2 และมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อทำการผลิตในครั้งที่ 3 ส่วนค่าผลได้กรดแลกติกมีค่าลดลง เมื่อเพิ่มจำนวนครั้งของการผลิต ซึ่งอธิบายได้ว่าเกิดจากภาวะยับยั้งโดยกรดแลกติกที่สะสมในแคปซูลเซลล์ตรึง และความเข้มข้นกรดแลกติกในน้ำหมักสูง โดย Schepers *et al.* (2002b) ได้ศึกษาแบบจำลองของจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactobacillus helveticus* R 211 พบว่าทอมของภาวะยับยั้งโดยกรดแลกติกมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยภาวะยับยั้งโดยกรดแลกติกที่เกิดขึ้นจากผลของความเข้มข้นแลกเทตที่อยู่ในน้ำหมักเพิ่มขึ้น

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึงเยื่อแอลจิเนตให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p) สูงสุดเท่ากับ 4.46 กรัม/ลิตร ชั่วโมง ส่วนการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเซลล์ตรึงในเยื่อแอลจิเนตมีประสิทธิภาพสูงในการใช้กลูโคส ทำให้ความเข้มข้นกลูโคสเหลือน้อยมากหรือถูกใช้หมดไปหลังสิ้นสุดการผลิต และได้ปริมาณกรดแลกติกสูง โดยมีความเข้มข้นกรดแลกติก 23.00-27.58 กรัม/ลิตร

ข้อเสนอแนะ

การปรับปรุงแก้ไขระบบการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำ เพื่อลดภาวะยับยั้งจากการสะสมของกรดแลกติกภายในแคปซูลเซลล์ตรึง อาจจำเป็นต้องใช้วิธีการเจือ

จากกรดแลกติกภายในแคปซูลเซลล์ตรึงด้วยน้ำกลั่นมาเชื่อก่อนทำการผลิตกรดแลกติกในรอบของการผลิตต่อไป ซึ่งอาจทำให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตรไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเพิ่มจำนวนรอบของการผลิตกรดแลกติก ตลอดจนคงสภาพความเสถียรของเซลล์ที่มีชีวิตภายในแคปซูลเซลล์ตรึงได้นานที่สุด หรืออาจปรับอัตราการไหลเข้าและออกของคอลัมน์เซลล์ตรึงเยื่อแอลจีเนต เพื่อเพิ่มอัตราการแพร่เข้า-ออกของสารละลายของแคปซูลเซลล์ตรึง ซึ่ง Santhuran *et al.* (1997) รายงานไว้ว่า การเพิ่มอัตราการไหลเข้าและออกของคอลัมน์เซลล์ตรึง *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ที่ยัดเกาะบน Pora-Bact A Beads ช่วยให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงขึ้น

ในการพัฒนาระบบการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เซลล์ตรึง จำเป็นจะต้องหาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่เหมาะสมมาแทนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS เนื่องจากใช้องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนที่มีราคาแพง หรืออาจศึกษาการลดระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงไม่จำเป็นต้องใช้แหล่งอาหารไนโตรเจน เพื่อใช้ในการเติบโตของเซลล์แบคทีเรียอย่างในกรณีที่ใช้เซลล์อิสระในการผลิตกรดแลกติก นอกจากนี้ อาจเลือกใช้วัตถุดิบเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมทดแทน เช่น หางนม (whey) ซึ่งมีการใช้เป็นสับสเตรตอย่างแพร่หลายในกระบวนการผลิตกรดแลกติก Mostafa (1996) อธิบายว่าหางนมเป็นสับสเตรตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกมากกว่าการใช้สับสเตรตในรูปแลคโทสบริสุทธ์ เนื่องจากในหางนมมีสารอาหารที่จำเป็นอื่น ๆ ประกอบอยู่ด้วย หรือการใช้แป้งข้าวสาลีเป็นสับสเตรต ซึ่ง Naveena *et al.* (2005) พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactobacillus amylophilus* GV6 มีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดแลกติกได้โดยตรง จึงเป็นวิธีการใหม่ที่สามารถนำวัตถุดิบที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม เป็นต้น นอกจากนี้ การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ จะต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพล อาทิ อัตราการเจือจาง อัตราการไหลเข้าและออกของคอลัมน์เซลล์ตรึง และผลของปัจจัยอื่น ๆ เป็นต้น โดยอาศัยวิธี Taguchi ในการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยเหล่านั้นต่อการผลิตกรดแลกติก ซึ่งสามารถลดจำนวนการทดลอง และทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการศึกษาได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์ กระทรวงพาณิชย์. 2546. **สถิติการนำเข้าและส่งออกกรดอินทรีย์ของประเทศไทย**. กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์ กระทรวงพาณิชย์.

เกสร กิตติกุลธรรม. 2545. **การผลิตกรดแลกติกด้วยการหมักแบบต่อเนื่องที่มีระบบหมุนเวียนเซลล์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2531. **การตรึงเอนไซม์และเซลล์**. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มนัส สังวรศิลป์ และ วรัตน์ ภัทรอมรกุล. 2543. **คู่มือการใช้งาน MATLAB ฉบับสมบูรณ์**. สำนักพิมพ์ อินโฟเพรส, นนทบุรี.

มีชัย ลัดดี. 2546. **การผลิตกรดแลกติกด้วยการหมักแบบต่อเนื่องสองขั้นตอน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ศิริโชค. 2544. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. บริษัท พิมพ์ดี จำกัด., กรุงเทพฯ.

สาโรจน์ ศิริคั่นสนียกุล. 2544. การผลิตกรดแลกติกในอุตสาหกรรม. **ส่งเสริมเทคโนโลยี** 158: 88-94.

สาโรจน์ ศิริคั่นสนียกุล. 2546. Green PLA พลาสติกยุคใหม่ไร้มลพิษ. **ส่งเสริมเทคโนโลยี** 168: 150-156.

Akerberg, C. and G. Zacchi. 2000. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. **Bioresour. Technol.** 75: 119–126.

- Amrane, A. and Y. Prigent. 1999. Differentiation of pH and free lactic acid effects on the various growth and production phases of *Lactobacillus helveticus*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 74: 33-40.
- Anuradha, R., A. K. Suresh and K. V. Venkatesh. 1999. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. **Process Biochem.** 35: 367–375.
- Barker, S.B. and W.H. Summerson. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. **J. Biol. Chem.** 138: 535-554.
- Bai, D. M., Z. H. yan, Q. Wei, X. M. Zhao, X. G. Li and S. M. Xu. 2004. Ammonium lactate production by *Lactobacillus lactis* BME5-18M in pH-controlled fed-batch fermentation. **Biochem. Eng. J.** 19: 47-51.
- 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 a defined medium. **Biotechnol. Lett.** 21: 163-167.
- 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.
- Boyaval, P. and J. Goulet. 1988. Optimal conditions for production of lactic acid from cheese whey permeate by Ca-alginate-entrapped *Lactobacillus helveticus*. **Enzyme Microb. Technol.** 10: 725-728.
- Bozoglu, T. F. and B. Ray. 1996. **Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.

- Brodelius, P. and E.J. Vandamme. 1987. Immobilized Cell Systems, pp. 405-464. *In* J.F. Kennedy, ed. **Biotechnology**. Vol 7a. VCH, Weinheim.
- Buchta, K. 1983. Lactic acid, pp. 409-417. *In* H. Dellweg, ed. **Biotechnology**. Vol. 3. VCH, Weinheim.
- Casson, D. and A. N. Emery. 1986. On the elimination of artefactual effect in assessing the structure of calcium alginate cell immobilization gels. **Enzyme Microb. Technol.** 9: 102–106.
- Chaplin, M. 2005. Alginate. **Google Search**. Available Source: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>, January 11, 2006.
- Chibata, I. 1982. Principles of Immobilized Enzymes and Microbial Cells, pp. 3-17 *In* T. W. Flegel, V. Meevootison, A. Bhumiratana and P. Matangkasombut, eds. **Immobilized Microbial Enzyme and Cells**. Department of Microbiology Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok.
- Chinachoti, N., K. Sonomoto and A. Ishizaki. 1997. Immobilization of *Lactococcus lactis* IO-1 for nisin Z production. **J. Fac. Agr. Kyushu Univ.** 42 (1–2): 151–169.
- Dasu, V. V., T. Panda and M. Chidambaram. 2003. Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method. **Process Biochem.** 38: 877-880.
- Davidson, B. M. 1997. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds, pp. 524-525. *In* M. P. Dole, L. R. Beuchat and T. J. Montrille, eds. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington D. C.

- Dembczynski, R. and T. Jankowski. 2002. Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. **Enzyme Microb. Technol.** 31: 111-115.
- Fu, W. and A. P. Mathews. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. **Biochem. Eng. J.** 3: 163-170.
- Fukuda, H. 1995. Immobilized Microorganism Bioreactor, pp. 339–375. *In* J. A. Asenjo and J. C. Merehuk, eds. **Bioreactor System Design**. Mareel dekker, INC.
- Gemeiner, P., L. Rexova – Benkova, F. Svec and O. Norrlov. 1994. Natural and Synthetic Carriers Suitable for Immobilization of Viable Cells, Active Organelles, and Molecules, pp. 1–128. *In* I. A. Veliky and R. J. C. Mclean, eds. **Immobilized Biosystems**. Chapman & Hall.
- Gordon, F.B. 1997. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Humana Press, Totowa, N. J.
- Ha, M.-Y., S.-W. Kim, Y.-W. Lee, M.-J. Kim and S.-J. Kim. 2003. Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/corn steep liquor/glucose medium. **J. Biosci. Bioeng.** 96(2): 134-140.
- Hofvendahl, K. and B. Hahn-Hägerdal. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 87-107.

Ishizaki, A., K. Osajima, K. Nakamura, K. Kimura, T. Hara and S. Ogata. 1990a. General character and taxonomic study of *Lactococcus lactis* IO-1, JCM 7638. **J. Fac. Agr. Kyushu Univ.** 35 (1-2): 1-7.

. 1990b. Biochemical characterization of *Lactococcus lactis* IO-1 whose optimal temperature is as high as 37°C, JCM 7638. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 36:1-6.

Ishizaki, A. and P. Vonkaveesuk. 1996. Optimization of substrate feed for continuous production of lactic acid by *Lactococcus lactis* IO-1. **Biotechnol. Lett.** 18 (10): 1113-1118.

Jane, E. F. and B. F. Gordon. 1997. **Entrapment in Calcium Alginate**. Humana Press.

Kadam, S. R., S. S. Patil, K. B. Bastawde, J. M. Khire and D. V. Gokhale. 2005. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. **Process Biochem.** 41 (1): 120-126.

Kasuga, T., Y. Ota, M. Nogami and Y. Abe. 2001. Preparation and mechanical properties of polylactic acid composites containing hydroxyapatite fibers. **Biomaterials** 22: 19-23.

Kašćák, J. S., J. Komínek and M. Roehr. 1996. Lactic acid, pp. 294-306. *In* H.-J. Rehm and G. Reed, eds. **Biotechnology**. vol. 6. VCH, Weinheim.

Koyama, K. and M. Seki. 2004. Cultivation of yeast and plant cell entrapped in the low-viscous liquid-core of an alginate membrane capsule prepared using polyethylene glycol. **J. Biosci. Bioeng.** 97 (2): 111-118.

Kulozik, U. and J. Wilde. 1999. Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. **Enzyme Microb. Technol.** 24: 297–302.

Kwon, S., I. Yoo, W. G. Lee, H. N. Chang and 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.

Lee, B.H. 1996. **Fundamental of Food Biotechnology**. VCH Publishing.

Lochner, R. H. and J. E. Matar. 1990. **Designing for Quality**. Chapman and Hall, UK.

Milcent, S. and H. Carrere. 2001. Clarification of lactic acid fermentation broths. **Sep. Pur. Technol.** 22–23: 393–401.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.

Mostafa, N. A. 1996. Production of lactic acid from whey with agar immobilized cells in a continuous packed tubular reactor. **Energy Convers. Mgmt.** 37(3): 253–260.

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. Microbiol.** 43 (1): 38-43.

- Nakasaka, K. and T. Adachi. 2003. Effects of intermittent addition of cellulose for production of L-lactic acid from wastewater sludge by simultaneous saccharification and fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 82 (3): 263-270.
- Naveena, B. J., Md. Altaf, K. Bhadrappa, S. S. Madhavendra and G. Reddy. 2005. Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM. **Process Biochem.** 40: 681-690.
- Norton, S., C. Lacroix and J. Vuilleumard. 1994. Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 457-466.
- 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.
- Oh, H., Y. J. Wee, J. S. Yun, S. H. Han, S. Jung and H. W. Ryu. 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. **Bioresour. Technol.** 96: 1492–1498
- Prasad, K. K., S. V. Mohan, R. S. Rao, B. R. Pati and P. N. Sarma. 2005. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. **Biochem. Eng. J.** 24: 17-26.
- Rao, R. S., R. S. Prakasham, K. K. Prasad, S. Rajesham, P. N. Sarma and L. V. Rao. 2004. Xylitol production by *Candida sp.*: parameter optimization using Taguchi approach. **Process Biochem.** 39: 951-956.

Ratledge, C. and B. Kristiansen. 2001. **Basic Biotechnology**. 2nd ed. Cambridge.

Ross, P. J. 1996. **Taguchi Techniques for Quality Engineering**. The McGraw-Hill Companies, Inc., USA.

Roukas, T. and P. Kotzekidou. 1998. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. **Enzyme Microb. Technol.** 22: 199–204.

Roy, R. K. 2001. **Design of Experiments Using the Taguchi Approach**. John Wiley & Sons, Inc., Canada.

Schepers, A. W., J. Thibault and C. Lacroix. 2002a. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 176-186.

_____. 2002b. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part II. kinetic modeling and model validation. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 187-194.

_____. 2006. Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: Model and experiments. **Enzyme Microb. Technol.** 38 (3-4): 324-337.

- Senthuran, A., V. Senthuran, B. Mottiasson and R. aul. 1997. Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*. **Biotechnol. Bioeng.** 55 (6): 841–853.
- Senthuran, A., V. Senthuran, R. Kaul and B. Mattiasson. 1999. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. **J. Biotechnol.** 73: 61-70.
- Shuler, M. L. and F. Kargi. 2002. **Bioprocess Engeneering**. Prentice Hall, Inc., USA.
- Siebold, M., P. V. Frieling, R. Joppien, D. Rindfleisch, K. Schügerl and H. Röper. 1995. Comparison of the production of lactic acid by three different Lactobacilli and its recovery by extraction and electrodialysis. **Process Biochem.** 30(1): 81-95.
- Silva, E. M. and S. T. Yang. 1992. Kinetics and stability of a fibrous-bed bioreactor for continuous production of lactic acid from unsupplemented acid whey. **J. Biotechnol.** 41: 59-70.
- Sirisansaneeyakul, S., C. N. Hipolito, G. Kobayashi, 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 Annaul Reports of ICBiotech.** 21: 504-524.
- Sirisansaneeyakul, S., P. Mekvichitsaeng, K. Kittikusolthum, S. Pattaragukwanit, M. Laddee, S. Bhuwapathanapun and A. Ishizaki. 2000. Lactic acid production from starch hydrolysates using *Lactococcus lactis* IO-1. **Thai J. Agric. Sci.** 33 (1-2): 53-64.

- Sun, Y., Y. L. Li and S. Bai. 1999. Modeling of continuous L(+)-lactic acid production with immobilized *R. oryzae* in an airlift bioreactor. **Biochem. Eng. J.** 3: 87-90.
- Tango, M. S. A. and A. E. Ghaly. 1999. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. **Biomass Bioenergy**. 16: 61-78.
- _____. 2002. A continuous lactic acid production system using an immobilized packed bed of *Lactobacillus helveticus*. **Appl. Microb. Biotechnol.** 58: 712–720.
- 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.
- Trauth, E., J. Lemaitre, C. Rojas, C. Divies and R. Cachon. 2001. Resistance of immobilized lactic acid bacteria to the inhibitory effect of quaternary ammonium sanitizers. **Lebensm–Wiss.U–Technol.** 34: 239–243.
- Tsui, K. L. 1988. Strategies for planning experiments using orthogonal arrays and confounding tables. **Qual. reliab. eng. int.** 4: 113-122.
- 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.

Waite, M. J., N. L. Morgan, J. S. Rockey and G. Higon. 2001. **Industrial Microbiology**. Alackwell Scienec Ltd., London.

Yoo, I., G. H. Seong, H. N. Chang and J. K. Park. 1996. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. **Enzyme Microb. Technol.** 19: 428-433.

Yun, J. S. and H. W. Ryu. 2001. Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. **Process Biochem.** 37: 235–240.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ก1 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์อิสระ *L. lactis* IO-1 ระดับฟลาสก์ (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.40 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความทึบแสง (OD ₅₆₂)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)		
		กลูโคส	เซลล์ ¹	กรดแลกติก
0	2.975	9.40	1.04	1.20
1	5.330	4.62	1.30	5.21
2	5.625	2.64	1.36	7.78
3	5.640	2.05	1.37	8.41
4	5.445	1.84	1.32	8.55
6	5.340	1.25	1.30	8.37
7	5.355	1.17	1.31	8.49
8	5.160	1.08	1.24	7.55

หมายเหตุ ¹ คำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรและความเข้มข้นเซลล์ (ภาคผนวก ค: ภาพผนวกที่ ค1)

ตารางผนวกที่ ก2 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในโครงข่ายแอลจิเนตระดับฟลาสก์ (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.08 กรัม/ลิตร และปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.132 กรัม ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ปริมาตร 200 มล.)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	9.08	1.12
1	7.69	1.61
2	5.73	3.68
3	4.81	5.14
4	3.63	6.52

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
5	2.73	6.78
6	2.21	7.40
7	1.82	7.36
8	1.79	7.75
9	1.86	8.21
10	1.86	8.17

ตารางผนวกที่ ก3 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในโครงข่าย
แอลจีเนตระดับฟลาสก์ (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.99 กรัม/ลิตร และ
ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.66 กรัม ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ปริมาตร 200
มล.)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	9.99	0.91
1	6.27	2.44
2	4.21	6.67
3	3.39	8.38
4	1.17	9.01
5	1.22	8.91
6	1.17	8.74
7	0.97	8.81
8	0.77	8.93
9	0.87	8.83
10	0.77	8.81

ตารางผนวกที่ ก4 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในโครงข่าย
แอลจีเนตระดับฟลาสก์ (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.50 กรัม/ลิตร และ
ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1.32 กรัม ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ปริมาตร 200
มล.)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	9.50	0.77
1	3.25	6.04
2	1.36	7.48
3	0.35	9.17
4	0.22	8.94
5	0.19	8.66
6	0.19	8.88
7	0.19	8.35
8	0.17	8.36
9	0.17	8.13
10	0.21	8.18

ตารางผนวกที่ ก5 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในโครงข่าย
แอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบกวน (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 7.52 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	7.52	0.45
0.5	7.41	1.13
1	7.06	1.17
1.5	6.55	1.37
2	5.21	2.03

ตารางผนวกที่ ก5 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
3	3.92	3.50
4	3.40	4.52
5	0.66	7.17
6	0.47	7.07
7	0.45	7.18
8	0.45	7.40
9	0.42	7.18
10	0.45	6.85

ตารางผนวกที่ ก6 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิ-
เนตในถังปฏิกรณ์แบบกวน (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 9.15 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	9.15	0.95
0.25	9.02	1.73
0.5	8.82	1.96
0.75	8.56	2.34
1	7.93	2.92
1.5	5.46	4.36
2	4.15	6.39
2.5	2.17	7.29
3	1.20	8.77
4	1.21	8.42

ตารางผนวกที่ ก7 จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ตรึง *L. lactis*

IO-1 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Taguchi

ชุดที่ 1					ชุดที่ 2				
จำนวน	พารามิเตอร์				จำนวน	พารามิเตอร์			
การทดลอง	$Y_{P/S}$	q_S	q_P	Q_P	การทดลอง	$Y_{P/S}$	q_S	q_P	Q_P
1	0.17	0.23	0.04	0.15	1	0.37	0.23	0.09	0.34
2	0.60	0.37	0.22	0.87	2	0.57	0.39	0.22	0.87
3	0.72	0.57	0.41	1.61	3	0.72	0.58	0.42	1.66
4	0.71	0.26	0.18	0.97	4	0.67	0.26	0.19	1.01
5	0.93	0.30	0.28	1.47	5	0.99	0.26	0.26	1.39
6	0.53	0.56	0.30	1.56	6	0.46	0.56	0.26	1.38
7	0.84	0.20	0.16	1.09	7	0.76	0.21	0.16	1.04
8	0.91	0.26	0.24	1.56	8	0.94	0.25	0.24	1.56
9	0.90	0.29	0.26	1.74	9	0.86	0.30	0.26	1.71
10	0.78	0.36	0.28	1.11	10	0.55	0.40	0.22	0.88
11	0.51	0.66	0.33	1.32	11	0.51	0.65	0.33	1.30
12	0.55	0.42	0.23	0.92	12	0.58	0.39	0.23	0.90
13	0.85	0.36	0.31	1.63	13	0.74	0.35	0.26	1.39
14	0.78	0.32	0.25	1.31	14	0.82	0.29	0.24	1.26
15	0.45	0.48	0.22	1.14	15	0.45	0.49	0.23	1.22
16	0.89	0.22	0.20	1.33	16	0.88	0.27	0.24	1.56
17	0.29	0.32	0.09	0.61	17	0.29	0.30	0.09	0.57
18	0.36	0.46	0.16	1.08	18	0.40	0.44	0.18	1.17

ตารางผนวกที่ ก8 การผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจินในระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi ชุดที่ 1 (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น เท่ากับ 38.63 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	38.63	0
1	28.13	2.17
2	26.65	4.35
4	26.22	6.16
6	25.74	10.15
8	18.97	7.30
10	18.53	8.39
12	20.00	9.89
15	23.83	10.72

ตารางผนวกที่ ก9 การผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi ชุดที่ 2 (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น เท่ากับ 36.15 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	36.15	0
1	28.91	2.49
2	27.82	5.25
4	23.44	6.41
6	22.44	10.94
8	22.31	9.50
10	18.49	10.50
12	22.44	10.39
15	18.36	9.72

ตารางผนวกที่ ก10 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed รอบที่ 1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 29.08 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	29.08	0.06
1	28.81	1.24
2	25.02	2.02
3	24.00	3.43
4	18.11	4.58
6	17.75	8.35
8	10.84	16.80
10	5.31	21.47
12	1.25	24.89
13	0.80	24.61

ตารางผนวกที่ ก11 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed รอบที่ 2 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 31.13 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	31.13	3.91
1	29.13	4.19
2	26.76	5.14
3	25.70	6.20
4	25.15	6.65
6	24.30	10.06
8	14.80	18.44
10	7.72	24.75
12	4.66	29.78
13	2.16	29.16

ตารางผนวกที่ ก12 การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจาก วิธี Taguchi (อัตราการผลิตเท่ากับ 0.5 ชั่วโมง⁻¹ และความเข้มข้นกลูโคสในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่เติมเท่ากับ 31.25 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
แบบเบ็ดเสร็จ		
0	30.54	0.67
1	24.17	1.40
2	21.07	2.64
3	20.37	3.62
4	19.57	5.91
6	14.31	9.28
8	7.31	11.51
10	3.45	23.59
12	0.25	25.06
14	0.15	28.61
15	0.15	22.80
แบบต่อเนื่อง		
0	0.18	20.10
3	15.83	12.19
6	20.48	7.29
9	23.81	5.22
12	22.32	3.13
15	19.82	5.48
18	21.55	5.10
21	21.55	5.00
24	20.71	9.03

ตารางผนวกที่ ก12 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลคติก
27	22.68	7.05
30	21.61	8.87
33	21.19	9.55
36	21.49	9.48
39	22.32	8.83
42	21.55	8.18
48	19.52	8.45
54	20.89	7.46

ตารางผนวกที่ ก13 การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องเวียนกลับน้ำหมักโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากวิธี Taguchi (อัตราการเจือจางเท่ากับ 1.0 ชั่วโมง^{-1} และความเข้มข้นกลูโคสในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ได้เท่ากับ 35.48 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
แบบเบ็ดเสร็จ		
0	31.48	0.38
1	28.33	1.79
2	26.73	2.00
3	25.73	2.84
4	25.63	2.92
6	22.77	4.87
8	18.12	11.80
10	12.21	13.69
12	4.95	23.54
14	0.25	28.85
16	0.20	27.71
17.5	0.20	23.06
แบบต่อเนื่อง		
0	0.60	26.44
3	10.66	5.45
6	13.71	1.94
9	23.33	1.66
12	32.38	2.26
15	28.63	2.40
18	25.08	3.00
21	27.93	3.08

ตารางผนวกที่ ก13 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลคติก
24	33.98	3.27
27	28.33	3.22
30	30.03	3.98
33	38.64	3.67
36	34.93	3.92
39	37.19	4.33
42	33.43	4.92
45	32.93	5.91
48	29.73	6.52
51	27.93	5.81
54	32.78	6.45
57	24.57	5.35
60	25.58	4.36

ตารางผนวกที่ ก14 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ครั้งที่ 1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 28.05 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	28.05	1.68
1	26.66	2.61
2	25.86	3.60
4	22.75	4.91
6	18.57	7.45
8	11.74	15.34
10	0.66	16.90
12	0	27.58
14	0	25.22

ตารางผนวกที่ ก15 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ครั้งที่ 2 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 28.05 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	28.05	3.75
1	26.33	3.99
2	24.27	4.91
4	10.21	13.33
6	2.06	20.23
8	0.33	23.52
10	0.20	20.57
12	0.27	20.60

ตารางผนวกที่ ก16 การผลิตกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จเวียนกลับน้ำหมักซ้ำโดยเซลล์ตรึง *L. lactis* IO-1 ในเยื่อแอลจิเนตในถังปฏิกรณ์แบบ packed bed ครั้งที่ 3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธี Taguchi (ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 29.17 กรัม/ลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	
	กลูโคส	กรดแลกติก
0	29.17	3.87
2	21.15	8.97
4	4.44	9.24
6	4.25	20.21
8	0	23.00
10	0	22.29
12	0	21.54

ภาคผนวก ข
การประมาณค่าพารามิเตอร์

ตารางผนวกที่ ข1 สูตรการคำนวณพารามิเตอร์ในการทดลองการหมักกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จ

พารามิเตอร์	สูตรคำนวณ
ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$, กรัม/กรัม)	$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$
ผลได้กรดแลกติก ($Y_{P/S}$, กรัม/กรัม)	$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$
อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_s , กรัม/กรัม ชั่วโมง)	$q_s = \frac{1}{\bar{X}} \left(\frac{dS}{dt} \right) = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2} \right)} \left(\frac{S_0 - S_t}{t - t_0} \right)$
อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_p , กรัม/กรัม ชั่วโมง)	$q_p = \frac{1}{\bar{X}} \left(\frac{dP}{dt} \right) = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2} \right)} \left(\frac{P_t - P_0}{t - t_0} \right)$
อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p , กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	$Q_p = \frac{dP}{dt} = \left(\frac{P_t - P_0}{t - t_0} \right)$

หมายเหตุ เมื่อ X, S, P และ t หมายถึง ความเข้มข้นเซลล์ กลูโคส กรดแลกติก มีหน่วยเท่ากับ กรัม/ลิตร และ เวลา มีหน่วยเท่ากับ ชั่วโมง ตามลำดับ
ตัวห้อย 0 และ t หมายถึง ที่เวลาเริ่มต้น และที่เวลาใด ๆ ตามลำดับ

ตัวอย่างการคำนวณพารามิเตอร์ในการทดลองการหมักกรดแลกติกแบบเบ็ดเสร็จ

ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$); พิจารณาข้อมูลการทดลองในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1 (ชั่วโมงที่ 4)

$$Y_{X/S} = \frac{1.32 - 0.71}{9.40 - 1.84} = 0.08 \text{ กรัม/กรัม}$$

ผลได้กรดแลกติก ($Y_{P/S}$); พิจารณาข้อมูลการทดลองในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก10 (ชั่วโมงที่ 12)

$$Y_{P/S} = \frac{24.89 - 0.06}{29.08 - 1.25} = 0.89 \text{ กรัม/กรัม}$$

อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_S); พิจารณาข้อมูลการทดลองในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก10 (ชั่วโมงที่ 12)

$$q_S = \frac{1}{5.28^*} \left(\frac{29.08 - 1.25}{12 - 0} \right) = 0.44 \text{ กรัม/กรัม ชั่วโมง}$$

หมายเหตุ * ในกรณีของเซลล์ตรึงใช้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น

อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_p); พิจารณาข้อมูลการทดลองในภาคผนวก ก:
ตารางผนวกที่ ก10 (ชั่วโมงที่ 12)

$$q_p = \frac{1}{5.28^*} \left(\frac{24.89 - 0.06}{12 - 0} \right)$$

$$= 0.39 \text{ กรัม/กรัม ชั่วโมง}$$

หมายเหตุ * ในกรณีของเซลล์ตรึงใช้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น

อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p); พิจารณาข้อมูลการทดลองในภาคผนวก ก:
ตารางผนวกที่ ก10 (ชั่วโมงที่ 12)

$$Q_p = \left(\frac{24.89 - 0.06}{12 - 0} \right)$$

$$= 2.07 \text{ กรัม/ลิตร ชั่วโมง}$$

ตารางผนวกที่ ๒2 สูตรการคำนวณพารามิเตอร์ในการทดลองการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง
ณ สภาวะคงตัว

พารามิเตอร์	สูตรคำนวณ
อัตราการเจือจาง (D , ชั่วโมง ⁻¹)	$D = \frac{F}{V}$
ผลได้กรดแลกติก ($Y_{P/S}$, กรัม/กรัม)	$Y_{P/S} = \left(\frac{P}{S_0 - S} \right)$
อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_s , กรัม/กรัม ชั่วโมง)	$q_s = \frac{D(S_0 - S_t)}{X}$
อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_p , กรัม/กรัม ชั่วโมง)	$q_p = \frac{DP}{X}$
อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_p , กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	$Q_p = DP$

หมายเหตุ เมื่อ X , S , P และ t หมายถึง ความเข้มข้นเซลล์ กลูโคส กรดแลกติก มีหน่วยเท่ากับ
กรัม/ลิตร และ เวลา มีหน่วยเท่ากับ ชั่วโมง ตามลำดับ, F และ V หมายถึง อัตราการ
ไหล (ลิตร/ชั่วโมง) และ ปริมาตรทำงานของถังหมัก (ลิตร) ตามลำดับ
ตัวห้อย 0 และ t หมายถึง ที่เวลาเริ่มต้น และที่เวลาใด ๆ ตามลำดับ

ตัวอย่างการคำนวณพารามิเตอร์ในการทดลองการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง
ณ สภาวะคงตัว

ผลได้กรดแลกติก ($Y_{P/S}$); พิจารณาข้อมูลการทดลองในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก12 (ชั่วโมงที่ 24-54)

$$Y_{P/S} = \frac{8.91}{(31.25 - 21.20)}$$

$$= 0.89 \text{ กรัม/กรัม}$$

อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_S); พิจารณาข้อมูลการทดลองในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก12 (ชั่วโมงที่ 24-54)

$$q_S = \frac{0.5(31.25 - 21.20)}{5.28}$$

$$= 0.95 \text{ กรัม/กรัม ชั่วโมง}$$

อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_P); พิจารณาข้อมูลการทดลองในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก12 (ชั่วโมงที่ 24-54)

$$q_P = \frac{0.5 \times 8.91}{5.28}$$

$$= 0.84 \text{ กรัม/กรัม ชั่วโมง}$$

อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_P); พิจารณาข้อมูลการทดลองในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก10 (ชั่วโมงที่ 12)

$$Q_P = 0.5 \times 8.91$$

$$= 3.45 \text{ กรัม/ลิตร ชั่วโมง}$$

การคำนวณในการออกแบบโดยวิธี Taguchi (Roy, 2001)

1. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N-1}} \quad (7)$$

2. เปอร์เซ็นต์อิทธิพล (% main effect)

$$\text{เปอร์เซ็นต์อิทธิพล} = \frac{(\text{ค่าอิทธิพลสูงสุด} - \text{ค่าอิทธิพลต่ำสุด})}{\text{ค่าอิทธิพลสูงสุด}} \times 100 \quad (8)$$

3. ค่า Factor sum of square (SS_{Factor})

$$SS_{\text{Factor}} = \frac{N \times r}{L} \sum_{k=1}^L (\bar{y}_k - \bar{y})^2 \quad (9)$$

4. ค่า Error sum of square (SS_{Error})

$$SS_{\text{Error}} = \sum (SD)^2 \times (r-1) \quad (10)$$

5. ค่าองศาอิสระของแฟกเตอร์ (DOF_{Factor})

$$DOF_{\text{Factor}} = L - 1 \quad (11)$$

6. ค่าองศาอิสระของข้อผิดพลาด (DOF_{Error})

$$DOF_{\text{Error}} = N(r-1) \quad (12)$$

7. ค่าองศาอิสระรวม (DOF_{Total})

$$DOF_{Total} = (N \times r) - 1 \quad (13)$$

8. ค่าความแปรปรวน (variance, Var)

$$Var = \frac{SS}{DOF} \quad (14)$$

9. ค่าสัดส่วนความแปรปรวน (variance ratio, F_{ratio})

$$F_{ratio} = \frac{Var}{Var_{Error}} \quad (15)$$

10. ค่าความเชื่อมั่น (confidence)

$$Confidence = 100 - F_{DIST}(F_{ratio}, DOF_{Factor}, DOF_{Error}) \times 100 \quad (16)$$

11. การหาค่าผลการทดลองที่คาดหวัง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (result expected at optimum condition, Y_{opt})

$$Y_{opt} = \bar{T} + (\bar{A}_2 - \bar{T}) + (\bar{B}_2 - \bar{T}) + (\bar{C}_3 - \bar{T}) + (\bar{D}_3 - \bar{T}) \\ + (\bar{E}_3 - \bar{T}) + (\bar{F}_3 - \bar{T}) + (\bar{G}_3 - \bar{T}) + (\bar{H}_2 - \bar{T}) \quad (17)$$

หมายเหตุ F_{DIST} เป็นค่าที่คำนวณโดยใช้ฟังก์ชันสำเร็จรูปในโปรแกรม excel โดยเป็นความสัมพันธ์

ระหว่างค่า F_{ratio} , DOF_{Factor} , DOF_{Error} โดย y , $\bar{y}$, N , r , L , k และ $\bar{T}$ หมายถึง ผลการทดลอง

ค่าเฉลี่ยของการทดลอง จำนวนการทดลอง จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง จำนวนระดับของ

แฟกเตอร์ ระดับของแฟกเตอร์ และ ค่าเฉลี่ยของผลรวมของการทดลองทั้งหมด ตามลำดับ

และ $\bar{A}_2$, $\bar{B}_2$, $\bar{C}_3$, $\bar{D}_3$, $\bar{E}_3$, $\bar{F}_3$, $\bar{G}_3$ และ $\bar{H}_2$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของผลรวมของการ

ทดลองของแต่ละระดับของแฟกเตอร์ที่เหมาะสมที่ได้

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์

การหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยวิธีอบแห้ง

1. เตรียมกระดาษกรอง (cellulose acetate filter, Sartorius) เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมครอน ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักแน่นอน

2. ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง โดยอาศัยชุดอุปกรณ์การกรอง ซึ่งประกอบด้วย กรวยกรองแก้วขนาด 30 มิลลิลิตร ที่มีฐานรองแก้ว คลิปหนีบ ตะแกรงกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร และประเก็นวงแหวน (Satorius, Germany)

3. ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร

4. นำเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. ทิ้งให้เย็นในเดสิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักเซลล์พร้อมกระดาษกรองที่แน่นอน จากนั้นจึงนำไปคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักกระดาษกรองและเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักกระดาษกรอง (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$

การประมาณค่าน้ำหนักเซลล์แห้งโดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิธีการ

1. การสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

1.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ในช่วงการเติบโตที่อุดมเชื้อจุลินทรีย์เจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราเจือจางที่เหมาะสมประมาณ 4-5 อัตราเจือจาง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

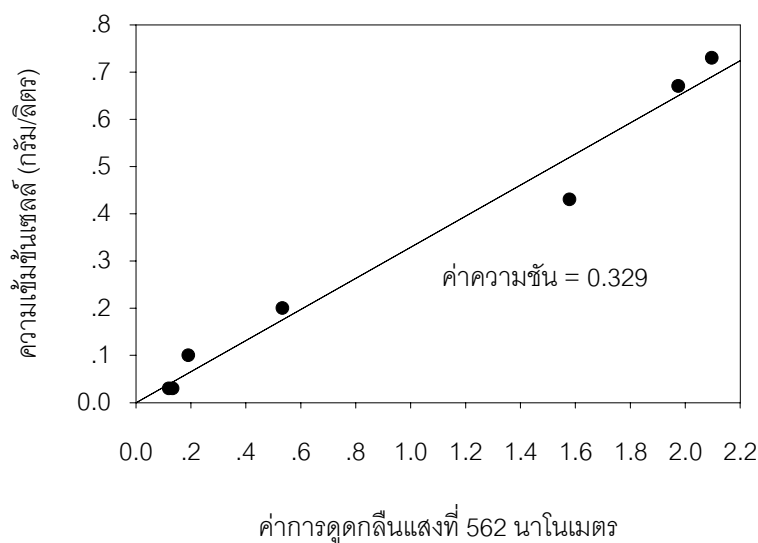
1.2 การหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยวิธีอบแห้ง

นำตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์เดียวกันที่นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในข้อที่ 1.1 ไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยวิธีอบแห้งดังวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เพื่อใช้คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งของแต่ละอัตราการเจือจาง

1.3 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร พร้อมหาค่าความชันของกราฟเส้นตรงดังภาพผนวกที่ ค1

2. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร} \times \text{อัตราการเจือจาง} \times \text{ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน}$$



ภาพผนวกที่ ค1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรและความเข้มข้นเซลล์

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (Miller, 1959)

สารเคมี

1. DNS reagent ซึ่งประกอบด้วย 3,5-dinitrosalicylic acid 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 30 กรัม จากนั้นจึงปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
2. กลูโคส (food grade, Complex Chemical & Equipment Co., Ltd.)

วิธีการ

1. การสร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคส

- 1.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

1.2 เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ จากสารละลายน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางผนวกที่ ค1

ตารางผนวกที่ ค1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ความเข้มข้นของสารละลาย กลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสความ เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
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

1.3 ดูดสารละลายกลูโคส 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 2 หลอด

1.4 เติมสารละลาย DNS reagent หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสม จากนั้นหุ้มปากหลอดทดลองด้วยกระดาษอะลูมิเนียม

1.5 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีแน่นอน

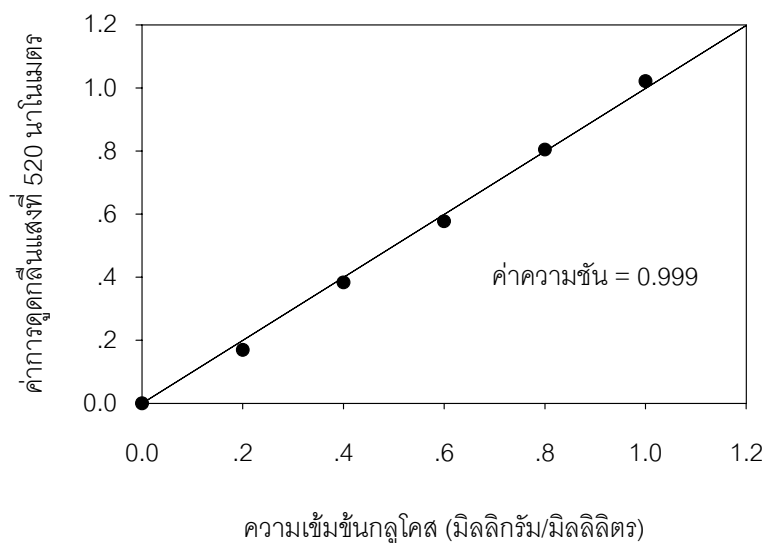
1.6 นำไปแช่ในน้ำเย็น 5 นาทีแน่นอน

1.7 เติมน้ำกลั่นปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมในเครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

1.8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

1.9 เขียนกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส พร้อมหาค่าความชันของกราฟเส้นตรงดังภาพผนวกที่ ค2

1.10 กรณีของ Blank ดำเนินขั้นตอนเช่นเดียวกับตัวอย่าง โดยใช้ น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ค2 กราฟมาตรฐานกลูโคส

2. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสของตัวอย่าง

- 2.1 นำตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม
- 2.2 ดูดตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตัวอย่างละ

2 หลอด

- 2.3 ดำเนินการตามหัวข้อ 1.4-1.8
- 2.4 กรณีของ Blank ดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่าง โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

3. การคำนวณปริมาณกลูโคส

$$\text{ปริมาณกลูโคส (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร} \times \text{อัตราค่าการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน}}$$

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก (Barker and Summerson, 1941)

เมื่อกรดแลกติกทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้นและได้รับความร้อน กรดแลกติกจะเปลี่ยนเป็นแอซีตัลดีไฮด์ ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสารพาราไฮดรอกซีไดฟีนิลได้สารประกอบสีม่วง สามารถวัดความเข้มของสารประกอบสีม่วงได้ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

สารเคมี

1. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulphate, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Merck) 20 เปอร์เซ็นต์
2. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulphate, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Merck) 4 เปอร์เซ็นต์
3. สารละลายพาราไฮดรอกซีไดฟีนิล (p-hydroxydiphenyl; Sigma) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH; Merck) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์
4. แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide, $\text{Ca}(\text{OH})_2$; Ajax)
5. สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (sulfuric acid 98%, H_2SO_4 ; BDH Laboratory Supplied)
6. ลิเทียมแลกเตต (lithium lactate, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Li}$; Merck)

วิธีการ

1. การสร้างกราฟมาตรฐานของแลกเตต

- 1.1 เตรียมสารละลายลิเทียมแลกเตตที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- 1.2 เตรียมสารละลายลิเทียมแลกเตตความเข้มข้นต่าง ๆ จากสารละลายลิเทียมแลกเตต 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางผนวกที่ ค2
- 1.3 ดูดสารละลายลิเทียมแลกเตต 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 2 หลอด
- 1.4 เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 20 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ลงไป ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่น จากนั้นเติมผงแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไปเขย่าแรง ๆ โดยใช้เครื่องมือ ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว

1.5 นำไปเหวี่ยงที่ 4000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายด้านบนมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 4 เปอร์เซ็นต์ อยู่ 0.05 มิลลิลิตร

1.6 นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำเย็น ค่อย ๆ เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตร ลงไปช้า ๆ ผสมให้เข้ากันทันที

1.7 นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วย้ายมาที่อ่างน้ำเย็นทันที (อุณหภูมิน้อยกว่า 20 องศาเซลเซียส)

1.8 หยดสารละลายพาราไฮดรอกซีไดฟีนิล 2 หยด ผสมด้วยเครื่องผสม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 90 วินาที แล้วทำให้เย็นทันที

1.9 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

1.10 เขียนกราฟมาตรฐานของสารละลายลิเทียมแลกเทต ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารละลายลิเทียมแลกเทต พร้อมหาค่าความชันของกราฟเส้นตรงดังกล่าว ณ จุดที่ ค3

1.11 กรณีของ Blank ดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่าง โดยใช้ น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

ตารางผนวกที่ ค2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานลิเทียมแลกเทต

ความเข้มข้นของสารละลาย ลิเทียมแลกเทต (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	สารละลายลิเทียมแลกเทต 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
0	0	1000
20	20	980
40	40	960
60	60	940
80	80	920
100	100	900
120	120	880

2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกของตัวอย่าง

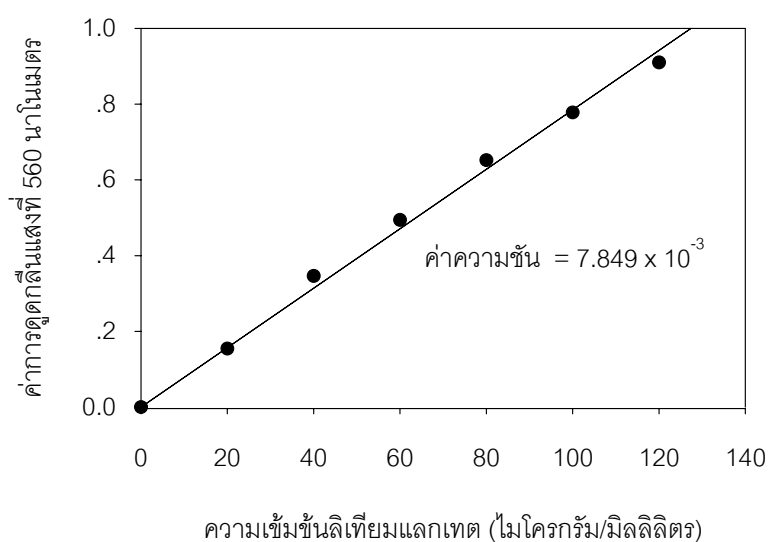
2.1 นำตัวอย่างส่วนในของน้ำหมักมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม

2.2 ดูดตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองตัวอย่างละ 2

หลอด

2.3 ดำเนินการตามหัวข้อ 1.4-1.9

2.4 Blank ดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่าง โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ค3 กราฟมาตรฐานลิเทียมแลกเตต

3. การคำนวณปริมาณกรดแลกติก

$$\text{ปริมาณกรดแลกติก (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร} \times \text{อัตราการเจือจาง} \times 90.08}{\text{ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน} \times 1,000 \times 96.01}$$

การหาน้ำหนักเปียกของเม็ดเจลหรือแคปซูล

การหาน้ำหนักเปียกของเม็ดเจลหรือแคปซูลทั้งหมด

1. นำปิกเกอร์เปล่าอบแห้ง ปริมาตร 600 มิลลิลิตร มาชั่งน้ำหนัก
2. นำเซลล์ตริงทั้งหมดที่ฝังบนตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว นาน 10 นาที บรรจุในปิกเกอร์เปล่าที่ทราบน้ำหนักแล้วในข้อ 1 นำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาน้ำหนักเปียกทั้งหมดของเม็ดเจลหรือแคปซูล ดังนี้

น้ำหนักเปียกของเม็ดเจลหรือแคปซูลทั้งหมด (กรัม) =

น้ำหนักปิกเกอร์และเม็ดเจลหรือแคปซูลทั้งหมด - น้ำหนักปิกเกอร์เปล่า

การหาน้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเม็ดเจลหรือแคปซูล

1. นำ petri dish เปล่าอบแห้ง มาชั่งน้ำหนัก
2. นำเซลล์ตริงทั้งหมดที่ฝังบนตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว นาน 10 นาที จำนวน 30 เม็ดใส่ลงใน petri dish ที่ทราบน้ำหนักแล้วในข้อ 1 นำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาน้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเม็ดเจลหรือแคปซูล ดังนี้

น้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเม็ดเจลหรือแคปซูล (กรัม/เม็ดเจลหรือแคปซูล) =

น้ำหนัก petri dish และเม็ดเจลหรือแคปซูล 30 เม็ด - น้ำหนัก petri dish เปล่า

จำนวนเม็ดเจลหรือแคปซูล 30 เม็ดหรือแคปซูล

การหาจำนวนเม็ดเจลหรือแคปซูลทั้งหมด

คำนวณจำนวนเม็ดเจลหรือแคปซูลทั้งหมดจากน้ำหนักเปียกทั้งหมดของเม็ดเจลหรือแคปซูล และน้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเม็ดเจลหรือแคปซูล ดังนี้

จำนวนเม็ดเจลหรือแคปซูลทั้งหมด (เม็ด) =

$$\frac{\text{น้ำหนักเปียกของเม็ดเจลหรือแคปซูลทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเม็ดเจลหรือแคปซูล (กรัม/เม็ดเจลหรือแคปซูล)}}$$

การหาปริมาตรของเม็ดเจลหรือแคปซูล

การหาปริมาตรของเม็ดเจลหรือแคปซูลทั้งหมด

1. เตรียมกระบอกตวง ปริมาตร 1 ลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. นำเม็ดเจลหรือแคปซูลเซลล์ตรึงทั้งหมด หลังจากที่ผ่านมาการชั่งน้ำหนักแล้วใส่ลงในกระบอกตวงที่เตรียมไว้ในข้อ 1 คำนวณปริมาตรของเม็ดเจลหรือแคปซูลทั้งหมด ดังนี้

ปริมาตรของเม็ดเจลหรือแคปซูลทั้งหมด (มิลลิลิตร) =

ปริมาตรน้ำกลั่นฆ่าเชื้อและเม็ดเจลหรือแคปซูลทั้งหมด-ปริมาตรน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การหาปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเจลหรือแคปซูล

1. เตรียมกระบอกตวง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
2. นำเม็ดเจลหรือแคปซูลเซลล์ตรึงจำนวน 30 เม็ด หลังจากที่ผ่านมาการชั่งน้ำหนักแล้วใส่ลงในกระบอกตวงที่เตรียมไว้ในข้อ 1 สามารถคำนวณปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเจลหรือแคปซูล ดังนี้

ปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเจลหรือแคปซูล (มิลลิลิตร/เม็ดเจลหรือแคปซูล) =

$$\frac{\text{ปริมาตรน้ำกลั่นฆ่าเชื้อและเม็ดเจลหรือแคปซูล 30 เม็ด-ปริมาตรน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร}}{\text{จำนวนเม็ดเจลหรือแคปซูล 30 เม็ดหรือแคปซูล}}$$

การหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเม็ดเจลหรือแคปซูลของเซลล์ตรึง

1. นำเม็ดเจลหรือแคปซูลของเซลล์ตรึงจำนวน 30 เม็ด ที่ทราบปริมาตรแทนที่น้ำ (หรือปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเจลหรือแคปซูล) ละลายในไตรโซเดียมซิเทรต 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ได้เป็นสารแขวนลอยเซลล์ที่มีปริมาตรเท่ากับ 5 มิลลิลิตร รวมกับปริมาตรแทนที่น้ำของเม็ดเจลหรือแคปซูลจำนวน 30 เม็ด (หรือคำนวณได้จากค่าปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเจลหรือแคปซูล)
2. นำสารแขวนลอยเซลล์มาทำการเจือจาง ดังนี้ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} และ 10^{-7}
3. เลือกค่าการเจือจางที่เหมาะสมคือ 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำการ pour plate ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่ระดับการเจือจางละ 2 plates บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น คำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนโคโลนี} \times \text{อัตราการเจือจาง} \times 10 \times \text{ปริมาตรสารแขวนลอยเซลล์}}{\text{ปริมาตรแทนที่น้ำของเม็ดเจลหรือแคปซูล 30 เม็ด}^1}$$

(cfu/ml bead or capsule volume)

หมายเหตุ ¹ ปริมาตรของเม็ดเจลหรือแคปซูล หาค่าได้จากการแทนที่น้ำ หรือได้จากการคำนวณจากผลคูณของค่าปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเจลหรือแคปซูล และจำนวนเม็ดเจลหรือแคปซูลจำนวน 30 เม็ดเจลหรือแคปซูล

ภาคผนวก ง
การประมาณค่าพารามิเตอร์และเขียนแบบกระบวนการ
โดยใช้โปรแกรม MATLAB™

โปรแกรม MATLAB™ (มนัส และ วรรัตน์, 2543)

โปรแกรม MATLAB™ ย่อมาจาก Matrix Laboratory เริ่มต้นพัฒนามาจากภาษาฟอร์แทรนโดย Clave Moler และถูกพัฒนาจากโปรแกรมเมทริกซ์ของ LINPACK และ EISPACK ต่อมาจึงได้ถูกเขียนขึ้นใหม่โดยใช้ภาษาซีโดย Steve Bangert, Steve Kleimar, John Little และ Clave Moler จากบริษัท MathWorks โปรแกรม MATLAB™ เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับคำนวณเชิงตัวเลข กราฟฟิคที่ซับซ้อน การจำลองแบบ และการแสดงผลข้อมูล เพื่อให้มองเห็นภาพพจน์ได้ง่ายและชัดเจนขึ้น โดยในโปรแกรม MATLAB™ จะประกอบด้วยกล่องเครื่องมือ (Toolbox) ในแต่ละสาขา ซึ่งในกล่องเครื่องมือของแต่ละสาขาก็จะประกอบไปด้วยฟังก์ชันต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแก้ปัญหาในสาขานั้น ๆ เพื่อประยุกต์ในการใช้งานจำนวนมาก ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้กล่องเครื่องมือที่เรียกว่า Genetic Algorithm Optimization Toolbox (GAOT)

การใช้งานโปรแกรม MATLAB™ เบื้องต้น

เมื่อเข้าสู่โปรแกรม MATLAB™ จะพบหน้าต่างคำสั่ง ที่มีเครื่องหมาย >> (MATLAB prompt) เป็นตัวเริ่มต้นบรรทัดพร้อมที่จะรอรับคำสั่งต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดคำสั่งแล้วกดปุ่ม [Enter] โปรแกรม MATLAB™ จะมีการประมวลผลตามคำสั่งทันที และจะรับคำสั่งทีละบรรทัด 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 “%”

การแก้สมการเชิงอนุพันธ์โดยใช้โปรแกรม MATLAB™

ปัญหาทางคณิตศาสตร์ วิทยาศาสตร์ และวิศวกรรมส่วนใหญ่ มักอยู่ในรูปของสมการเชิงอนุพันธ์ โดยเกี่ยวข้องกับอัตราการเปลี่ยนแปลงของสิ่งต่าง ๆ เมื่อเวลาเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสามารถแก้ปัญหาลำนี้โดยการแก้สมการเชิงอนุพันธ์ด้วยวิธีต่าง 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 F เมื่อ tspan คือค่าเริ่มต้นและค่าสุดท้ายของตัวแปรอิสระ t และค่าเริ่มต้น y (to) เท่ากับ yo โดย ODE 23 มีโครงสร้างดังนี้ [t,y] = ode 23 (F, tspan, yo)

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

Genetic Algorithm Optimization Toolbox (GAOT)

Genetic Algorithm (GA) เป็นเทคนิคทางคอมพิวเตอร์ที่อาศัยเรื่องของการผลิต (reproduction) และการคัดเลือก (selection) เป็นพื้นฐาน โดยกำหนดให้องค์ประกอบของการผลิตทั้งหมด (phenotype) ประกอบด้วยองค์ประกอบย่อยต่าง ๆ หรือพารามิเตอร์ต่าง ๆ (factor) และกำหนดปัญหา หรือโจทย์เป็นแบบในการผลิต (chromosome) โดยในแต่ละแบบการผลิตประกอบด้วยยีน (gene) หลาย ๆ ยีน โดยแต่ละยีนคือค่าที่เลือกจากแต่ละพารามิเตอร์มาเพียงหนึ่งค่า

การใช้ Genetic Algorithm จะต้องกำหนดจำนวนรอบของการทำงาน (generation) และจำนวนจุดที่เลือก (population) ไว้ก่อน เมื่อสั่งให้คอมพิวเตอร์ทำงาน ในรอบแรก (first

generation) คอมพิวเตอร์จะทำการสุ่มค่าที่เลือกจากพารามิเตอร์ทุกตัวมา พารามิเตอร์ละหนึ่งค่า มาประกอบกันเป็นหนึ่งแบบการผลิต (chromosome) แล้วทำการสุ่มใหม่จนได้ตามจำนวนจุด (population) ที่ตั้งไว้ ทำการผลิตตามแต่ละแบบการผลิตที่ได้ แล้วให้ผลรวมของผลผลิตที่ได้เป็น หนึ่งร้อยเปอร์เซ็นต์ โดยนำผลผลิตที่ได้แต่ละอันมาคิดเป็นพื้นที่ จากนั้นในรอบต่อไป (second generation) คอมพิวเตอร์จะอาศัยการคัดเลือกโดยการเลือกแบบการผลิตในรอบที่แล้วมาเท่ากับ จำนวนจุดที่เลือกไว้ (population) แล้วทำการ cross over หรือ mutation ให้ได้แบบการผลิตใหม่ เท่ากับจำนวนจุดที่เลือกไว้ ผลิตตามแบบการผลิตใหม่ที่ได้ แล้วให้ผลรวมของผลผลิตที่ได้เป็น หนึ่งร้อยเปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำผลผลิตที่ได้แต่ละอันมาคิดเป็นพื้นที่ แล้วทำในรอบต่อไป สำหรับรอบ สุดท้ายทำเหมือนรอบที่ผ่านมาจนถึงแบบการผลิตใหม่แล้ว คอมพิวเตอร์จะเปรียบเทียบผลผลิตใน รอบสุดท้าย โดยจะเลือกค่าที่มีผลผลิตดีที่สุด รายงานผลเป็นค่าที่มีความเหมาะสมที่สุด (Man *et al.*, 1999, อ้างโดย มีชัย, 2545)

ประโยชน์ของ Genetic algorithm

1. ใช้ในการหาค่าที่เหมาะสม (optimisation) เพื่อปรับปรุงกระบวนการ โดยการเลือก พารามิเตอร์ เพื่อนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ (unconstrains) หรืออาจมีการ กำหนดพารามิเตอร์บางตัวให้มีค่าตามที่ต้องการไว้ก่อนที่จะหาสภาวะที่เหมาะสม (constrains)
2. ใช้ในการทดสอบและหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสม ที่ทำให้ค่าที่ได้จากแบบจำลองและ ค่าที่ได้จากการทดลอง (fitting) มีค่าต่างกั นน้อยที่สุด

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้โปรแกรม MATLAB™ version 6.0 ประกอบด้วย 4 สคริปต์ไฟล์ดังนี้ ไฟล์ “BatModel.m”, ไฟล์ “BatSim.m”, ไฟล์ “ExpFitEval.m” และ ไฟล์ “GABatferm.m” แสดงดัง ภาพผนวกที่ ง1, ง2, ง3 และ ง4 ตามลำดับ

```

function ydat = BatModel(t,y,para)
% assign variable
    s1 = y(1);
    p1 = y(2);
    s2 = y(3);
    p2 = y(4);
    s3 = y(5);
    p3 = y(6);
% assign parameters
    qpm = para(1);
    Ks = para(2);
    Xm = para(3);
    Yps = para(4);
    ms = para(5);
% kinetic equations
    qp1 = (qpm*s1)/(Ks+s1);
    rp1 = (qp1*0.132)*(1-(0.132/Xm));
    rs1 = -(((1/Yps)*rp1)+(ms*0.132));
    qp2 = (qpm*s2)/(Ks+s2);
    rp2 = (qp2*0.66)*(1-(0.66/Xm));
    rs2 = -(((1/Yps)*rp2)+(ms*0.66));
    qp3 = (qpm*s3)/(Ks+s3);
    rp3 = (qp3*1.32)*(1-(1.32/Xm));
    rs3 = -(((1/Yps)*rp3)+(ms*1.32));

```

```
% balance equations  
ydat(1)= rs1;  
ydat(2)= rp1;  
ydat(3)= rs2;  
ydat(4)= rp2;  
ydat(5)= rs3;  
ydat(6)= rp3;  
ydat=[ydat(1);ydat(2);ydat(3);ydat(4);ydat(5);ydat(6)] ;
```

ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

```

function [t,y,data] = BatSim(para)

% load experimental data
    data = load('data1.txt');

% assign data to variables ;
    time = data(:,1) ;
    Glu1 = data(:,2) ;
    Lac1 = data(:,3) ;
    Glu2 = data(:,4) ;
    Lac2 = data(:,5) ;
    Glu3 = data(:,6) ;
    Lac3 = data(:,7) ;

% initial condition
    S01 = Glu1(1) ;
    P01 = Lac1(1) ;
    S02 = Glu2(1) ;
    P02 = Lac2(1) ;
    S03 = Glu3(1) ;
    P03 = Lac3(1) ;

tspan = [0 max(time)];
y0 = [S01 P01 S02 P02 S03 P03];
[t,y] = ode45 (@BatModel,tspan,y0,[],para);

```

ภาพผนวกที่ ๒ ไฟล์ “BatSim.m”


```

function [para,val] = ExpFitEval(para,options)
[t, y,data] = batsim(para);
ysim = interp1 (t, y,data(:,1));
ysim = ysim (:,1:6); % simulated data of S, P
ydata = data (:,2:7); % experimental data of S, P
% -----
% number of data point
    numPoint = size (data,1);
% -----
% maximum value of each variable
    maxval = max (ydata,[],1);
% weighing coefficient
    w = 1./(maxval.^2);
% calculate sum of weighed square error
    val = -sum (w.*sum((ydata - ysim).^2));

```

ภาพผนวกที่ 3 ไฟล์ “ExpFitEval.m”

```

% Parameter estimation using Genetic Algorithm for Optimization Toolbox (GAOT)

clc

clear all

fprintf('***** Optimization Started ***** \n');

% lower and upper bound of parameters

qpm = [0.01 12];
Ks = [0.01 20];
Xm = [0.01 20];
Yps = [0.95 1];
ms = [0.01 0.06];

ParaBound = [qpm; Ks; Xm; Yps; ms] ;

maxGen =500; % maximum generation

x = ga(ParaBound,'ExpFitEval',[],[],[1e-6 1 1],'maxGenTerm',maxGen);

para = x(1:length(x)-1);

sse = abs(x(length(x)));

% -----

% Create summary report

fid = fopen('report.txt','w');

fprintf(fid,'***** SUMMARY REPORT *****\n');

fprintf(fid,'%s\n',datestr(now,0));

fprintf(fid,'Optimization terminated successfully with %d generations \n',maxGen);

fprintf(fid,'The best found : Parameter(s) and SSE \n');

for i = 1:length(para)

    fprintf(fid,'parameter(%d) = %f \n',i,para(i));

end

```

```

fprintf(fid,'Sum of weighed square error = %f',sse);
fclose(fid);
type('report.txt')
% -----
% plot graph
[t,y,data] = batsim(para);
plot (data(:,1),data(:,2),'o',data(:,1),data(:,3),'^',data(:,1),data(:,4),'<',data(:,1),
      data(:,5),'>',data(:,1),data(:,6),'+',data(:,1),data(:,7),'*');
hold on
plot (t,y);
hold off
title('Comparison between model prediction and experimental observation');
legend('Glucose','Lactic acid');
xlabel('Fermentation time (hr)');
ylabel('Concentration (g.l-1)');
axis([0 14 0 12]);

```

ภาพผนวกที่ 4 (ต่อ)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

- ชื่อ-นามสกุล : นางสาวติยะภรณ์ เหลืองพัฒน์
- วัน เดือน ปีเกิด : 29 กรกฎาคม 2523
- สถานที่เกิด : อำเภอศรีสำโรง จังหวัดสุโขทัย
- ประวัติการศึกษา : วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ทุนการศึกษาที่ได้รับ : ได้รับทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ประจำปีงบประมาณ 2547)
- ประสบการณ์ : วิจัย ณ มหาวิทยาลัย National Pingtung University of Science and Technology ประเทศไต้หวัน ระหว่างวันที่ 5 มีนาคม 2548 ถึงวันที่ 22 พฤษภาคม 2548 เป็นเวลา 2 เดือนครึ่ง ภายใต้โครงการ Academic Exchange Agreement between National Pingtung University of Science and Technology and Kasetsart University