รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

เรื่อง

การพัฒนาและการใช้ประโยชน์กรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยการตรึงเซลล์ของเชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 และ *Lactococcus lactis* TISTR 1401และการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ

โดย

รศ. สุนใจ ชูจันทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การพัฒนาและการใช้ประโยชน์กรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยการตรึงเซลล์ของเชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 และการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ

Development and Utilization of Propionic Acid Production from Whey by Coimmobilized Mixcultures of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 and *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and Cell Recycling

สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุด 17.84 กรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการหมัก 168 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ทำการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ พบว่าการใช้เซลล์ตรึงสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณสูงกว่าเล็กน้อย ซึ่งการผลิตโดยใช้เซลล์อิสระสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุด17.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 และการใช้เซลล์ตรึงสามารถนำเซลล์ที่ใช้ในการหมักแล้วกลับมาใช้เพื่อทำการหมักได้อีก 1 ครั้ง โดยในการหมักครั้งที่ 2 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 10.54 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 เมื่อนำกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพมาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา และเชื้อยีสต์เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าที่ผลิตโดยวิธีทางเคมี พบว่ากรดโพรพิโอนิกทั้ง 2 ประเภท ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์ที่นำมาทดสอบ แต่กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตทางชีวภาพมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้เช่นเดียวกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี

คำสำคัญ : เวย์ กรดโพรพิโอนิก เซลล์อิสระ เซลล์ตรึง

ABSTRACT

Propionic acid production from whey by coimmobilized mixculture of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 and *Lactococcus lactis* TISTR 1401 was studied. It was produced maximum propionic acid 17.84 g/l in 168 hours. When compaired concentration of propionic acid from free cells with immobilized cells missed using immobilized cells will produced higher than free cells. Using free cells produced maximum propionic acid 17.27 g/l in 168 hours and immobilized cells can use 1 recycle. Second fermentation gave propionic acid 10.54 g/l in 168 hours. Biological propionic acid was tested for inhibit fungal and yeasts effect compared with chemical propionic acid. The result was that, them were can not inhibit to yeasts but biological propionic acid was able to inhibit fungal activity as same as chemical propionic acid.

Key words : Whey propionic acid free cell immobilize cell

FCH
QD
305
.A2
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แขวนหมู่ 2431
เลขทะเบียน 116981
วัน,เดือน,ปี 21 ธ.ค. 2554

b. 12329897
i.

1. บทนำ

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทรา ยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นต้นเหตุให้ผลิตภัณฑ์อาหารเกิดการเน่าเสีย นิยมใช้เป็นวัตถุกันเสียทางชีวภาพ (biopreservatives) และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Schwenninger และ Meile, 2004) นอกจากนี้มีการใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นส่วนผสมในยาควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจ สารให้กลิ่นรส (Himmi และคณะ, 2000) และใช้ในอุตสาหกรรมการทำพลาสติกในรูปของ cellulose propionate (Barbirato และคณะ, 1997) ปัจจุบันการใช้กรดโพรพิโอนิกในอาหารสัตว์มีความสำคัญมาก เนื่องจากมีข้อตกลงของสหภาพฯยุโรป ให้เพิกถอนการอนุญาตใช้สารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโตแม้ว่ายังไม่มีการออกเป็นข้อบังคับ แต่ในทางปฏิบัติการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อเร่งการเจริญเติบโต (antibiotic growth promoter ; AGPs) ก็มีปริมาณลดลง ผู้เลี้ยงสัตว์ที่ต้องการจำหน่ายผลิตผลจึงต้องค้นหาสารอื่นเพื่อทดแทนสารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ โดยมีความพยายามค้นหาสารประกอบที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ หนึ่งในสารที่ให้ผลดี คือกรดอินทรีย์ ทั้งในรูปกรดโดยตรงหรือเกลือของกรด กรดโพรพิโอนิกก็เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่อยู่ในความสนใจ เนื่องจากการทำงานของกรดซึ่งมีการแตกตัวภายในเซลล์ของผนังลำไส้ ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สารsecretin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นการหลั่งน้ำย่อยออกจากตับอ่อน จึงมีประโยชน์นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยมีผลต่อการย่อยที่ดีและส่งผลในทางบวกต่อสมรรถนะการแพร่ออกจากเซลล์ (Dibner, 2004)

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตทางการค้านิยมใช้กระบวนการทางเคมี แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือต้นทุนการผลิตสูงเนื่องจากขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์มีความยุ่งยากซับซ้อน และใช้สารเริ่มต้นในการผลิตที่เป็นอันตราย ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีการศึกษาเพื่อพัฒนาปรับปรุงการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งมีผลดีคือต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีความเป็นพิษ แต่มีข้อเสียคือ ใช้เวลาในการผลิตนาน (Ozadali และคณะ, 1995) ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการต่างๆ ซึ่งการตรึงเซลล์ การใช้เชื้อผสมและการปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสม เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มผลผลิต การทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อนำเวย์ ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็งมาใช้เป็นสับสเตรต เพื่อปรับปรุงสูตรอาหารที่เหมาะสมและเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกอีกโดยการตรึงเซลล์ของเชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 และ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงกระบวนการผลิตทางชีวภาพให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 วัตถุดิบ

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

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 และ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

เชื้อจุลินทรีย์ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง (stationary flask) เป็นเวลา 4 วัน เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) จะได้หัวเชื้อเริ่มต้นที่นำไปใช้ในการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ *L. lactis* TISTR 1401 ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 2 วัน เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) จะได้หัวเชื้อเริ่มต้นที่นำไปใช้ในการวิจัย

2.2.2 วิธีการตรึงเซลล์ (ประยุกต์จากสุรีย์ ทองวณิชนิยม, 2543)

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นจากข้อ2.2.1 โดยใช้ปริมาตรของเชื้อแต่ละชนิดในปริมาณร้อยละ5 นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 นำเซลล์ที่ปั่นแยกได้ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

ดูดสารละลายเจลผ่านสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.89 มิลลิเมตร (TYGON TUBING 2-STOP) ของบริษัท Cole-Parmer Instrument ที่ประกอบเข้ากับเครื่อง peristaltic pump โดยปลายด้านหนึ่งของสายยางจุ่มอยู่ในสารละลายเจล ส่วนปลายอีกด้านอยู่เหนือสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นระยะทาง 5 เซนติเมตร ปรับอัตราการไหลของสารละลายเจลให้เท่ากับ 7 มิลลิลิตรต่อนาที กดปุ่มเริ่มการทำงานของเครื่อง peristaltic pump เมื่อสารละลายเจลถูกปล่อยลงในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ เม็ดเจลของแคลเซียมอัลจิเนตจะเกิดขึ้นทันทีในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ จากนั้นนำเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมัก

2.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย (สุรนารถ อร่ามเรือง.2550)

สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัยมีดังนี้

ยีสต์สกัด	10	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.20	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	10	กรัมต่อลิตร
ใช้เวย์เป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น	1	ลิตร

2.4 ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อผสมของ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ที่เป็นเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 การผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อผสมที่แป็นเซลล์อิสระ

ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.4 ลิตร (ร้อยละ70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อที่เป็นเซลล์อิสระและทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชที่6.5 ไม่ต้องพ่นอากาศ (Quesada-Chantao. 1994 ;Paik และ Glatz.1994) มีการกวนในอัตรา 150 รอบต่อนาที เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะคงที่ โดยวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และกรดแลคติกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมภ์ Inertsil C8-3 มีโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (himmi และคณะ,2000 และGoswami 2000) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีของ Dobois, 1956

2.4.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อผสมที่แป็นเซลล์ตรึง

ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.4 ลิตร (ร้อยละ70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อที่เป็นเซลล์ตรึงลงในถังหมัก สำหรับสภาวะที่ใช้ในการหมัก และการวิเคราะห์ผลการทดลองทำเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1

2.5 ศึกษาศักยภาพของเชื้อผสมที่ถูกตรึงโดยการนำมาใช้ซ้ำ (cell recycle)เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก

ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.4 ลิตร (ร้อยละ70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อที่เป็นเซลล์ตรึงลงในถังหมัก สภาวะที่ใช้ในการหมักทำเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1 เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะคงที่ จากนั้นทำการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในถังหมักออก และล้างเซลล์ตรึงด้วยน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง นำอาหารเลี้ยงเชื้อชุดใหม่ปริมาณ 1.4 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมลงในถังหมัก ทำการหมักในสภาวะเช่นเดิม เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะคงที่ ทำซ้ำเช่นนี้จนกระทั่งปริมาณกรดลดลง บันทึกจำนวนครั้งของการหมัก และวิเคราะห์ผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1

2.6 ศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ในการยับยั้งเชื้อรา และยีสต์เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายในทางการค้า

ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์ของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยวิธี agar disc diffusion method โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ดังนี้

2.6.1 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

ทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ spread plate โดยทำสารละลายสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายสปอร์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วลนไฟเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วอาหาร ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้า (ในความเข้มข้นที่เท่ากัน) และน้ำกลั่น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนแผ่นกลมซึ่งเตรียมจากกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 5 มม. ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ปากคีบคีบแผ่นกลมไปวางบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่ทำการ spread เชื้อรา บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราวัดได้จากบริเวณการยับยั้ง(โซนใส) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกทั้ง 2 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อยีสต์

ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ spread plate โดยทำสารละลายเซลล์ปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายเซลล์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วลนไฟเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วอาหาร ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้า (ในความเข้มข้นที่เท่ากัน) และน้ำกลั่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนแผ่นกลม (paper disc) ซึ่งเตรียมจากกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 5 มม. ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ปากคีบคีบแผ่นกลมไปวางบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่ทำการ spread เชื้อยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อยีสต์วัดได้จากบริเวณการยับยั้ง(โซนใส) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อยีสต์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกทั้ง 2 ชนิด

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อผสมของ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ที่เป็นเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ที่เป็นเซลล์อิสระ พบว่าปริมาณกรดแลคติกมีปริมาณสูงสุด 4.93 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ และได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 17.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 หลังจากนั้นปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีแนวโน้มที่จะคงที่ไปเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง เริ่มต้นมีปริมาณน้ำตาลแลคโตส 40 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งไม่เหลือน้ำตาลแลคโตสในน้ำหมัก สำหรับเซลล์ที่ถูกตรึง พบว่ามีปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 17.84 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 มีปริมาณกรดแลคติก 5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นมีปริมาณ 40 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลมีแนวโน้มลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง พบว่าไม่มีน้ำตาลแลคโตสเหลืออยู่ในน้ำหมัก ดังแสดงในรูปที่ 3.1

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเซลล์อิสระได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกน้อยกว่าการใช้เซลล์ตรึง อาจเนื่องมาจากการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงจะสามารถควบคุมกระบวนการได้ง่ายกว่าการใช้เซลล์อิสระ อีกทั้งมีความคงตัวมากกว่าเซลล์อิสระ (Jianlong , 2000)

ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yang และคณะ (1994) ที่ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เซลล์ตรึงของ *Propionibacterium acidipropionici* ในสภาวะการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเวย์ที่มีปริมาณแลคโตส 45 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 20 กรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการหมัก 55 ชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาณผลผลิตที่สูงกว่าและใช้เวลาในการหมักน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระ

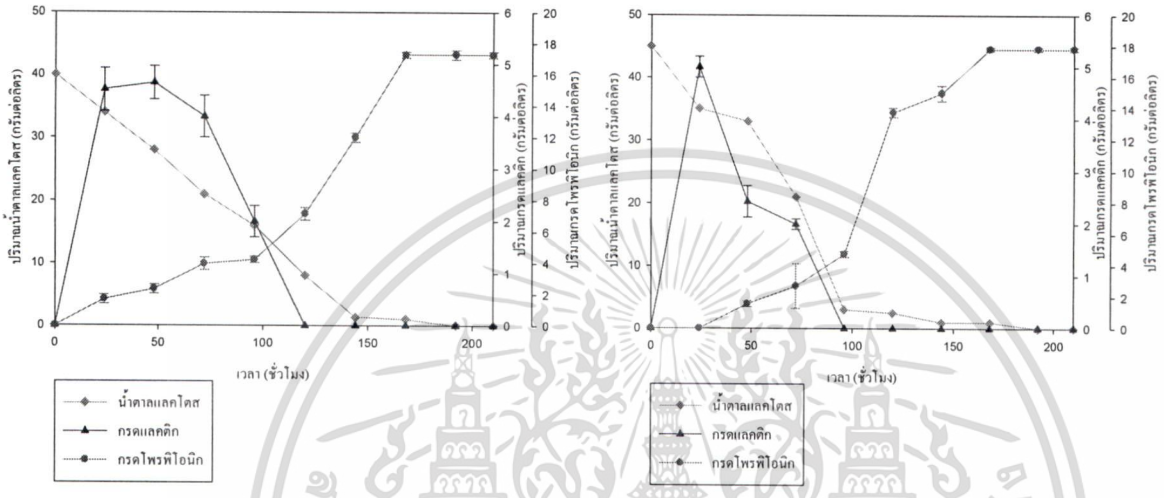
Yang และ Huang (1995) ศึกษาการผลิตโพรพิโอเนตจากเวย์โดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4875 ร่วมกับ *L. lactis* ทำการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เชื้อ *L. lactis* สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสในเวย์เปลี่ยนไปเป็นแลคเตต เพื่อให้เชื้อ *P. acidipropionici* ใช้แลคเตตเป็นซับสเตรตในการผลิตโพรพิโอเนต จากการศึกษาพบว่าในการเปลี่ยนแลคเตตไปเป็นโพรพิโอเนตจะช้ากว่าการเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสไปเป็นแลคเตต และในการหมักจะได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลผลิตคล้ายกับการหมักโดยใช้เชื้อเดี่ยวของ *Propionibacterium* ผลการศึกษาได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 17.4 กรัมต่อลิตร

Suwannakham และ Yang (2005) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ ATCC 4875 เปรียบเทียบระหว่างการใช้เซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักแบบ fibrous bed โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักแบบ fibrous bed ให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 71.8 $\pm$ 0.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระถึงร้อยละ 20 – 59



(ก) (ข)

รูปที่ 3.1 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระ (ก) และเซลล์ตรึง (ข) ของเชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการใช้เชื้อผสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกเมื่อใช้เซลล์อิสระกับเซลล์ตรึงแสดงดังตารางที่3.1 คือปริมาณกรด ผลผลิตกรด และอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก ทั้งการผลิตโดยการใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นการใช้เซลล์ตรึงในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจึงดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ เพราะสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ในการหมักได้อีกครั้ง

ตารางที่ 3.1 แสดงค่า P-value ของการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการใช้เซลล์อิสระกับตรึงของการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ลักษณะเซลล์	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรชั่วโมง)
เซลล์อิสระ	17.27	0.443	0.103
เซลล์ตรึง	17.84	0.446	0.106
ค่า p-value	0.294 ^{ns}	0.695 ^{ns}	0.878 ^{ns}

หมายเหตุ

** ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

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

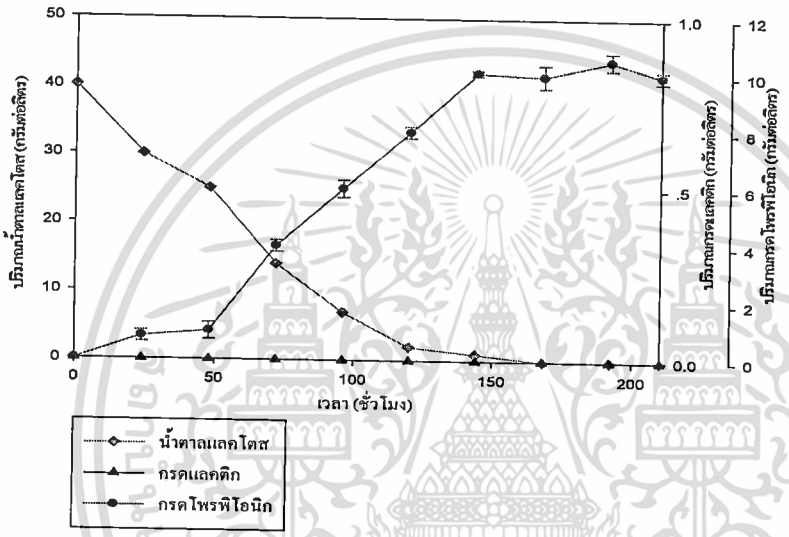
^{ns} ค่า p-value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

116981

3.2 ผลการศึกษาศักยภาพของเชื้อผสมที่ถูกตรึงโดยการนำมาใช้ซ้ำ (cell recycle) เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก

การศึกษาการใช้ประโยชน์จากเซลล์ตรึงในการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ในกระบวนการหมักใหม่ได้อีก 1 ครั้ง เนื่องจากในการหมักมีการควบคุมพีเอชโดยการใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จึงทำให้เจลที่นำมาห่อหุ้มเซลล์เปื่อยยุ่ย เซลล์ที่ถูกตรึงจึงมีประสิทธิภาพเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกเพียงแค่ครั้งเดียว รวมจำนวนรอบที่นำเซลล์ตรึงมาใช้ในการหมักคือ 2 รอบ ซึ่งในการหมักรอบที่ 2 ได้ปริมาณกรด โพรพิโอนิก 10.54 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 192 และไม่มีปริมาณกรดแลคติกในน้ำหมัก สำหรับปริมาณน้ำตาลแลคโตสเริ่มต้นมีปริมาณ 40 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักปริมาณน้ำตาลมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการ กวน 150 รอบต่อนาที เมื่อทำการหมักในรอบที่ 2

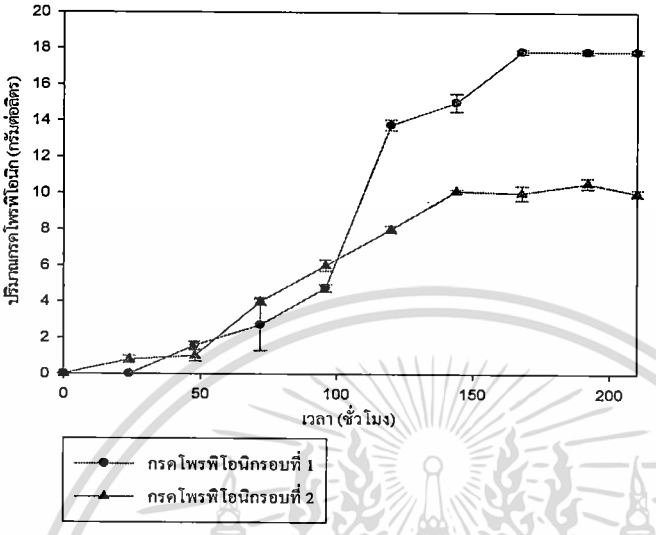
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการหมักในรอบที่1 และรอบที่2 พบว่าในการหมักรอบที่ 1 ได้ปริมาณกรดสูงกว่ารอบที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 3.3 อาจเนื่องมาจากการใช้เซลล์ตรึงนั้นตัวเซลล์จะถูกห่อหุ้มด้วยเจลจึงทำให้กรดที่ผลิตได้ไม่สามารถหลุดออกมาจากเม็ดเจลได้หมด จึงเกิดการสะสมของกรดภายในเม็ดเจล เมื่อปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่เชื้อผลิตมานั้นมีความเข้มข้นสูงจนเป็นเหตุให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (product inhibition) จึงส่งผลให้เชื้อผลิตกรดได้น้อยลงในการหมักรอบที่ 2 แต่ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงคือสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำได้

มีการทดลองของ Rickert และคณะ(1998) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium thoenii* P20 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้กลูโคสและแลคเตตเป็นซับสเตรต วิเคราะห์ผลที่รอบที่ 6 ของระยะการหมัก ซึ่ง 1 รอบการหมักใช้เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้กลูโคส ปริมาณ 75 กรัมต่อลิตร และแลคเตต ปริมาณ 42 กรัมต่อลิตร จะได้ผลผลิตโพรพิโอเนต 34 กรัมต่อลิตร และ 22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Ates และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *Aspergillus niger* เปรียบเทียบระหว่างเซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยมีน้ำมันซิลิโคนช่วยในการเติมออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการใช้เซลล์ตรึงให้ผลผลิตกรดซิตริก 13 กรัมต่อลิตร มากกว่าการเลี้ยงเซลล์อิสระที่ให้ปริมาณผลผลิต 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัมต่อลิตร และในการทดสอบประสิทธิภาพในการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ พบว่าเซลล์ตรึงของเชื้อ *Aspergillus niger* สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 4 รอบการหมัก แต่เมื่อปริมาณรอบการหมักเพิ่มขึ้น ผลผลิตที่ได้จะลดลง เนื่องจากมีการสะสมของกรดซิตริกในเม็ดเจล ทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ซิเตรทซินเทส (citrate syntase) ที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก



รูปที่ 3.3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกในผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในการหมักรอบที่1 และ 2

เมื่อนำปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการหมักในรอบที่ 1 และรอบที่ 2 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรด ผลผลิตกรด และอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในการหมักรอบที่ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่3.2 แสดงค่า P-value ของการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณกรดโพรพิโอนิกในชั่วโมงที่ 168 จากการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อผสมในการหมักรอบที่1 และรอบที่ 2

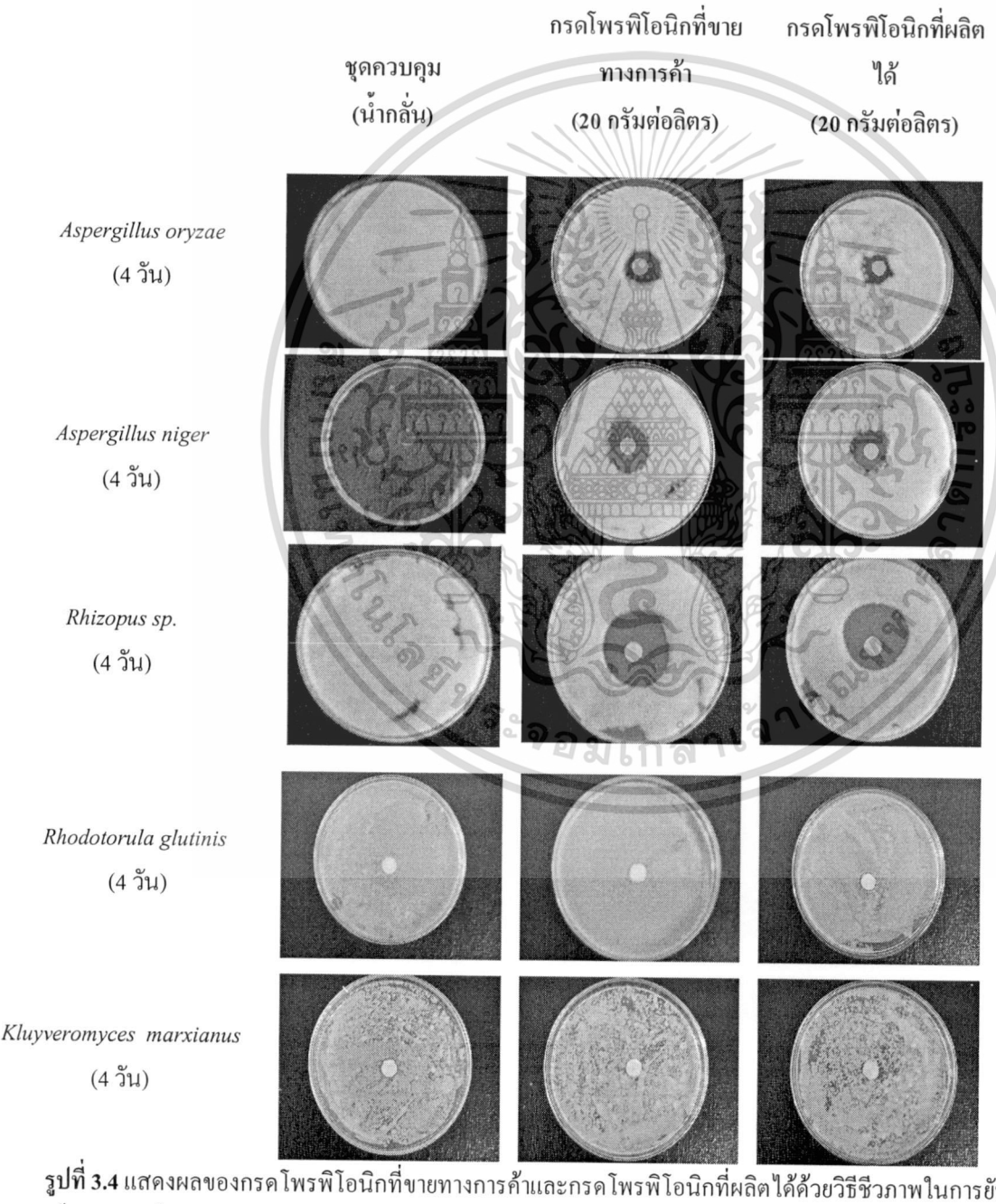
จำนวนรอบของการหมัก	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรชั่วโมง)
1	17.84	0.446	0.106
2	10.54	0.234	0.063
ค่า p-value	0.002^{*}	0.067^{ns}	0.065^{ns}

3.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ในการยับยั้งเชื้อรา และยีสต์เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายในทางการค้า

เมื่อนำกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ทดสอบการยับยั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายด้วยวิธีทางเคมี ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.4 จากการศึกษาพบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพซึ่งมีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

niger และ *Rhizopus sp.* ได้บริเวณยับยั้ง 1.94, 2.46 และ 3.42 ตามลำดับ ส่วนกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้าที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรได้บริเวณยับยั้ง 1.97, 2.16 และ 3.58 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้าที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันพบว่าบริเวณยับยั้งมีขนาดใกล้เคียงกันซึ่งการศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่มีต่อเชื้อราของ Helena Lind และคณะ, 2004 ได้ศึกษาผลของกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆในการยับยั้งเชื้อรา พบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากวิธีทางชีวภาพมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา สำหรับเชื้อยีสต์ *Rhodotorula glutinis* และ *Kluyveromyces marxianus* จากการศึกษา พบว่าไม่มีบริเวณยับยั้งในชุดการทดลองที่มีกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพและกรด โพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้า แสดงว่ากรดโพรพิโอนิกไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อยีสต์ได้



รูปที่ 3.4 แสดงผลของกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ด้วยวิธีชีวภาพในการยับยั้งเชื้อรา และเชื้อยีสต์ ด้วยวิธี Agar diffusion method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อผสมของ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 และ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าในการใช้เซลล์ตรึงผลิตกรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตกรดได้น้อยกว่าการใช้เซลล์อิสระเล็กน้อย โดยเมื่อใช้เซลล์ตรึงสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณ 17.84 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 มีผลผลิตกรดและอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.381 กรัมต่อลิตร และ 0.099 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อใช้เซลล์อิสระได้ปริมาณกรด 17.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 แต่ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงคือ สามารถนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำได้ซึ่งจากการทดลอง พบว่าสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำได้อีก 1 ครั้ง ซึ่งได้กรดโพรพิโอนิกปริมาณ 10.54 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 มีผลผลิตกรดและอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.234 กรัมต่อลิตร และ 0.063 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา และเชื้อยีสต์เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายด้วยวิธีทางเคมีพบว่า กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพและที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์ที่นำมาทดสอบ สำหรับการยับยั้งเชื้อราพบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้เช่นเดียวกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี

5. เอกสารอ้างอิง

สุรนารถ อร่ามเรือง.2550. การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.

สุรีย์ ทองวณิชนิยม. 2543. การใช้ประโยชน์จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล เพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.

ฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ.2550. การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากหางนมโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.

Ates, S., Dingil, N., Bayraktar, E. and Mehmetoglu, U. 2002. "Enhancement of citric acid production by immobilized and freely suspended *Aspergillus niger* using silicone oil". Journal of Process Biochemistry. 38 : 433-436.

Barbirato, F., Chedaille, D. and Bories, A. 1997. "Propionic acid fermentation from glycerol : comparison with conventional substrates". Applied Microbiology and Biotechnology. 47 : 441 – 446.

Dibner, J. 2004. " Can they replace antibiotic growth promoters? ". Feed International . 25 (12) : 14-16.

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.

Helena, L., Hans, J. and Johana, S. 2004. "Antifungal effect of dairy propionbacteria-contribution of organic acids". Journal of Food Microbiology. 98 : 157 – 165.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Jianlong, W. 2000. " Production of citric acid by immobilized *Aspergillus niger* using a rotating biological contactor(RBC) ". Bioresource Technology. 31 : 245 – 247.

Ozadali, F., Glatz, B.A. and Glatz, C.E. 1996. "Fed-batch fermentation with and without on-line extraction for propionic and acetic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*". Applied Microbiology and Biotechnology. 44 : 710 – 716.

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.

Rickert, D. A., Charles, E .G., Bonita, A. G. 1998. " Improved organic acid production by calcium alginate-immobilized propionibacteria ". Enzyme and Microbial Technology. 22 : 409 – 414.

Schwenninger, S.M. and Meile, L. 2004. " A Mixed Culture of *Propionibacterium Jensenii* and *Lactobacilus paracasei* subsp. *paracasei* Inhibits Food Spoilage Yeasts ". Applied Microbiology. 27 : 229-237.

Suwannakham, S. and Yang, S. 2005. " Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor ". Biotechnology and Bioengineering. 91 : 325 – 337.

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.

Yang, S., Zhu, H. and Li, Y. 1994. " Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor ". Biotechnology and Bioengineering. 43 : 1124 – 1130.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้