รายงานผลการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2551

เรื่อง

การเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 และการทำให้บริสุทธิ์

Enhance of Propionic Acid Production from Whey by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 in Combination with *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and purification

โดย

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

RCH
QR
92
.P7
ส743ก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 116878
วันที่ 16 มี.ค. 2554

b. 12320332
i.....

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 และการทำให้บริสุทธิ์

Enhance of Propionic Acid Production from Whey by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 in Combination with *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and purification

สุขใจ ชูจันทร์

Sukjai Choojun

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากหางนมโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 พบว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือหัวเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 5 และหัวเชื้อ *Lactococcus lactis* ปริมาณร้อยละ 5 โดยการเติมหัวเชื้อทั้ง 2 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกันเมื่อเริ่มทำการทดลอง เมื่อทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่ต้องพ่นอากาศ ใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด คือ 17.27 กรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการหมัก 168 ชั่วโมง ได้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.443 กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.103 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 2.90×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 3.50×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ABSTRACT

Propionic acid production from whey by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 in combination with *Lactococcus lactis* TISTR 1401 was studied. It was found that the optimal initial inoculum size in propionic acid production was 5% *Propionibacterium acidipropionici* and 5% *Lactococcus lactis* by inoculating both cultures in a medium at the same time. Propionic acid production by batch fermentation conducted in 2 liters fermentor at 30°C , 150 rpm. and pH 6.5 produced maximum propionic acid (17.27 g/l in 168 hours). The propionic acid yield and its productivity were 0.443 (g/g) and 0.103 (g/l.h), respectively and a number of cells increased from 2.90×10^7 to 3.50×10^{10} cfu/ml.

Key Words : whey, propionic acid

kcsukjai@kmitl.ac.th

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Department of Applied Biology. Faculty of Science.King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

โพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทราและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Colomban และคณะ,1993) จึงนิยมใช้เป็นสารกันบูดในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ขนมปัง และอาหารสัตว์ (Quesada-Chanto และคณะ, 1994) นอกจากนั้นยังใช้เพื่อเป็นสารให้กลิ่นรส กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตเพื่อการค้านิยมผลิตโดยกระบวนการทางเคมี โดยใช้สารเริ่มต้นที่เป็นอันตราย เช่น propionaldehyde , methyl propylketone กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ นิยมใช้แบคทีเรียโพรพิโอนิกซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดี การใช้แบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถลดต้นทุนการผลิต แต่มีข้อเสีย คือใช้เวลาในการหมักนาน (Himmi และคณะ, 2000)

ปัจจุบันหางนมเป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งโดยมีการนำหางนมไปผลิตเป็นหางนมผง หางนมเข้มข้น และเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ การทดลองนี้เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้หางนมเป็นซับสเตรตซึ่งเป็นการใช้หางนมให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าในเชิงพาณิชย์ อีกทั้งการใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงกระบวนการผลิตทางชีวภาพให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมระหว่างเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง คือหางนมเติมแหล่งแร่ธาตุซึ่งประกอบด้วย K_2HPO_4 ปริมาณ 0.25 กรัมต่อลิตร $MnSO_4.4H_2O$ ปริมาณ 0.05 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ ปริมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัดปริมาณร้อยละ 1 และ $CaCO_3$ ปริมาณร้อยละ 1 แบ่งการทดลองออกเป็น 8 ชุด ดังนี้

   ชุดที่ 1 : เติมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ 5

   ชุดที่ 2 : เติมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ 10

   ชุดที่ 3 : เติมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 5

   ชุดที่ 4 : เติมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 10

   ชุดที่ 5 : เติมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ 5

   ชุดที่ 6 : เติมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 10 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ 10

   ชุดที่ 7 : เติมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ 10

   ชุดที่ 8 : เติมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 10 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ 5

   เตรียมอาหารในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 1.4 ลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) ปิดจุกด้วยจุกยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อตามชุดการทดลองทั้ง 8 ชุด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 210 ชั่วโมง

2. ศึกษาระยะเวลาในการเติมหัวเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อผลิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ... เพื่อการค้า ... ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดโพรพิโอนิกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยผันแปรระยะเวลาในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 1 คือเติมเชื้อในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง และการเก็บตัวอย่างทำเช่นเดียวกับข้อ 1

3. ศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยผันแปรอัตราการกวนที่ความเร็ว 0, 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อลงในถังหมักปริมาณ 1.4 ลิตร (ร้อยละ70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2 ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอช ที่ 6.5 ไม่ต้องพ่นอากาศ (Quesada-Chantao, 1994 ;Paik และ Glatz,1994) เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะคงที่

4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง ทั้งสามหัวข้อทำการวิเคราะห์ผลดังนี้

4.1 วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และกรดแลคติกด้วยHPLC โดยใช้คอลัมน์ Inertsil C8-3 มีโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

4.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีของ Dobois,1956

4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อผสมโดยวิเคราะห์หาปริมาณของเซลล์ทั้งหมดด้วยวิธี Total plate count (A.O.A.C. 2000)

4.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1.ผลการศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อผสมที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

การทดลองชุดที่ 1 ซึ่งทำการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ 5 ทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด 4.87 กรัมต่อลิตร การทดลองชุดที่ 2 ทำการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ 10 ได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด 6.67 กรัมต่อลิตร การทดลองชุดที่ 3 ทำการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 5 ทำการหมักเป็นเวลา 210 ชั่วโมง ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 12.66 กรัมต่อลิตร การทดลองชุดที่ 4 ทำการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 10 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 12.34 กรัมต่อลิตร การทดลองชุดที่ 5 เติมเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 5 ร่วมกับ *L. lactis* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 5 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 2.77 กรัมต่อลิตร และกรดแลคติก 4.59 กรัมต่อลิตร การทดลองชุดที่ 6 เติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ 10 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ 10 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 1.34 กรัมต่อลิตร และกรดแลคติก 7.23 กรัมต่อลิตร การทดลองชุดที่ 7 เติมปริมาณหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ 5 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ 10 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 1.24 กรัมต่อลิตร และกรดแลคติก 6.67 กรัมต่อลิตร การทดลองชุดที่ 8 เติมปริมาณหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ10 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ 5 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 2.52 กรัมต่อลิตร และกรดแลคติก 5.00 กรัมต่อลิตร แต่ในการทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการใช้เชื้อผสมจึงนำปริมาณกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้เชื้อผสมเท่านั้นมาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อเลือกใช้หัวเชื้อที่เหมาะสมของเชื้อผสมมาทำการศึกษาต่อไป เมื่อนำปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยใช้เชื้อผสมจากการทดลองชุดที่ 5 - 8 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยการใช้เชื้อผสมของเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ 5 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ 5 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อเทียบกับการทดลองชุดอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบการทดลองในการใช้เชื้อผสมที่เติมเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ 5 กับร้อยละ 10 พบว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ 10 มีแนวโน้มที่จะผลิตกรดโพรพิโอนิกได้น้อยกว่าสูตรอาหารที่ใช้ *L. lactis* ร้อยละ 5 เมื่อเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในปริมาณที่เท่ากัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณกรดแลคติกที่มากเกินไปจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. acidipropionici* ทำให้ผลิตกรดโพรพิโอนิกได้น้อยลง

Table 1 Comparison of various inoculum size for propionic acid production at 210 hr.

Set	Inoculum size	Propionic acid (g/l)	Lactic acid (g/l)
1	5% *L. lactis*	-	4.87
2	10% *L. lactis*	-	6.67
3	5% *P. acidipropionici*	12.66	-
4	10% *P. acidipropionici*	12.34	-
5	5% *P. acidipropionici* and 5% *L. lactis*	2.77[a]	4.59
6	10% *P. acidipropionici* and 10% *L. lactis*	1.34[c]	7.23
7	5% *P. acidipropionici* and 10% *L. lactis*	1.24[d]	6.67
8	10% *P. acidipropionici* and 5% *L. lactis*	2.52[b]	5.00

* a,b,c,d means significantly different at 95% confidence level

2. ผลการศึกษาระยะเวลาในการเติมหัวเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

เลือกใช้หัวเชื้อผสมของเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ 5 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ 5 ในการทดลอง พบว่าจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ไปพร้อมกับเชื้อ *L. lactis* ในชั่วโมงที่ 0 คือได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 2.77 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ การเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในชั่วโมงที่ 12 , 24 และ 48 ซึ่งได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 2.53, 2.29, และ 1.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในชั่วโมงที่ 0, 12 , 24 และ48 ได้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.139, 0.120, 0.127 และ 0.096 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ และได้อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.013, 0.012, 0.010 และ 0.007 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ การเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในชั่วโมงที่ 48 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกน้อยที่สุด อาจเนื่องมาจากการที่เติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในชั่วโมงที่มากขึ้นทำให้เชื้อโตช้ากว่าการที่เติมในชั่วโมงที่ 0 และ 12 และกรดแลคติกที่มีอยู่ในอาหารอาจส่งผลทำให้เชื้อ *P. acidipropionici* เจริญเติบโตได้ไม่ดี

เมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธีทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าทุกชุดการทดลองให้ผลการผลิตกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และในการเติมหัวเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

P. acidipropionici ไปพร้อมกับเชื้อ *L. lactis* ในชั่วโมงที่ 0 นั้นให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด จึงเลือกใช้การเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ไปพร้อมกับเชื้อ *L. lactis* ในการทดลองในหัวข้อต่อไป

Table 2 Comparison of period of time to addition of *P. acidipropionici* for propionic acid production at 210 hr.

Period of time to addition of *P. acidipropionici*	Propionic acid (g/l)	Propionic acid yield (g/g)	Propionic acid productivity (g/l.h)
0 h.	2.77 [a]	0.139	0.013
12 h.	2.53 [b]	0.120	0.012
24h.	2.29 [c]	0.127	0.010
48 h.	1.63 [d]	0.096	0.007

3. ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยผันแปรอัตราการกวน

การศึกษาอัตราการกวนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้หัวเชื้อผสมมีการควบคุมสภาวะที่ใช้ในการหมัก คือ ควบคุมพีเอชที่ 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่มีการพ่นอากาศ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1

การทดลองชุดที่ 1 ไม่มีการกวนในถังหมัก พบว่าเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 210 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณ 16 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกรดแลคติก 4.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 – 72 หลังจากนั้นกรดแลคติกมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการทดลองเหลือปริมาณน้ำตาลแลคโตส 6 กรัมต่อลิตร และเชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 3.00×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 2.31×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร

การทดลองชุดที่ 2 ใช้อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุด 14 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 192 และมีกรดแลคติก 4.4 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลง มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 2.87×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 2.00×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร

การทดลองชุดที่ 3 ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที พบว่าในชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณกรดแลคติก 4.45 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณกรดแลคติกจะลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่144หลังจากนั้นจะไม่มีกรดแลคติกเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 14.24 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 3.00×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 2.00×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร

การทดลองชุดที่ 4 ใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที พบว่าในชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณกรดแลคติก 4.93 กรัมต่อลิตร มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 17.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อจะมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 2.90×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 3.50×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร

การทดลองชุดที่ 5 ใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พบว่าในชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณกรดแลคติก 3.64 กรัมต่อลิตร มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 7.21 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 เซลล์มีการเติบโตเพิ่มขึ้นจาก 2.95×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 9×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 210

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

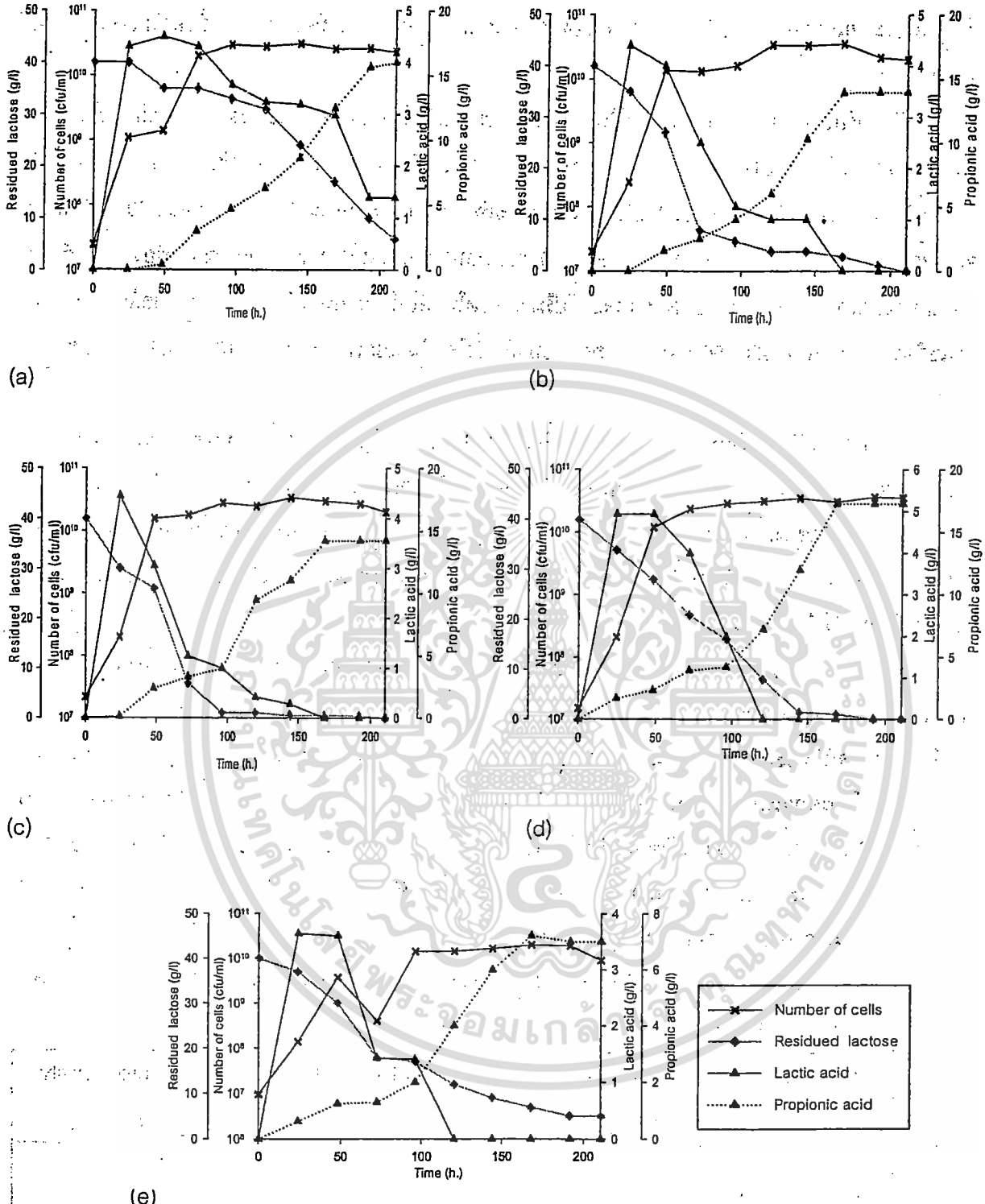


Fig 1 Effect of propionic acid production in 2 liters fermentor (a) without agitation (b) agitate at 50 rpm. (c) agitate at 100 rpm. (d) agitate at 150 rpm. (e) agitate at 200 rpm.

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่ทำการหมักในถังหมัก พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 210 การทดลองที่ไม่มีการกวน และที่ทำการกวนในอัตรา 50 และ 100 รอบต่อนาที จะมีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน ในการกวนด้วยอัตรา 150 รอบต่อนาที จะมีจำนวนเซลล์สูงที่สุด และในการกวน 200 รอบต่อนาที เซลล์จะมีจำนวนน้อยที่สุด การเพิ่มอัตราการกวนให้มากขึ้นจนถึง 200 รอบต่อนาที จะไม่ส่งผลดีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกแต่ยัง

116878

ทำให้ได้ปริมาณกรดน้อยลงไปอีก อาจเนื่องมาจากเมื่อเพิ่มอัตราการกวนจะส่งผลต่อเชื้อทำให้เซลล์จุลินทรีย์ได้รับอันตราย

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้พบว่าเมื่อไม่มีการกวนจะใช้เวลาในการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด คือใช้เวลาในการผลิตนาน 210 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 50 รอบต่อนาที ทำให้ลดระยะเวลาการผลิตให้เหลือเพียง 192 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 100 , 150 และ 200 รอบต่อนาที จะใช้ระยะเวลาการผลิตน้อยกว่าอัตราการกวน 50 รอบต่อนาที โดยจะใช้ระยะเวลาการผลิตเพียง 168 ชั่วโมง และเมื่อใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาทีจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากที่สุดคือ 17.27 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือใช้อัตราการกวน 0, 100, 50 และ 200 รอบต่อนาที ซึ่งได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 16, 14.24, 14 และ 7.21 ตามลำดับ

เมื่อทำการผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตรนั้นมีปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากขึ้น เนื่องมาจากการผลิตในถังหมักมีการควบคุมสภาวะต่างๆ คือ ควบคุมพีเอชที่ 6.5 ให้คงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium* (Tittster,1940; Champagne และคณะ, 1989 ; Crespo,1990 ; Yang และคณะ, 1994) ทำให้เชื้อ *P. acidipropionici* สามารถใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้อีกทางหนึ่ง

จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกในชั่วโมงที่ 168 ของการทดลองทุกชุด ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที ให้ผลการผลิตกรดสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการทดลองชุดอื่นๆ ในการใช้อัตราการกวน 50 และ 100 รอบต่อนาที ให้ผลการผลิตกรดไม่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้หัวเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ร้อยละ 5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ 5 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร คือมีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่มีการพ่นอากาศ มีการกวนในอัตรา 150 รอบต่อนาที

Table 3 Comparison of various agitation rate in 2 liters fermentor by mixed culture for propionic acid Production at 168 hr.

Agitation rate (rpm)	Propionic acid (g/l)	Propionic acid yield (g/g)	Propionic acid productivity (g/l.h)
0	12.5[c]	0.543	0.074
50	13.92[b]	0.374	0.083
100	14.24[b]	0.356	0.085
150	17.27[a]	0.443	0.103
200	7.21[d]	0.225	0.043

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากหางนมโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสม คือหางนมเติมแหล่งแร่ธาตุซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วย K_2HPO_4 ปริมาณ 0.25 กรัมต่อลิตร $MnSO_4.4H_2O$ ปริมาณ 0.05 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ ปริมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัดปริมาณร้อยละ 1 และ $CaCO_3$ ปริมาณร้อยละ 1 พบว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร้อยละ 5 และใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ร้อยละ 5 สำหรับระยะเวลาในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ที่เหมาะสม คือการเติมหัวเชื้อทั้ง 2 ลงไปพร้อมกันเมื่อเริ่มทำการทดลองจะทำให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด 2.77 กรัมต่อลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 210 ชั่วโมง เมื่อทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด คือ 17.27 กรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการหมัก 168 ชั่วโมง มีผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.443 กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.103 กรัมต่อลิตรชั่วโมง มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก $2.90x10^7$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น $3.5x10^{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตรเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

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.

Champagne, C.P., Baillargeon, C. and Goulet, A. 1989. Whey fermentation by immobilized cells *Propionibacterium shermanii*. **Journal of Applied Bacteriology.** 66 : 175 – 184.

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.

Crespo, J.P.S.G.1990. Modeling of immobilized cell reactor for propionic acid fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. 36 : 705 – 716.

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.

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.

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.

Tittster, R.P. 1940. The influence of hydrogen ion concentration up on the growth of *Propionibacterium*. **Journal of Bacteriology**. 39 : 95 – 96.

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 ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46

The Proceeding of 46th Kasetsart University Annual Conference

เล่มที่ 5

สาขาวิทยาศาสตร์

(Subject: Science)

จัดโดย (Organized by)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Kasetsart University)

ร่วมกับ (in cooperation with)

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (Commission of Higher Education)

กระทรวงศึกษาธิการ (Ministry of Education)

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (Ministry of Agriculture and Cooperatives)

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (Ministry of Science and Technology)

กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

(Ministry of Natural Resource and Environment)

กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร

(Ministry of Information and Communication Technology)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (National Research Council of Thailand)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (The Thailand Research Fund)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

29 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์ 2551 (29 January – 1 February 2008)

เนื่องในวโรกาสเฉลิมฉลองพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว
มีพระชนมพรรษาครบ ๘๐ พรรษา

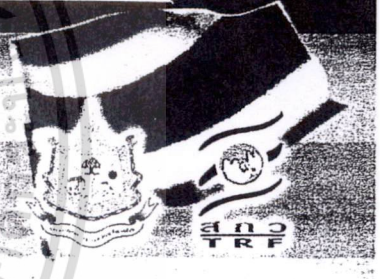
เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๔๖ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

The Proceeding of 46th Kasetsart University Annual Conference

เล่มที่ 5

สาขาวิทยาศาสตร์

(Subject: Science)



"เกษตรศาสตร์เทิดพระเกียรติ ๘๐ พรรษา
เพื่อประชาไทยอยู่เย็นเป็นสุข"

"Kasetsart University celebrates His Majesty's 80th birthday and 80 years of peace and prosperity in the Kingdom"