สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานผลงานวิจัยประจำปีงบประมาณ พ ศ. 2550

เรื่อง

การผลิตกรดอินทรีย์เพื่อยับยั้งเชื้อราจาก Whey Permeate โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

(Antifungal Organic Acid Production from Whey Permeate by Batch Fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965)

โดย

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

RCH
OD
305
.A2
ส7A31
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83853
วัน,เดือน,ปี.....19 ก.ย. 2551

b.....11983451
.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตกรดอินทรีย์เพื่อยับยั้งเชื้อราจาก Whey Permeate โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

(Antifungal Organic Acid Production from Whey Permeate by Batch Fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965)

บทคัดย่อ

การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วยสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุ ได้แก่ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวย์เป็นตัวทำละลาย ทำการหมักด้วยถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชที่ 6.5 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณ 15.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 200 ได้ค่าผลผลิตกรดโพรพิโอนิก และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.39 กรัมต่อกรัม และ 0.077 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้มาทดสอบการยับยั้งเชื้อราเปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายด้วยวิธีทางเคมีพบว่า กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยวิธีทางชีวภาพมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้เช่นเดียวกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี

คำสำคัญ : เวย์, กรดโพรพิโอนิก

Abstract

Production of propionic acid from whey by batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 was studied. It was found that, the best formula of fermentation medium for propionic acid production consisted of whey was supplemented with 1% yeast extract , 1% $CaCO_3$ and mineral which contained 0.25 g/l K_2HPO_4 , 0.05 g/l $MnSO_4$. 4 H_2O and 0.2 g/l $MgSO_4$. $7H_2O$. Batch fermentations were conducted in 2 liters fermentors at 30°C, pH 6.5 and 100 rpm agitation which gave maximum level of propionic acid (15.5 g/l at 200 hours.) The propionic acid yield and productivity were 0.39 g/g and 0.077 g/l.h, respectively. Biological propionic acid was tested for antifungal effect and was compared with chemical propionic acid. The result was that, biological propionic acid was able to inhibit fungi as well as chemical propionic acid.

Key Words : whey, propionic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. บทนำ

ผลิตภัณฑ์อาหารเช่นอาหารสัตว์ ผลิตภัณฑ์เบเกอรีส่วนใหญ่จะเกิดการเน่าเสียเนื่องจากเชื้อราเป็นจำนวนมาก ในทุกๆปี การใช้สารเคมีในการยับยั้งเชื้อราเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย แต่ในปัจจุบันมีข้อเรียกร้องจากผู้บริโภคในการใช้สารช่วยในการเก็บรักษาอาหารจากธรรมชาติมากขึ้นจึงเป็นเหตุให้เกิดความสนใจในการใช้แบคทีเรียจากธรรมชาติมายับยั้งเชื้อราและยีสต์ ซึ่งล่าสุดมีรายงานว่าเชื้อ *Propionibacterium* สามารถป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อราและยีสต์ได้ โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะสร้างกรดโพรพิโอนิกซึ่งมีผลในการยับยั้งเชื้อราได้เป็นพิเศษ [8]

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตเพื่อการค้านิยมผลิตโดยกระบวนการทางเคมีเนื่องจากได้ผลผลิตสูงตามความต้องการและมีระยะเวลาในการผลิตเร็วกว่ากระบวนการทางชีวภาพแต่กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยกระบวนการทางเคมีมีกระบวนการยุ่งยากเพราะมีสารก่อให้เกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อมในช่วงการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการผลิตทางชีวภาพเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีความเป็นพิษและสามารถใช้กับอุตสาหกรรมประเภทอาหารได้ ค่าใช้จ่ายในการผลิตไม่สูงนัก การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยกระบวนการทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium* [5]

เวย์เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็ง ในปัจจุบันเวย์มีการนำเวย์ไปผลิตเป็นเวย์ผง เวย์เข้มข้น และเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ [15] การทดลองนี้เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการใช้เวย์ให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าในเชิงพาณิชย์

2. วิธีดำเนินการ

2.1 วัตถุดิบ

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

2.1.1 การเก็บวัตถุดิบ

เวย์ที่ใช้ในงานวิจัยจะเก็บที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส โดยนำมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งานต่อไป

2.1.2 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ ประยุกต์จาก Kessler [9]

นำเวย์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาทีเพื่อให้โปรตีนตกตะกอน ผ่านเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเพื่อแยกโปรตีนที่ตกตะกอนออก นำส่วนใสกรองด้วยกระดาษกรอง Glass fiber(GC-50) 2 ครั้ง จะได้เวย์ที่พร้อมใช้ในการทดลอง

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ประมาณ 2 ลูป ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ โดยนำฟลาสก์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 13 สูตร

การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยมีสูตรอาหารทั้งหมด 13 สูตรดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* 13 สูตร

สูตรอาหาร	เวย์	ยีสต์สกัด	ทริปทิเคสซอยบรอท	น้ำตาลแลคโตส	แร่ธาตุ
M 1	-	+	+	+	+
M 2	+	+	-	+	+
M 3	+	-	+	+	+
M 4	+	+	+	-	+
M 5	+	+	+	+	-
M 6	+	-	-	+	+
M 7	+	-	-	-	+
M 8	+	-	-	+	-
M 9	+	-	-	-	-
M 10	+	+	-	-	+
M 11	+	-	+	-	+
M 12	+	+	-	-	-
M 13	+	-	+	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง เติม - หมายถึง ไม่เติม

ปริมาณสารอาหารที่ใช้ในอาหารทั้ง 13 สูตร ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ทริปทิเคสซอยบรอท 5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลแลคโตส 40 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุ ได้แก่ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร โดยอาหารสูตรที่ 1 ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย(ชุดควบคุม) อาหารสูตรที่ 2 - 13 ใช้เวย์เป็นตัวทำละลาย ทำการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยเติมหัวเชื้อร้อยละ5 จากข้อ 2.2.1 ในอาหารสูตรต่างๆ 13 สูตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารฟลาสก์ละ 175 มิลลิลิตร เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Inertsil C8-3 มีโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร [7],[8] วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีของ Dobois [6] และวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test

2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

2.4.1 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยเลือกสูตรอาหารที่ทำให้เชื้อผลิตกรดได้ดีที่สุดจากข้อ 2.3 โดยผันแปรชนิดแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นยีสต์สกัด เปปโตน โมโนโซเดียมกลูตาเมต ยูเรีย แอมโมเนียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซัลเฟต และ แอมโมเนียมไนเตรต แทนแหล่งไนโตรเจนเดิม การเตรียมอาหารทำโดยการเตรียมอาหารแต่ละสูตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 350 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้6.5 (± 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อจากข้อ 2.2.1 ร้อยละ5 ลงในอาหารแต่ละสูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีการในข้อ 2.3

2.4.2 ศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน โดยเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุดจากข้อ 2.4.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเป็นปริมาณร้อยละ 0.5, 1, 1.5 และ 2 แทนปริมาณความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเดิม การเตรียมอาหารทำโดยการเตรียมอาหารแต่ละสูตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 350 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้6.5 (± 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อจากข้อ 2.2.1 ร้อยละ5 ลงในอาหารแต่ละสูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีการในข้อ 2.3

2.4.3 การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม โดยเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุดจากข้อ 2.4.2 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเพิ่มจากสูตรอาหารปกติ โดยผันแปรความเข้มข้นของ แคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณร้อยละ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 การเตรียมอาหารทำโดยการเตรียมอาหารแต่ละสูตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 350 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อจากข้อ 2.2.1 ร้อยละ 5 ลงในอาหารแต่ละสูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีการในข้อ 2.3

2.5 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในระดับฟลาสก์ และในถังหมักขนาด 2 ลิตร

2.5.1 การผลิตกรดโพรพิโอนิกระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมจากที่ได้ศึกษาในข้อ 2.4 โดยใช้ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1.4 ลิตร (ร้อยละ 70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5(± 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อจากข้อ 2.2.1 ร้อยละ 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีการในข้อ 2.3

2.5.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร

การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมจากที่ได้ศึกษาในข้อ 2.4 มาทำการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้การหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.4 ลิตร (ร้อยละ70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อจากข้อ 2.2.1 ร้อยละ 5 ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชที่ 6.5 ไม่ต้องพ่นอากาศ [11], [10] เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีการในข้อ 2.3

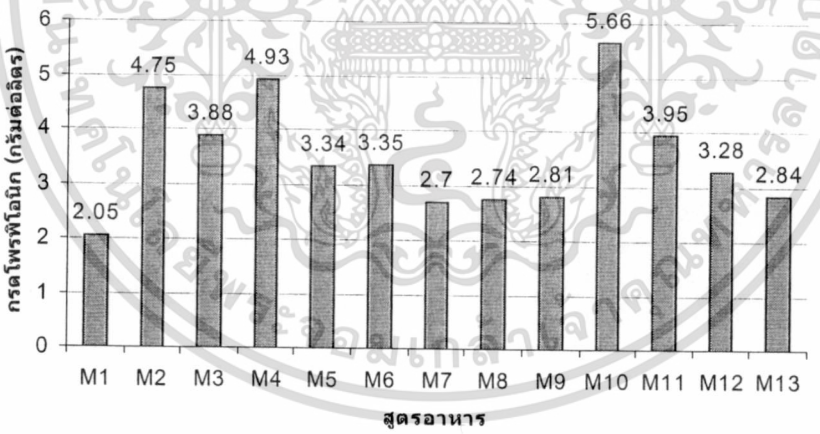
2.6 การศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยวิธี agar diffusion method [1]

ทดสอบประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยวิธี Agar diffusion method ทดสอบกับเชื้อรา 5 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Rhizopus nigrican, Rhizopus oligosporus, Penicillum sp.* โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ใช้วิธี spread plate โดยทำสารละลายสปอร์ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายสปอร์ 0.1 มิลลิลิตร ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้เชื้อกระจายไปทั่วอาหาร นำแผ่นเซลลูโลสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มสารละลายกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ (ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร) กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้า (ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร) และน้ำกลั่น วางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการ spread เชื้อราเรียบร้อยแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อรา (บริเวณโซนใส)

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ

พบว่าอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุดคืออาหารสูตรที่ 4 และ 10 ซึ่งสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 4.93 และ 5.66 กรัมต่อลิตรตามลำดับแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ในอาหารสูตรต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบอาหารสูตรที่ใช้ในการทดลองพบว่าเวย์ที่ใช้ในการทดลองมีแหล่งคาร์บอนปริมาณที่มากเพียงพอ จึงไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนอื่นๆอีก เพราะองค์ประกอบของเวย์จะมีน้ำตาลแลคโตสเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 4 และมีไนโตรเจนที่ละลายได้เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่ปริมาณไนโตรเจนในเวย์มีปริมาณไม่เพียงพอ ซึ่งเห็นได้จากอาหารสูตรที่ 6, 7, 8 และ 9 ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้มีปริมาณที่น้อย ดังนั้นต้องทำการเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมโดยจะเห็นได้ว่า อาหารสูตรที่ 10 มีการเติมยีสต์สกัด และสูตรที่ 4 มีการเติมยีสต์สกัดและทริปทิเคสซอยบรอทเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม โดยอาหารสูตรที่ 10 ใช้ปริมาณสารอาหารน้อยกว่าสูตรที่ 4 แต่ปริมาณกรดที่ผลิตได้มากกว่ากันเล็กน้อย แสดงว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนหลายชนิดไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพรพิโอนิก [4] ถ้ามีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่มากเพียงพอ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกอาหารสูตรที่ 10 ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยเวย์ ยีสต์สกัดและแหล่งแร่ธาตุ เป็นแนวทางในการปรับปรุงเวย์เพื่อให้เป็นซับสเตรตในการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่อไป

3.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

3.2.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการทดลองพบว่าเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด รองลงมาคือยีสต์สกัดโดยสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 6.46 และ 5.63 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเปปโตน และยีสต์สกัดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 2 แต่ราคาของเปปโตนจะมีราคาแพงมากกว่ายีสต์สกัด รวมทั้งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่จะใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยยีสต์สกัดเป็นสารที่ผลิตจากเซลล์ยีสต์ซึ่งเป็นสารอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง ประกอบด้วยโปรตีนและองค์ประกอบอื่นๆเช่น ไทอามีน นิโคตินิก แพนโตธีนิก และไบโอติน ซึ่งเป็นสาเหตุให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์สกัดเป็นส่วนประกอบเป็นอาหารที่อุดมสมบูรณ์สูงเหมาะสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก [7], [8], [5] ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการปรับปรุงเวย์เพื่อให้เป็นซับสเตรตในการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้และปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ ในชั่วโมงที่ 210 เพื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

แหล่งไนโตรเจน	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ (ร้อยละ)
ยีสต์สกัด	5.63[b]	47.50
เปปโตน	6.46[a]	52.50
โมโนโซเดียมกลูตาเมต	2.24[c]	27.10
ยูเรีย	2.17[c]	24.60
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.87[d]	22.50
แอมโมเนียมไนเตรต	1.78[d]	20.30

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.2.2 ผลการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของยีสต์สกัดร้อยละ 2 จะผลิตกรดโพรพิโอนิกได้มากที่สุด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 ความเข้มข้นของยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 จะผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ต่ำที่สุดแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดเพิ่มมากขึ้นจากร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 1.5 และร้อยละ 2 แต่ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัดร้อยละ 1.5 และ 2 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพราะเนื่องมาจากยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดมากขึ้นจึงไม่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกเมื่อคิดในเชิงเศรษฐศาสตร์จึงไม่มีความจำเป็นในการใช้ความเข้มข้นในปริมาณที่สูงเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ร้อยละ 1 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Yang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ Huang [12] โดยทำการศึกษาการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* พบว่าเมื่อเพิ่มยีสต์ 1 ลงในอาหารจะได้อัตราการผลิต 0.68 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ซึ่งมากกว่าอาหารที่ไม่เติมยีสต์สกัด

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ ที่ชั่วโมง 210 เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เหมาะสม

ปริมาณยีสต์สกัด	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ (ร้อยละ)
ร้อยละ 0.5	3.92[c]	18.27
ร้อยละ 1	5.69[b]	47.50
ร้อยละ 1.5	5.93[a]	50.00
ร้อยละ 2	5.95[a]	50.00

3.2.3 ผลการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

จากการทดลองพบว่าแคลเซียมคาร์บอเนตมีความสำคัญต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่มีการเติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน ดังแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้และปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ ชั่วโมงที่ 566 เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ (ร้อยละ)
ร้อยละ 0.5	17.36[b]	70.70
ร้อยละ 1	20.58[a]	94.25
ร้อยละ 1.5	20.78[a]	96.25
ร้อยละ 2	20.69[a]	99.50
ร้อยละ 2.5	20.66[a]	97.50
ชุดควบคุม (ไม่เติม$CaCo_3$)	11.30[a]	60.00

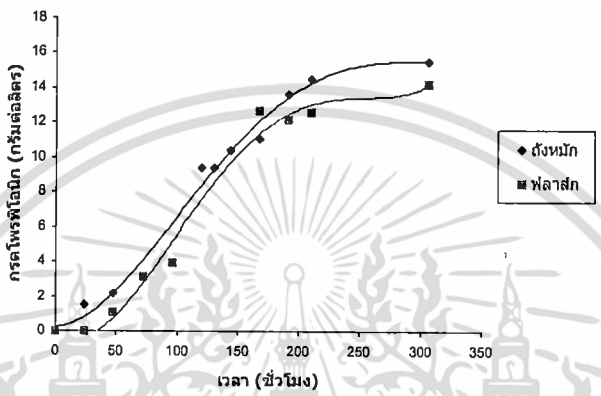
แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารที่ช่วยรักษาค่าพีเอช(บัพเฟอร์)โดยแคลเซียมคาร์บอเนตเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดโพรพิโอนิกจะได้เกลือแคลเซียมโพรพิโอเนตและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลช่วยลดปฏิกิริยาการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นยังมีผลช่วยให้เกิดสภาวะไม่มีอากาศให้สมบรูณ์มากขึ้น [2]

จากการทดลอง พบว่าถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตจากความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 1.5 และ 2 แต่การผลิตกรดโพรพิโอนิกไม่ได้เพิ่มขึ้น เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1, 1.5, 2 และ 2.5 ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ความสามารถในการผลิตกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้นสูงมากเมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เพราะฉะนั้นจึงไม่มีความจำเป็นในการใช้ความเข้มข้นในปริมาณที่สูงเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ร้อยละ 1 ในการปรับปรุงเวย์เพื่อให้เป็นซับสเตรตในการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83853

3.3 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับฟลาสก์ และในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2.4 ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 300 ชั่วโมง และศึกษาการผลิตกรดโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที และมีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 ตลอดการทดลองเป็นเวลา 300 ชั่วโมง พบว่าในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าการผลิตในฟลาสก์ ดังแสดงในรูปที่ 2 ค่าผลผลิต และอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก แสดงดังตารางที่ 5



รูปที่ 2 เปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและถังหมักขนาด 2 ลิตร

จากการทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยใช้ถังหมัก และฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 15.5 และ 14.2 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยเมื่อใช้ถังหมักในการผลิตปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากการใช้ถังหมักมีการกวนซึ่งช่วยให้เชื้อผสมคลุกเคล้ากับอาหารทำให้เชื้อได้รับอาหารอย่างทั่วถึงและการหมักโดยใช้ถังหมักมีความสามารถในการควบคุมพีเอชให้คงที่จึงช่วยทำให้เชื้อสามารถสร้างกรดโพรพิโอนิกได้อย่างต่อเนื่องแม้จะผ่านการหมักมาเป็นเวลานาน นอกจากนี้ในถังหมักใช้เวลาหมัก 200 ชั่วโมง ขณะที่ในฟลาสก์ใช้ระยะเวลาในการหมัก 300 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลถูกใช้ไปร้อยละ 100 แสดงว่าสภาวะในถังหมักเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากกว่า ทั้งนี้การศึกษาระดับฟลาสก์เมื่อมีการผลิตกรดเป็นเวลานานพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงจนในที่สุดเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้อีกต่อไป

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ผลผลิต อัตราการผลิต และ ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและถังหมักขนาด 2 ลิตร

	ระยะเวลาในการหมัก(ชั่วโมง)	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (Yield)	อัตราการผลิต(กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้(ร้อยละ)
ฟลาสก์	300	14.2	0.36	0.071	100
ถังหมัก	200	15.5	0.39	0.077	100

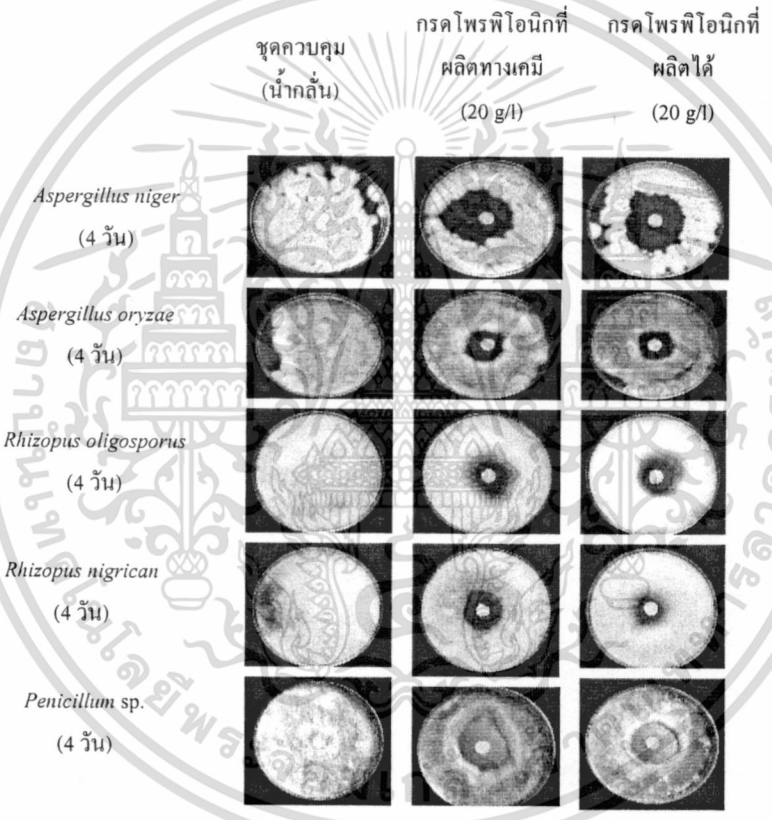
3.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยวิธี Agar diffusion method

เมื่อนำกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ทดสอบการยับยั้งเชื้อราเปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 พบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีความสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Rhizopus nigrican, Rhizopus oligosporu, Penicillum sp.* ได้บริเวณยับยั้ง 4.0, 2.8, 2.76, 3.5 และ 4 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตทางเคมีที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ได้บริเวณยับยั้ง 4.2, 3.0, 3.0, 3.7 และ 4.1 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตทางเคมีที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันพบว่าบริเวณยับยั้งมีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ากรดโพรพิโอนิกทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งมีการศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่มีต่อเชื้อราของ Lind และคณะ[12] ได้ศึกษาผลของกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici, P. freudenreichil* subsp. *Shermanii, P. freudenreichil* subsp.*freudenreichii, P. theonil* และ *P. jensenil* ในการยับยั้งเชื้อยีสต์และรา พบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากวิธีทางชีวภาพสามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* และ *Kluyveromyces marxianus* เชื้อรา *Penicillium roqueforti* และ *Aspergillus fumigatus* แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราจะดีกว่าเชื้อยีสต์ โดยดูจากบริเวณยับยั้งของเชื้อราที่มีขนาดใหญ่กว่าเชื้อยีสต์



รูปที่ 3 แสดงผลของกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ด้วยวิธีชีวภาพในการยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดด้วยวิธี agar diffusion method

4. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อ*Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 พบว่าเวย์ที่นำมาเป็นซับสเตรตมีแหล่งคาร์บอนที่อุดมสมบูรณ์ แต่แหล่งไนโตรเจนและแหล่งแร่ธาตุยังมีไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ดังนั้นในการนำเวย์มาใช้จึงจำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจนและแหล่งแร่ธาตุอื่นๆรวมทั้งแคลเซียมคาร์บอเนต โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ ใช้เวย์เป็นตัวทำละลาย เติมยีสต์สกัดปริมาณร้อยละ 1 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณร้อยละ 1 เติมแหล่งแร่ธาตุ ซึ่งประกอบด้วยไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณ 14.2 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 300 ได้ค่าผลผลิตกรดโพรพิโอนิก และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.36 กรัมต่อกรัม และ 0.071 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณ 15.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 200 ได้ค่าผลผลิตกรดโพรพิโอนิกและอัตราการผลิตเท่ากับ 0.39 กรัมต่อกรัม และ 0.077 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักจะเร็วกว่าในฟลาสก์ เมื่อนำกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ทดสอบการยับยั้งเชื้อราเปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายด้วยวิธีทางเคมี พบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยวิธีทางชีวภาพมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ช่นเดียวกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยวิธีทางเคมี

5. เอกสารอ้างอิง

[1] สมใจ ภัสสัตยางกูล. 2537. **การศึกษาวิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ และการนำไปปรับใชในการผลิตสารเมตาบอไลท์จากแบคทีเรียโพรพิโอนิก.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[2] Altaf, MD., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Vijay, E., and Reddy, G. 2006. "Single step fermentation of starth to L(+)lactic acid by *Lactobcillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract-Optimization by RSM". **Process Biochemistry.** 41 : 465 – 472.

[3] A.O.A.C. 2000. **Official Method of Analysis of A.O.A.C. International**. 17th ed. A.O.A.C. International.The United States of America.

[4] Border, P.M., Kierstan, M.P.J. and Plastow, G.S. 1987. "Production of propionic acid by mixed bacterial fermentation". **Biotechnology Letter.** 9 : 843-848

[5] Colomban, A., Roger, L. and Boyaval, P. 1993. " Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling". **Biotechnology and Bioengineering**. 42 : 1091-1098.

[6] Dobois, M., Gill, K.A., Hamilton, J.K., Rebersand, P.A. and Smith, F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". **Analitical Chemistry**. 28 : 350-356.

[7] Goswami, V. and Srivastava, A.K. **2000**. Fed-batch propionic acid production by *Propionbacterium acidipropionici*.Biochemical Enginerring Journal. 4 : 121-128.

[8] Himmi, E.H., Bories, A,. Boussaid, A. and Hassami, L. **2000**. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. Applied Microbiology and Biotechnology. 53 : 435 – 440.

[9] Hsu, S. and Yang, S. 1991. "Propionic acid fermentation of Lactose by *Propionibacterium acidipropionici* : effects of pH". **Biotechnology and Bioengineering**. 38 : 571 – 578.

[10] Jain, D.K., Tyagi, R.D., Kluepfel, D. and Agbebavi, T.J. 1991. "Production of propionic acid from whey ultrafiltration by immobilize cells of *Propionibacterium shermanii* in bacth process". **Process Biochemistry.** 26 : 217-223

[11] Kessler, H.G. 1981. **Food Engineering and Dairy Technology.** Verlag A. Kessien, Germany. 654 pp.

[12] Lind, H., Jonsson, H. and Schnurer J. 2005. "Antifungal effect of dairy propionbacteria-contribution of organic acids". **Journal of Food Microbiology.** 98 : 157 – 165.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[13] Paik, H.D. and Glatz, B.A. 1994. "Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*". **Applied Microbiology and Biotechnology** . 42 : 22 – 27.

[14] Quesada-Chanto, A., Afschar, A.S. and Wagner, F. 1994 . Optimization of a *Propionbacterium acidipropionici* continous culture utilizing sucrose. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 42 : 16 – 21.

[15] Yang, S. and Huang, Y. 1995. "A noval recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose". **Biotechnology and Bioengineering**. 45 : 379 – 386.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

83853

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้