

รายงานโครงการวิจัยเงินงบประมาณปีพ.ศ. 2554 ฉบับสมบูรณ์

เรื่อง การประยุกต์ใช้สารสกัดpektinหยาบจากใบกรงเขมา (*Cissampelos pareira* L.)
ในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965
เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก

Application of Pectin Crude Extracts from Krung Kha Mao Leaves
(*Cissampelos pareira* L.) to Immobilized Cells of
Propionibacterium acidipropionici ATCC 4965 for Propionic acid Production



สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการประยุกต์ใช้สารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากเงินงบประมาณปีพ.ศ. 2554

ขอขอบคุณ บริษัท Minor Cheese Limited สำหรับความอนุเคราะห์น้ำเวย์ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นำมาใช้ในงานวิจัย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
เนื้อเรื่อง	4
วิธีการทดลอง	27
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
สรุปผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง	39



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบ เพคตินจากใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์และการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ คือ ใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.52 มิลลิเมตร โดยใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 4 และใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่า *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 20.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระซึ่งสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 19.24 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เช่นกัน และเมื่อศึกษาการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ พบว่าสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้ 5 รอบการหมัก

ABSTRACT

The research was performed the application of pectin crude extracts from Krung Kha Mao leaves (*Cissampelos pareira* L.) to immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 for propionic acid production. Optimal conditions effecting to immobilization and propionic acid production were investigated. The results indicated that optimal conditions for immobilization were 4% pectin concentration, 1.52 mm inner diameter of silicone tube and 5% (v/v) inoculum for immobilization. The maximum concentrations of propionic acid was 20.5 g/l (216h), when produced by pectin crude extracts immobilized *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965. Whereas, the concentration of propionic acid produced by free cell of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 was 19.24 g/l (216h). The immobilization of pectin crude extracts immobilized *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 could be reuse up to 5 batch cycles.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทราและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Colomban และคณะ,1993) จึงนิยมใช้เป็นสารกันบูดในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ขนมปังและอาหารสัตว์ (Quesada-Chanto และคณะ,1994) โดยนิยมใช้ในรูปของเกลือแคลเซียม เกลือโซเดียมและเกลือโพแทสเซียม (Yang และคณะ,1994) นอกจากนี้กรดโพรพิโอนิกยังใช้เป็นส่วนผสมในยาควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจ และเป็นสารให้กลิ่นรส (Himmi และคณะ,2000) อีกทั้งยังใช้ในอุตสาหกรรมการทำพลาสติกในรูปของเซลลูโลส โพรพิโอเนต (Barbirato และคณะ,1997) ในประเทศไทย พบว่ายังไม่มีการผลิตกรดโพรพิโอนิกในเชิงพาณิชย์ กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพ การผลิตเพื่อการค้านิยมผลิตโดยกระบวนการทางเคมี (Himmi และคณะ,2000) เนื่องจากได้ผลผลิตสูงและรวดเร็ว แต่ใช้สารเริ่มต้นที่เป็นอันตรายและก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น Propionaldehyde, methyl propylketone ซึ่งต้องใช้ต้นทุนสูงในการผลิตในช่วงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยลดขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และไม่เป็นพิษ (Paik และ Glatz,1994)

กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ นิยมใช้เชื้อแบคทีเรียสกุล *Propionibacterium* sp. และการใช้แบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถลดต้นทุนการผลิตและผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีความเป็นพิษ ซึ่งสามารถใช้กับอุตสาหกรรมประเภทอาหารได้ (Colomban และคณะ,1993)ซึ่งข้อจำกัดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพจะใช้เวลาในการหมักนานและได้ผลผลิตกรดในปริมาณน้อย (Himmi และคณะ,2000) เช่น การหมักแบบกะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียงร้อยละ 1-3 ซึ่งใช้เวลาในการหมัก 7-14 วัน (Schuppert และคณะ,1992); (Jefferson และคณะ, 2008); (Zhang และYang ,2009) ดังนั้นจึงได้มีการคิดหาวิธีเพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีต่างๆ เช่น การตรึงเซลล์ (Sowannakham และYang ,2005); (Zhang และYang ,2009) การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะ (Goswami และ Srivastava ,2000); (Zhang และYang ,2009) การใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (Paik และ Glatz ,1994); (Kouya และคณะ,2008) และการคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโพรพิโอนิก (Jefferson และคณะ, 2008)

การตรึงเซลล์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในระบบการหมักจากจุลินทรีย์มีการนำเซลล์ตรึงมาใช้ในกระบวนการผลิตกรดอินทรีย์ กรดอะมิโน เอนไซม์ และยาปฏิชีวนะ ซึ่งพบว่าการใช้เซลล์ตรึงสามารถควบคุมกระบวนการหมักได้ง่าย และให้ผลผลิตดีกว่า รวมถึงมีความคงตัวมากกว่าการใช้เซลล์อิสระ (Jianlong, 2000) สำหรับวัสดุที่นิยมนำมาใช้ในการตรึงเซลล์ส่วนใหญ่ได้แก่ แอลจิเนต คาราจีแนน เพคติน และวุ้น (Roy และคณะ, 1987; Goksungur และคณะ, 2005) แต่ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วัสดุในการตรึงที่ได้จากธรรมชาติ คือใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ซึ่งมีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น ใบหมาน้อย หรือใบกรุงบาดาล เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ *Menispermaceae* พบมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้มีการศึกษาพบว่าใบกรุงเขมา มีเพคตินเป็นส่วนประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 25-40 (พิเชษฐ เทบารุง, 2546) เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการผลิต และใช้ทรัพยากรทางธรรมชาติที่มีอยู่ให้คุ้มค่า จึงมีความน่าสนใจที่จะนำไบโกรูมเมมาสกัดเพื่อนำ
เพคตินมาใช้ประโยชน์เป็นวัสดุในการรีงเซลล์

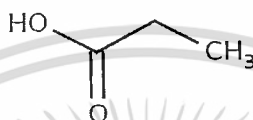


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเรื่อง

1.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกจัดเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ได้จากการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทรา นอกจากนี้ยังพบกรดโพรพิโอนิกตามธรรมชาติได้ในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ในเหงื่อของคนและในอาหารประเภทหมักดอง เป็นต้น กรดโพรพิโอนิก มีสูตรโมเลกุล คือ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ สูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก แสดงดังตารางที่ 1.1



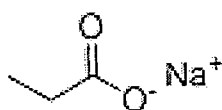
รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก

ที่มา : http://bmrw.wisc.edu/metabolomics/standards/propionic_acid/lit/3463.png

สืบค้นข้อมูลวันที่ 5 ตุลาคม 2553

1.2 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่ไม่แตกตัว มีประโยชน์ในการทำลายจุลินทรีย์โดยไปละลายสารภายในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีการตั้งสมมติฐานว่า กรดโพรพิโอนิกสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยไปรบกวนการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ ส่งผลให้สภาพภายในเซลล์มีความเป็นกรดมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ช่วยในการยับยั้งการเจริญและทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของกรดโพรพิโอนิกที่ทำให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 3.4 ถึง 4.5 โดยที่พีเอช 4 จะมีโมเลกุลของกรดและเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 88 ในขณะที่พีเอช 6 จะมีโมเลกุลของกรดและเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 6.7 ซึ่งกรดที่ไม่แตกตัวนี้ทำให้เกิดการยับยั้งการใช้อาหารของจุลินทรีย์ อีกทั้งกรดโพรพิโอนิกจะมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นเมื่อมีแอนไอออนไปรบกวนการแตกตัวของกรดโพรพิโอนิกที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะอยู่ในรูปของเกลือ ได้แก่ เกลือโซเดียม แคลเซียม และโพแทสเซียม (ศิวาพร, 2546) สูตรโครงสร้างโมเลกุลของโซเดียมโพรพิโอเนต แสดงดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของโซเดียมโพรพิโอเนต

ที่มา : <http://www.chemicalbook.com/CAS%5CGIF%5C137-40-6.gif>

สืบค้นข้อมูลวันที่ 5 ตุลาคม 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1.1 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ	กรดโพรพิโอนิก
น้ำหนักโมเลกุล	74.08
Conversion factor	1 พีพีเอ็มเท่ากับ 3.02 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตรเท่ากับ 0.3 พีพีเอ็ม ที่ 25 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	
จุดเดือด	(-20) ถึง (-22) องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น	141.1 องศาเซลเซียส
การละลายน้ำ	0.992 – 0.994
ค่าพีเอช	สามารถละลายน้ำได้
การละลายในสารละลาย	2.9
ความดันบรรยากาศ	สามารถละลายในเอทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม
ความดันไอ	2.55
อัตราการระเหย	0.32 ถึง 0.4 กิโลปาสคาล
อุณหภูมิวิกฤติ	ไม่ระเหย
ค่าความเป็นกรด	339 องศาเซลเซียส
ความดันวิกฤติ	กรดอ่อน pKa 4.87
ความคงตัว	5370 กิโลปาสคาล
การกักกร่อนเหล็ก	มีความคงตัว
สถานะที่ควรหลีกเลี่ยง	สามารถกักกร่อน เหล็กกล้า นิกเกิล โครเมียม และตะกั่ว
วัตถุที่ควรหลีกเลี่ยง	อุณหภูมิเกิน 50 องศาเซลเซียส สารออกซิไดซ์ กรดแก่ Reactive metal Reducing agent

ที่มา : http://absoluteastronomy.com/encyclopedia/p/pr/propionic_acid.htm

สืบค้นข้อมูลวันที่ 5 ตุลาคม 2553

กรดโพรพิโอนิกมีความปลอดภัยในการใช้ในอาหาร จึงไม่ได้กำหนดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในอาหาร ยกเว้นในอาหารบางประเภทซึ่งกำหนดความเข้มข้นสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ ดังนี้ ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งให้ใช้ได้ ปริมาณสูงสุดไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 1 กิโลกรัม (ศิวาพร,2546) สำหรับผลิตภัณฑ์ประเภท ขนมปัง ให้ใช้ได้ ปริมาณสูงสุดไม่เกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 1 กิโลกรัม (ประกาศกระทรวง สาธารณสุข พ.ศ. 2527 ฉบับที่ 84 เรื่องวัตถุเจือปนในอาหาร) นอกจากนี้มีรายงานการใช้กรดโพรพิโอนิกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนี้ Vandegraft และคณะ (1975) รายงานการใช้กรดโพรพิโอนิกความ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นร้อยละ 0.1 กับเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 28 พบว่าตลอดการทดลอง 29 สัปดาห์ ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* กับ *Aspergillus ochraceus* และไม่พบสารอะฟลาทอกซิน B₁ กับสารโอคราทอกซินเลย

Buchanan และ Ayres (1976) รายงานว่าการใช้กรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อ 100 ลิตรของอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. parasiticus* และการสร้างอะฟลาทอกซินได้บางส่วน แต่ถ้าเพิ่มเป็น 0.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการสร้างอะฟลาทอกซินได้ อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 7 วัน

Racker และคณะ (1992) รายงานว่าการใช้กรดโพรพิโอนิกร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 26.8 และ 29.6 ได้ตลอดการทดลอง 42 สัปดาห์

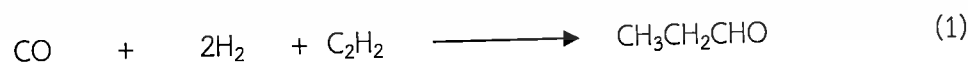
Filya และคณะ (2004) รายงานว่าการใช้เชื้อ *P. acidipropionici* เพียงชนิดเดียวหรือผสมรวมกันกับ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งจะมีผลต่อกระบวนการหมักและสภาวะการให้อากาศของข้าวสาลี ข้าวฟ่าง และข้าวโพด ซึ่งเป็นอาหารสัตว์พบว่าการใช้เชื้อ *P. acidipropionici* เพียงชนิดเดียวจะมีการสร้างกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติกในระดับที่สูงกว่าการใช้เชื้อ *L. plantarum* เพียงชนิดเดียวและเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* กับ *L. plantarum* ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการยับยั้งกิจกรรมของยีสต์ที่มีต่อข้าวสาลี ข้าวฟ่าง และข้าวโพดในอาหารสัตว์

1.3 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก

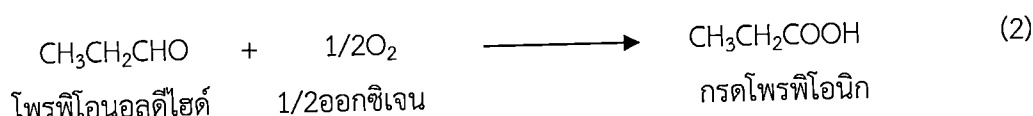
กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ 2 วิธี ดังนี้

1.3.1 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี ในปัจจุบันการผลิตกรดโพรพิโอนิกในเชิงพาณิชย์นิยมใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากใช้เวลาในการผลิตสั้นและได้ผลผลิตตามต้องการ โดยใช้ปฏิกิริยาการออกซิเดชันของโพรพิโอนอลดีไฮด์ที่อุณหภูมิ 40–50 องศาเซลเซียส

ดังสมการที่ 1 และ 2



คาร์บอนโมนอกไซด์ ไฮโดรเจน เอทีรีน โพรพิโอนอลดีไฮด์



ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Propionic_acid สืบค้นข้อมูลวันที่ 6 ตุลาคม 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.2 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ สำหรับกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium* อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากผลผลิตที่ได้มีปริมาณน้อยโดยมีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

Woskow และ Glatz (1991) รายงานผลการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคโตสจากหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P9 และ 200910 หมักแบบกะและแบบกึ่งกะ พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ 200910 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกปริมาณ 47 กรัมต่อลิตร สูงกว่าผลผลิตที่ได้จากสายพันธุ์ P9 และให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *P. acidipropionici* ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกและวิตามินบี 12 จากซูโครส พบว่าปริมาณของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 มิลลิกรัม ธาตุโคบอลต์ 0.75 มิลลิกรัม และ 5,6 ไดเมทิลเบนซิมิดสโซล 0.3 มิลลิกรัม เป็นปริมาณแร่ธาตุที่จำเป็น นอกเหนือจากแหล่งไนโตรเจน ฟอสเฟต และแมกนีเซียม ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของซูโครสที่ปริมาณ 30 ถึง 170 กรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลให้เกิดการยับยั้งจากซัลเตรตและสำหรับการผลิตเพื่อให้ได้กรดโพรพิโอนิกนั้นต้องทำในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนการผลิตวิตามินบี 12 นั้นต้องทำในสภาวะที่มีอากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.5

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก ได้แก่ กลูโคสและแลคเตตจาก corn steep liquor (CSL) โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P9 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและเชื้ออิสระในสภาพการหมักแบบกะ กึ่งกะ และแบบต่อเนื่อง พบว่าการหมักแบบกะจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดในเวลา 36 ชั่วโมง การใช้แลคเตตเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าการใช้กลูโคส ส่วนการหมักแบบกึ่งกะจะใช้เวลาหมักนาน 250 ชั่วโมง ปริมาณสูงสุดของกรดโพรพิโอนิกที่ได้จากการใช้กลูโคส เท่ากับ 57 กรัมต่อลิตร สูงกว่าการใช้แลคเตตที่ได้ผลผลิต 45.6 กรัมต่อลิตร และในสภาพการหมักทั้งแบบกะและแบบต่อเนื่อง เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าเซลล์อิสระ

Ramsay และคณะ (1998) ศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพเพื่อเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสเป็นกรดโพรพิโอนิก ในการศึกษาใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ส่วนที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 60 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 2.5 กรัมต่อลิตร การเกิดกรดจะเกิดควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของเชื้อ มีอัตราการเจริญจำเพาะคือ 0.1 ต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ 0.23 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Rickert และคณะ (1998) ศึกษาการตรึงเซลล์ *P. thoenii* สายพันธุ์ P20 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกในสภาพการหมักแบบกะ โดยใช้กลูโคสและแลคเตตเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไม่ช้ากว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณของกลูโคสเท่ากับ 75 กรัมต่อลิตร และแลคเตต 42 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่ 34 กรัมต่อลิตร และ 22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีอัตราการใช้กลูโคสและการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่พีเอช 6.0 แต่ผลผลิตที่ได้สูงสุดเมื่อควบคุมพีเอช เท่ากับ 7.0

Himmi และคณะ (2000) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* spp. *Shermanii* พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด โดย *P. acidipropionici* มีความสามารถใส่สารตั้งต้นได้เร็วกว่า คือ 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดสูงกว่า คือ 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อมีการผลิตกรดอะซิติก ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตกรดโพรพิโอนิกในปริมาณเพิ่มขึ้น โดยปริมาณของกรดอะซิติกที่ได้จะมากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 2 เท่า ส่วนเชื้อ *P. freudenreichii* เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการใช้กลีเซอรอลกับการสร้างผลผลิต จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *P. acidipropionici*

Martinez-Campos และ Torre (2002) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ มีการเติมกลูโคสและแลคเตต ซึ่งกลูโคสและแลคเตตจะถูกใช้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การใช้กลูโคสและแลคเตตร่วมกันจะเพิ่มอัตราการผลิตโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) และยังเป็น การเพิ่มส่วนของธาตุคาร์บอนสำหรับที่จะนำไปใช้ในการผลิตชีวมวล ผลผลิตของโพรพิโอเนตต่ออะซิเตตเท่ากับ 7.6 เมื่อใช้แลคเตตและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์ อัตราส่วนโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต เท่ากับ 1.34 เมื่อใช้แลคเตตอย่างเดียว และ 1.85 เมื่อใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียว

Suwannakham และ Yang (2005) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 เปรียบเทียบระหว่างการใช้เซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงใน ถังหมักแบบ fibrous bed ให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 71.8 ± 0.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระถึงร้อยละ 20-59

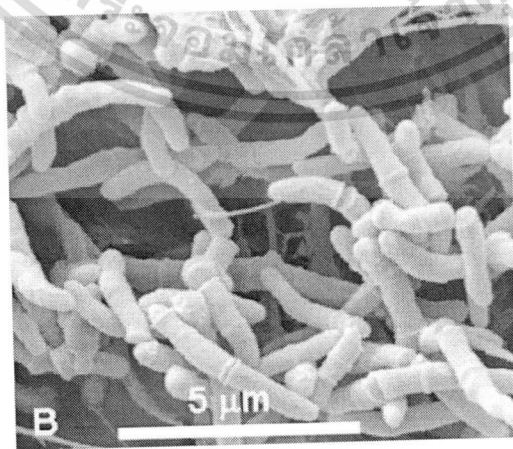
วรัญญา (2550) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ของเชื้อ *P. freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงในน้ำล้างซากไก่ พบว่ามีการผลิตกรดโพรพิโอนิกออกมานอกเซลล์ (1.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่าในเซลล์ (1.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ปริมาณกรดโพรพิโอนิกผลิตได้ในอาหาร complete medium น้ำล้างซากไก่ที่เติมธาตุอาหาร น้ำล้างซากไก่ที่รวมกับอาหาร complete medium ในปริมาณที่เท่ากัน และในน้ำล้างซากไก่ มีค่าเท่ากับ 1.89 1.52 1.47 และ 0.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

ฤทัยรัตน์ (2550) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากหางนมโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 พบว่าปริมาณหัวเชื้อไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือหัวเชื้อ *P. 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

1.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

แบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกจัดอยู่ในสกุล *Propionibacterium* เรียกว่าเป็น propionic acid bacteria (Quesada-Chanto,1994) พบครั้งแรกโดยแยกได้จากเนยสวิส ซึ่งในกระบวนการหมักจะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ทำให้เกิดลักษณะรูพรุนในเนือเนยแข็ง แบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ รูปร่างกลม ท่อนยาว อาจพบในลักษณะเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่ มีการเจริญแบบแฟคัลเททีฟแอนแอโรบ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิก ซักซินิก แอซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมัก เจริญเติบโตช้า แบคทีเรียประเภทนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมหรือกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นม มีจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ *Propionibacterium freudenreichii* *P. thoenii* *P. jensenii* *P. acidipropionici* *P. coccoides* และ *P. cyclohexanicum* ซึ่งกลุ่มนี้ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง การผลิตวิตามินบี 12 การผลิตกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สองคือ กลุ่มที่เจริญบนผิวหนังมนุษย์ หรือกลุ่มที่ทำให้เกิดสิว เช่น *P. acnes* ซึ่งไม่มีบทบาทในอุตสาหกรรมมากนัก (Lewis และYang,1992) ลักษณะของเชื้อ *P. acidipropionici* แสดงดังรูปที่ 1.3 และการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1.2



รูปที่ 1.3 ลักษณะของเชื้อ *P. acidipropionici*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำในเชิงพาณิชย์ด้านการค้า
ที่มา : <http://www.cns.fr/spip/IMG/jpg/image3.jpg> สืบค้นข้อมูลวันที่ 6 ตุลาคม 2553
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1.2 แสดงการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ

สปีชีส์	สายพันธุ์อ้างอิง	กรดโพรพิโอนิก (70 ชั่วโมง) กรัมต่อลิตร	พีเอช
<i>P. acidipropionici</i>	ATCC 4965	9.8	4.65
	CNRZ 287	7.5	4.67
	CNRZ 721	2.0	5.67
	CNRZ 733	0.0	4.40
<i>P. thoenii</i>	ATCC 4871	8.0	4.62
<i>P. jensenii</i>	ATCC 4870	0.0	5.82
	CNRZ 83	2.0	5.10
	ATCC 4867	0.0	5.10
	CNRZ 731	0.0	4.11
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>eudenreichii</i>	NCIB 5959	0.0	5.82
	CNRZ 89	3.1	5.03
	CNRZ 725	2.6	5.29
	CNRZ 726	3.0	5.36
	CNRZ 727	3.2	5.10
	CNRZ 728	3.2	5.24
	CNRZ 729	3.2	5.31
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	NCIB	3.7	5.15
	CNRZ	2.3	5.18
	CNRZ	4.5	4.73
	CNRZ	0.0	5.81
	SO-STANDA	6.0	4.51
	2908-STANDA	6.2	4.45
	2910-STANDA	1.92	5.67
	7916-STANDA	0.55	5.90
	PSI-BOLL	0.82	5.20

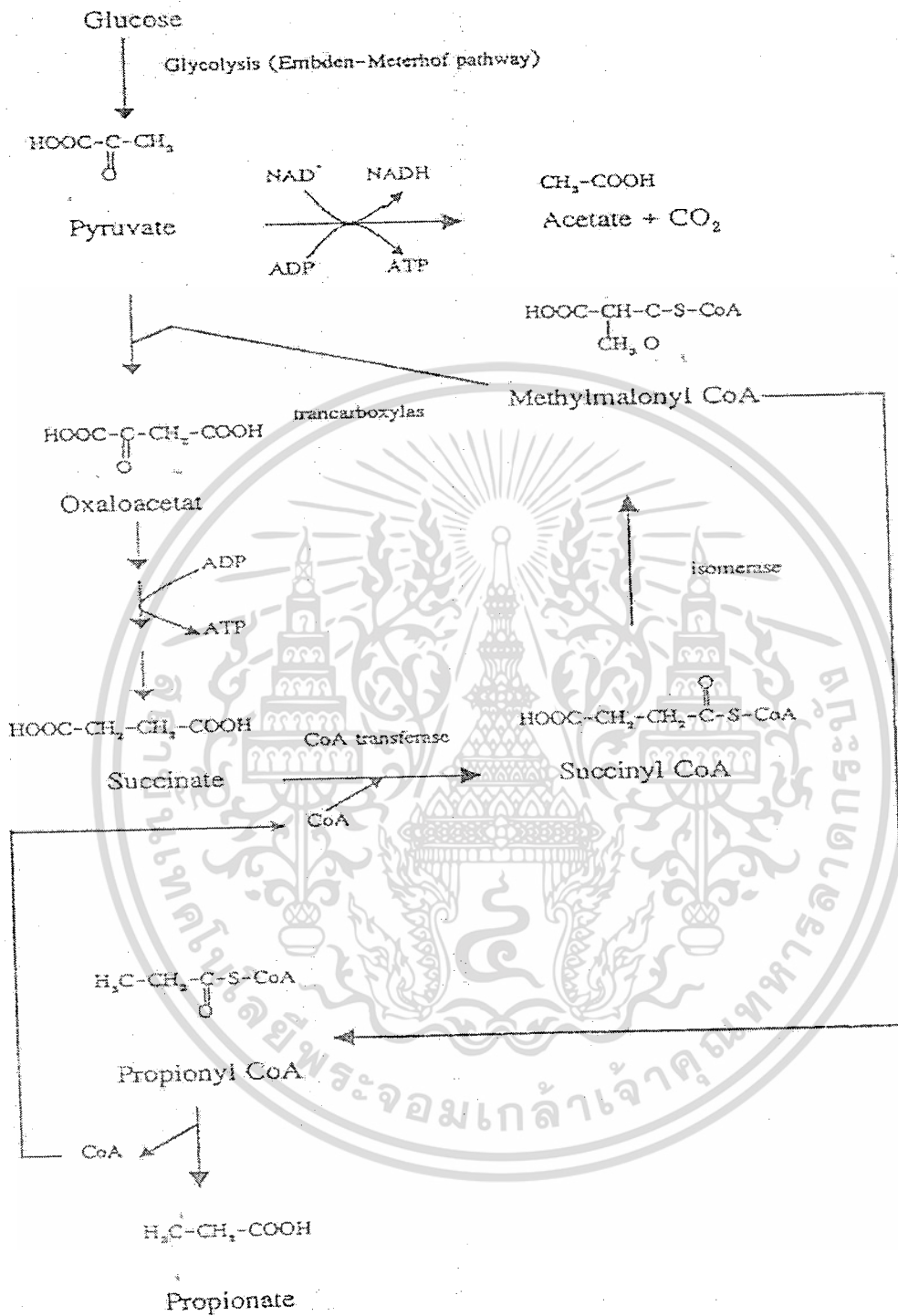
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ที่มา : Colomban และคณะ (1993)
 ไม่ว่าจะกรณใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 วิธีการเกิดกรดโพรพิโอนิก

การผลิตกรดโพรพิโอนิกเกิดขึ้นได้หลายวิธี ซึ่งคาร์บอนจากแหล่งต่างๆจะถูกใช้ในการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Propionibacterium* โดยเริ่มจากสารตัวกลางที่สำคัญคือ ไพรูเวท ออกซาโรอะซิเตต มาเลท ซักซิเนต และโพรพิโอเนต ตามลำดับ ที่ได้มาจากกลูโคส แสดงดังรูปที่ 1.4 (Daniel, 1995) หรือ แลคเตต แสดงดังรูปที่ 1.4 การสร้างซักซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ แสดงดังรูปที่ 1.5 โดยเริ่มต้นจากการสร้างออกซาโลอะซิเตตด้วยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้กับไพรูเวทหรือให้กับฟอสโฟอินอลไพรูเวท (PEP) และถูกรีดิทซ์ให้เป็นแอล-มาเลท (L-malate) โดยการทำงานของเอนไซม์มาลิกดีไฮโดรจิเนส (malic dehydrogenase) ซึ่งกรดมาลิกที่ได้จะถูกดึงน้ำออกโดยเอนไซม์ฟูมาเรส (fumarase) ทำให้ได้กรดฟูมาริก (fumaric acid) ปฏิกริยานี้ผันกลับได้ จากนั้นกรดฟูมาริกจะถูกเปลี่ยนให้เป็นซักซิเนตโดยเอนไซม์ฟูมาเรตรีดักซ์เตส (fumarate reductase) ซึ่งซักซิเนตจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในกระบวนการ โดยทำปฏิกริยากับเอนไซม์โคเอทรานเฟอเรส (CoA transferase) ได้ซักซินิลโคเอ (succinyl CoA) ปฏิกริยาต่อไปซักซินิลโคเอจะเปลี่ยนเป็นอาร์-เมทิล มาโลนิลโคเอ (R-methyl malonyl CoA) โดยเอนไซม์อาร์-เมทิล มาโลนิลมิวเตส (R-methyl malonylmutase) หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนอาร์-เมทิลมาโลนิลโคเอไปเป็นเอส-เมทิลมาโลนิลโคเอ (S-methyl malonyl CoA) ซึ่งคาร์บอนของเอส-เมทิลมาโลนิลโคเอจะถูกย้ายออกไปรวมกับไพรูเวท ทำให้เกิดการสร้างออกซาโลอะซิเตต เมื่อคาร์บอนเคลื่อนย้ายออกไปจะทำให้ได้โพรพิโอนิลโคเอ (propionyl CoA) จากนั้นโคเอ (CoA) จะถูกย้ายออกจากโมเลกุลเพื่อนำไปใช้กับซักซินิกตัวต่อไป ทำให้ได้กรดโพรพิโอนิกออกมาในที่สุด

วิธีอะครีเลต (Acrylate) ของการสร้างโพรพิโอเนต รายละเอียดของวิธีนี้แสดงดังรูปที่ 1.6 กรดโพรพิโอนิกจะถูกสร้างขึ้นตามลำดับ เริ่มต้นจากการเปลี่ยนรูปของแอล-แลคเตต (L-lactate) ไปเป็นแอล-แลคทิล โคเอ (L-lactyl CoA) โดยปฏิกริยาของเอนไซม์โคเอทรานเฟอเรส (CoA transferase) จากนั้นแอล-แลคทิล โคเอ จะเปลี่ยนรูปไปเป็น อะครีลิล โคเอ (Acrylyl CoA) โดยปฏิกริยาของเอนไซม์ดีไฮเดรเตส อะครีลิล โคเอ (dehydratase acrylyl CoA) และเปลี่ยนเป็นโพรพิโอนิลโคเอ โดยการถ่ายเทอิเล็กตรอนของฟลาโวโปรตีน (flavor protein) ซึ่งโพรพิโอนิลโคเอจะย้ายโมเลกุลโคเอไปให้แอล-แลคเตตเพื่อสร้างแอล-แลคทิล โคเอ และเกิดเป็นกรดโพรพิโอนิกอิสระ สำหรับการสร้างอะซิเตตและคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดควบคู่ไปกับการสร้างโพรพิโอเนต วิธีการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยเชื้อ *P. acidipropionici* แสดงดังรูปที่ 1.7 วิธีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการย่อยแป้งและเซลลูโลส แสดงดังรูปที่ 1.8

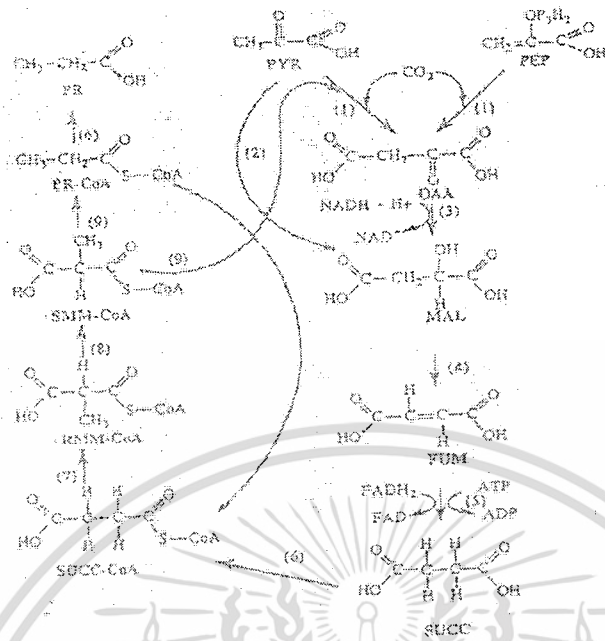
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.4 วิธีการเกิดกรดพร็อพิโอนิกจากการหมักกลูโคสโดยเชื้อ *Propionibacterium*

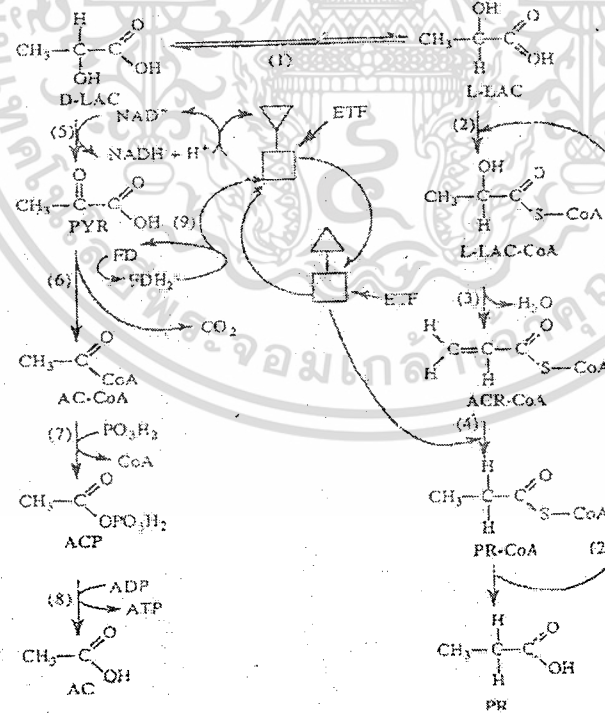
ที่มา : Daniel (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.5 การสร้างซัคซินเนตและไพรูเวตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

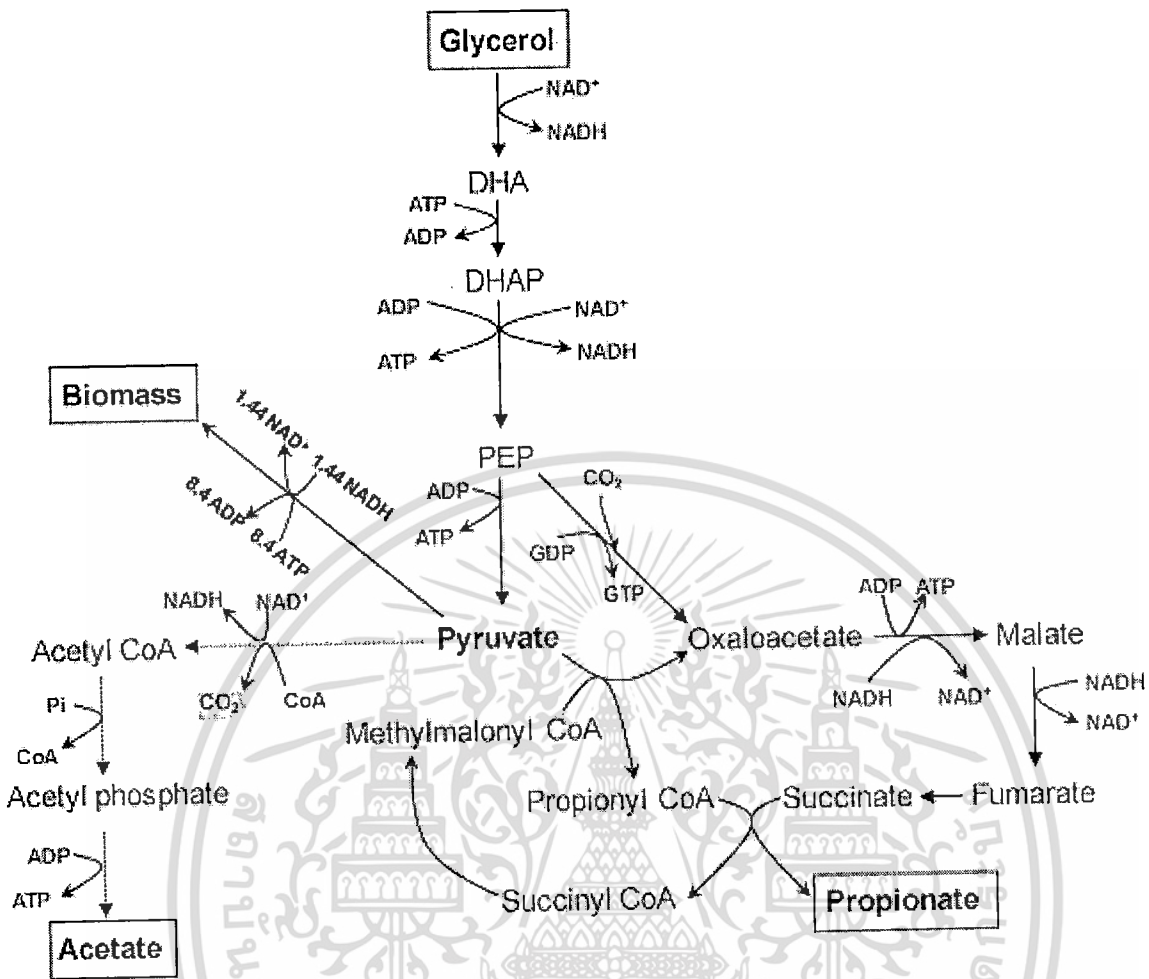
ที่มา : Daniel (1995)



รูปที่ 1.6 วิธีอะครีเลตของการสร้างไพรูเวต

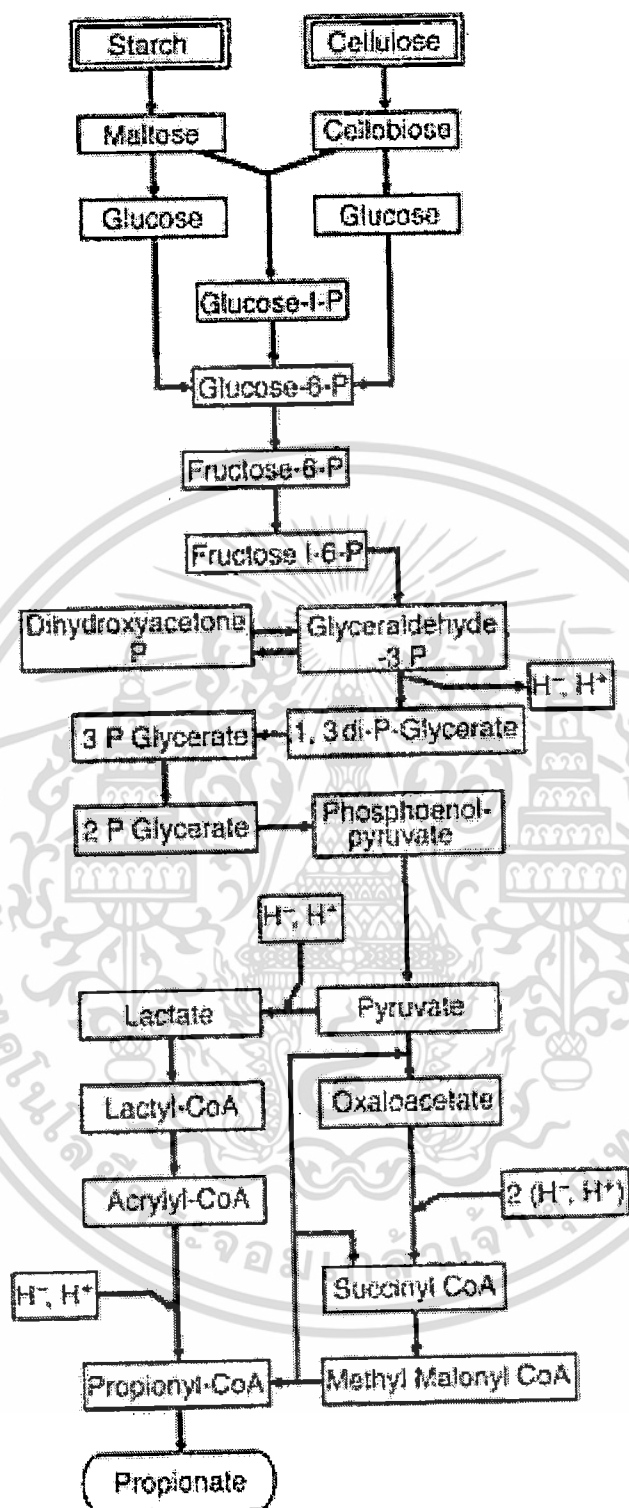
ที่มา : Daniel (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



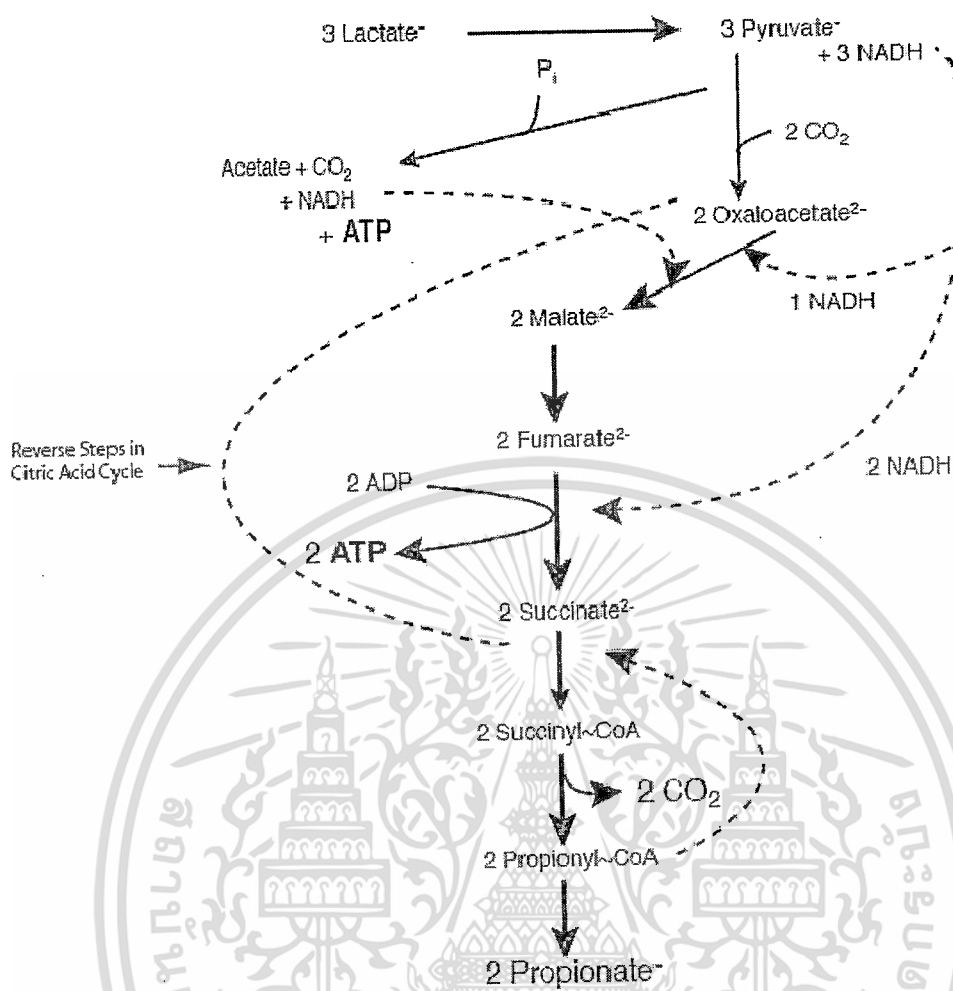
รูปที่ 1.7 วิธีการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยเชื้อ *P. acidipropionici*
 ที่มา : An Zhang และ Shang-Tian Yang (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.8 วิธีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการย่อยแป้งและเซลลูโลส
ที่มา : ดัดแปลงจาก J.P.F D'Mello (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.9 วิธีการเกิดพรพิโอนตจากแลกเตต

ที่มา: http://apropos.mcw.edu/kegg_pathways/show/106 สืบค้นข้อมูลวันที่ 6 ตุลาคม 2553

มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการเกิดกรดพรพิโอนิก ดังนี้

Barbirato และคณะ (1997) ศึกษาการหมักกรดพรพิโอนิกจากกลีเซอรอล พบว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงจากกลีเซอรอลไปเป็นกรดพรพิโอนิกเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยารีดักชันโดย ATP 2 โมล จะถูกใช้ไปเพื่อสังเคราะห์กรดพรพิโอนิก 1 โมล

Zhang และ Yang (2009) ศึกษาการหมักกรดพรพิโอนิกจากกลีเซอรอล พบว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงจากกลีเซอรอลไปเป็นกรดพรพิโอนิก เริ่มจากโมลของกลีเซอรอลเปลี่ยนเป็นไพรูเวท โดยสร้าง NADH 2 โมลจากนั้นผ่านวิธีการสังเคราะห์กรดพรพิโอนิก โดยจะมีการเปลี่ยน NADH เป็น NAD^+ และยังคงรักษาสสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพรพิโอนิกได้ 8.04 ± 1.04 กรัมต่อลิตร, *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ผลิตกรดแลกติกได้ 8.21 ± 0.73 กรัมต่อลิตร เป็นต้น

Zhang และ Yang (2009) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยใช้ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ที่มีการเปลี่ยนแปลงยีนส์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่กลายพันธุ์นี้สามารถใช้กลีเซอรอลสำหรับการเจริญเติบโตและผลได้ของการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเท่ากับ $0.54-0.71$ กรัมต่อกรัมและพบว่ามีค่ามากกว่าการใช้กลูโคส ประมาณ 0.35 กรัมต่อกรัม นอกจากนี้การผลิตกรดอะซิติกจากการหมักกลีเซอรอล พบว่ามีค่าน้อยกว่าการใช้กลูโคสมากดังนั้นการหมักโดยใช้กลีเซอรอลสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกที่มีความบริสุทธิ์สูงที่ซึ่งอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติกเท่ากับ 22.4 ของกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์ ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่สูงที่สุดที่ได้จากการหมักกลีเซอรอล คือ ประมาณ 106 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเป็น 2.5 เท่าของความเข้มข้นมากที่สุดของ การรายงานก่อนหน้านี้ (ประมาณ 42 กรัมต่อลิตร)

Jefferson และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้ กากน้ำตาล กลีเซอรอล หรือ แลคเตต ในการหมักแบบกะที่อุณหภูมิ 30 และ 36 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลายต่ำ ไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่า สามารถผลิตชีวมวลได้มากในกากน้ำตาลที่อุณหภูมิ 30 และ 36 องศาเซลเซียส เท่ากับ 7.55 และ 3.71 กรัมต่อลิตร และหลังจากการหมักชั่วโมงที่ 133 ที่มีการใช้กากน้ำตาลเป็นซับสเตรต ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.77 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 8.23 ± 0.12 กรัมต่อลิตร และผลได้เท่ากับ 0.455 ± 0.002 กรัมต่อกรัม การผลิตกรดโพรพิโอนิกและชีวมวลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสในทุกกรณี อัตราการผลิตที่ดีที่สุดคือการใช้แลคเตต มีค่า 0.113 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ถึงแม้ว่าผลได้ของการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ามากกว่า นั่นคือ 0.724 กรัมต่อกรัม เนื่องจากกระบวนการผลิตไม่มีกรดอะซิติก แต่ การใช้กากน้ำตาลและแลคเตตจะเกิดกรดอะซิติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ จึงต้องมีการทำให้ได้กรดโพรพิโอนิกบริสุทธิ์

1.6.2 แหล่งไนโตรเจน

พรวิสาข์ (2551) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อยับยั้งเชื้อราและยีสต์โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีหางนมเป็นส่วนประกอบหลักผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร *P. acidipropionici* ATCC 4965 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุดเท่ากับ 11.53 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง

Prescott และ Dunn (1959) พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีผลต่ออัตราการหมักและอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติก โดย *P. shermanii* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี สารสกัดยีสต์ เป็นต้น แต่สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

Yang และคณะ (1994) ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในเวย์ โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ ยีสต์สกัด และทริปทีเคสชอยบรอต พบว่าจะได้ปริมาณกรดสูงสุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดและทริปทีเคสชอยบรอตเติมลงไปในเวย์ปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

เมื่อใช้ปริมาณสูงเกินไปอาจส่งผลให้ต้นทุนสูงสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าตามลำดับ

เมื่อใช้ปริมาณต่ำเกินไป อาจทำให้ต้นทุนสูงเกินไป และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jefferson และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้ กากน้ำตาล กลีเซอรอล หรือ แลคเตต ในการหมักแบบกะ โดยใช้ยีสต์สกัด 5.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

1.6.3 แหล่งเกลือแร่

Quesada-Chanto และคณะ (1994) รายงานว่าเหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ *P. shermanii* โดยปริมาณ $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญ

1.6.4 แหล่งวิตามิน

Thompson (1943) ทำการศึกษาพบว่า กรดแพนโททินิกและไบโอติน เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของ *P. shermanii* และ *P. jensenii*

1.6.5 พีเอชของอาหาร

Lewis และ Yang (1992) ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่า เมื่อใช้แลคเตต เป็นสารที่ใช้ในการหมักซึ่งมีพีเอชเริ่มต้น 6.6 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอชเริ่มต้นที่ 6.0 และ 5.5

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ศึกษาผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด

Jefferson และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้ กากน้ำตาล กลีเซอรอล หรือ แลคเตต ในการหมักแบบกะ ปรับพีเอชเป็น 6.8 ถึง 7.0 พบว่าค่าพีเอช เริ่มต้น 6.87 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

Zhang และ Yang (2009) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยใช้ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ที่มีการเปลี่ยนแปลงยีนส์ ในการหมักแบบกะที่มีการตรึงเซลล์แบบ fibrous-bed แบบใช้เซลล์อิสระ และการหมักแบบกึ่งกะ พบว่า ที่พีเอชเริ่มต้น 7 เหมาะสมต่อการให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

1.6.6 อุณหภูมิ

Yang และคณะ (1994) ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 โดยใช้อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติจะไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติ

Hammi และคณะ (2000) รายงานว่าในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอล โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 255562 ในการหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการใช้ออกซิเจนเป็นเอกสารที่ส่งวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึบสเตรตสูงสุด 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Goswami และ Srivastava (1999) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 อยู่ที่ 30 ± 1 องศาเซลเซียส

Jefferson และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในการหมักแบบกะที่อุณหภูมิ 30 และ 36 องศาเซลเซียส พบว่า การผลิตกรดโพรพิโอนิกและชีวมวลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสของการศึกษาทุกกรณี

Zhang และ Yang (2009) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยใช้ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ที่มีการเปลี่ยนแปลงยีนส์ ในการหมักแบบกะที่มีการตรึงเซลล์แบบ fibrous-bed แบบใช้เซลล์อิสระ และการหมักแบบกึ่งกะ พบว่า ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

1.6.7 การให้อากาศ

Menon และ Shemin (1967) ศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. shermanii* ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ อัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกจะต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุดในสภาวะไม่มีอากาศเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศพบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตกรดอะซิติก และการผลิตวิตามินบี 12 จะเพิ่มมากขึ้น

1.7 กรุงเขมา

1.7.1 ลักษณะทั่วไปของกรุงเขมา

กรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) นอกนี้ยังมีชื่อเรียกในท้องถิ่นอื่น เช่น ขงเขมา พระพาย กรุงบาดาล ใบก้นบิต (ภาคกลาง), สี่พัน (เพชรบุรี), เครือหมาน้อย (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ), เปล้าเลือด (แม่ฮ่องสอน), อะกามินเยาะ (มลายู-นราธิวาส) กรุงเขมาเป็นไม้เถาที่เลื้อยไปตามต้นไม้อื่น ไม่มีมือเกาะ มีคุณสมบัติพิเศษคือเมื่อนำมาช้ำกับน้ำแล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เกิดลักษณะเป็นเจลหรือวุ้น เนื่องจากมีเพคตินเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก (สัมภาษณ์ คำผุย. 2533 ; เทียนศักดิ์ และคณะ. 2545 ; พิเชษฐ เทพบำรุง. 2546) การกระจายพันธุ์ในประเทศไทยพบว่าสามารถพบอยู่ทั่วไปแทบทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้พบว่าการกระจายพันธุ์ที่ประเทศอินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย แอฟริกา และอเมริกา สภาพที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ ริมแม่น้ำลำธาร ในป่าผลัดใบ ตั้งแต่ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พื้นที่ราบระดับน้ำทะเลจนถึงพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,100 เมตร (ราชบัณฑิตยสถาน. 2538 ; พิเศษฐ เทบ่ารุง. 2546 ; กษพรรณ วงค์เจริญ. 2548) มีอนุกรมวิธานดังนี้ (สัมภาษณ์ คำผุย. 2533)

Kingdom Plantae

Division Anthophyta

Class Dicotyledonae

Order Ranales

Family Menispermaceae

Genus Cissampelos

Species pareira



รูปที่ 1.7 กรุงเขมา

ที่มา : www.thaicattle.com/.../plant/kamoun.jpg

1.7.2 ลักษณะพฤกษศาสตร์

สัมภาษณ์ คำผุย (2533); กษพรรณ วงค์เจริญ (2548); Francis (2004); Anonymous (2004) ได้รายงานลักษณะของกรุงเขมาไว้ดังนี้

ราก เป็นรากที่มีลักษณะอวบใหญ่ สีน้ำตาล มีหน้าที่สะสมอาหาร

ใบ มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปกลม รูปหัวใจหรือรูปไต ก้านปิด ใบกว้าง 5.6-6.6 เซนติเมตร ยาว 6.9-7.6 เซนติเมตร ปลายแหลมหรือเป็นติ่งหนาม โคนมน ตัดหรือ เว้าเล็กน้อย หน้าใบและหลังใบมีขนสีน้ำตาลยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ปกคลุมหนาแน่น หลังใบมีขนปกคลุมหนาแน่นมากกว่าหน้าใบ ก้านใบมีขน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก้านใบยาวประมาณ 1.7-2.5 เซนติเมตร เมื่อยังอ่อนมีขนอ่อนนุ่มหนาแน่นทั้ง 2 ด้าน และตามขอบใบ แต่จะร่วงไปเมื่อใบแก่

ดอก มีขนาดเล็กแยกเพศเป็นดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ต่างต้น มีสีเขียวยอม เหลืองหรือเหลืองอ่อน ดอกเพศผู้ออกเป็นช่อกระจุกที่ง่ามใบ ช่อดอกยาวประมาณ 2-8.5 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยง กลีบดอก 4 กลีบ โคนติดกันเป็นรูปถ้วย ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยง ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของกลีบเลี้ยงเกสรเพศ ผู้มีดเดี่ยวยาวกว่ากลีบเลี้ยง อับเรณูติดกันเป็นรูปจาน ดอกเพศเมียออกเป็นช่อที่ง่ามใบ ช่อดอกยาวประมาณ 10-18 เซนติเมตร ก้านดอกสั้นมาก ใบประดับรูปกลม หรือรูปไข่ ซ้อนเหลื่อมกันแน่นไม่ร่วง ปลายเป็นติ่งหนาม มีขน กลีบเลี้ยง 1 กลีบ รูปขอบขนานแกมรูปไข่ กลีบดอก 1 กลีบ ออกตรงข้ามกับกลีบเลี้ยง และสั้นกว่า

ผล ผลสดเป็นแบบ drupe ค่อนข้างกลม เมื่อสุกจะมีสีแดง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.2 เซนติเมตร มีขน

เมล็ด เป็นเมล็ดเดี่ยว เล็ก แข็ง รูปโค้ง หรือเป็นรูปเกือบกลม ผิวขรุขระ

1.7.3 การใช้ประโยชน์จากกรงขเมา

สรรพคุณของกรงขเมาในตำรายาไทยมีมากมาย เนื่องจากทุกส่วนของกรงขเมาสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคและช่วยบำรุงร่างกาย ได้แก่

ราก สรรพคุณในการแก้ไข้ แก้ดีริ้ว ดีช่าน เป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงอวัยวะเพศให้แข็งแรง แก้ลม โลหิตกำเดา แก้โรคตา ขับปัสสาวะ แก้อาการบวมน้ำ แก้ทางเดินปัสสาวะอักเสบกระเพาะปัสสาวะอักเสบ แก้กระหายน้ำ แก้ไข้ใน แก้ปวดท้อง แก้โรคฝีดาษ บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย เป็นยาระบาย แก้ท้องร่วง ในรากมีสารสำคัญ พวกอัลคาลอยด์ในปริมาณสูง (พะยอม ต้นตีวัฒน์. 2521; วุฒิ ธรรมเวช. 2540)

เถา สรรพคุณในการดับพิษไข้ทุกชนิด บำรุงโลหิตสตรีให้สมบูรณ์ แก่ระดูพิการ

ใบ สรรพคุณในการใช้ทาแก้โรคผิวหนัง แก้หิด รักษางูกัด พอกแผล ฝี แก่ร้อนใน ใบจะมีสารพวกเพคติน (พะยอม ต้นตีวัฒน์. 2521 ; ชยันต์ และคณะ. 2542)

นอกจากนี้มีการนำใบกรงขเมามาบริโภค โดยนำใบที่เจริญเต็มที่มาช้กับน้ำสะอาด กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวชั้น แล้วปล่อยให้เจลหรือที่เรียกว่า วุ้น หนาน้อยจึงนำมารับประทาน (จิรศักดิ์ ศรีสมศักดิ์ และ ธนากร อัมปะเททา. 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.7.4 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการสกัดเพคตินจากใบกรุงเขมา

ศิริวรรณ และคณะ (2532) ได้ศึกษาวิธีการสกัดสารเพคตินจากใบหমান้อย และใบบัวโคก โดยวิธีการต้มสกัดกับน้ำโดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักสดต่อน้ำ 1: 80 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที พบว่าสารเพคตินที่สกัดได้จากใบสดและใบแห้งได้ปริมาณไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบเป็นน้ำหนักแห้ง โดยใบหมาน้อยและใบบัวโคกได้ปริมาณสารเพคตินร้อยละ 27.80 และ 9.13 ตามลำดับ

สัมภาษณ์ คำผุย (2533) ศึกษาการสกัดสารเพคตินจากใบหมาน้อย พบว่าปริมาณสารเพคตินที่สกัดได้จากใบสดและใบแห้งของต้นหมาน้อยมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยได้ปริมาณสารเพคติน 2.576 กรัมต่อใบหมาน้อย 10 กรัม

เทียนศักดิ์ และคณะ (2545) โดยศึกษาวิเคราะห์ปริมาณสารเพคตินจากใบหมาน้อยด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี โดยปริมาณสารเพคตินที่วิเคราะห์ได้ปริมาณเฉลี่ย 0.25 กรัม ต่อน้ำหนักใบหมาน้อย 1 กรัม

พิเชษฐ เทบ่ารุง (2546) ศึกษาหาปริมาณและคุณภาพของเพคตินจากใบหมาน้อย ทำการสกัดแบบร้อนด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล และสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.1 สภาวะที่ใช้การสกัดคืออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที พบว่าการใช้สารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.1 ทำให้ได้ปริมาณเพคตินมากที่สุดเนื่องจากเป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพโดยจะไปไฮโดรไลส์โปรตีนให้เป็นเพคตินที่ละลายน้ำได้ และพบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่นได้เพคตินมีคุณภาพมากที่สุดโดยคุณภาพของเพคตินวัดจากปริมาณเมทิลเอสเทอร์ และกรดกาแลคทูโรนิกในเพคติน และพบว่าเพคตินที่สกัดจากใบหมาน้อยเป็นเพคตินชนิดที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำ

จิราภรณ์ สังข์ผุด (2549) ศึกษาการผลิตเพคตินผงจากกรุงเขมาด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่นและกรดซิตริกร้อยละ 7 ใช้อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย 1:40 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพคตินประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ สกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ฟอกสีด้วยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 0.2 ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 จากนั้นอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณเพคตินเท่ากับร้อยละ 21.65 ± 0.18 และ 48.48 ± 0.35 (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับพบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่น มีปริมาณกรดกาแลคทูโรนิกสูงสุด (ร้อยละ 76.45 ± 0.13) มีปริมาณเมทอกซิลร้อยละ 8.08 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำ

น้ำทิพย์ นาเชียงใต้ และยุภา ทศบุตร (2550) ศึกษาผลของ พีเอช และอุณหภูมิต่อคุณภาพของเพคตินที่สกัดได้จากใบหมาน้อย พีเอชและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ พีเอช 2 4 6 อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสได้ปริมาณเพคตินมากกว่าที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพบว่าการสกัดที่ พีเอช 2 มีปริมาณเถ้าที่น้อยที่สุดส่งผลให้เพคตินที่สกัดได้มีการละลายน้ำได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งงานไว้สำหรับการเรียนการสอนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่น ๆ
 เอกสารฉบับนี้จัดทำขึ้นโดยอัตโนมัติจากโปรแกรมจัดการเอกสารของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
 ไม่สามารถแก้ไขหรือลบออกได้ หากต้องการแก้ไข กรุณาติดต่อฝ่ายวิชาการ โทร. 0-2327-8000

ลักษณะอ่อนนุ่ม แต่การสกัดที่ พีเอช 2 จะเกิดเจลได้ช้าแต่เจลมีความแข็งแรงกว่า ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีของ เพคติน

Jittra (2005) ศึกษาการสกัดเพคตินและลักษณะทางกายภาพของเพคตินจากเครือหมาน้อย สกัดด้วยน้ำกลั่นใช้อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย 1 : 40 อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส พีเอช ธรรมชาติ (3.8-4.0) พบว่าเพคตินที่สกัดจากเครือหมาน้อยเป็นชนิดที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำ และมีกรดกาแลกทูโลนิกเป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 70-75)

1.8 เวย์ (whey)

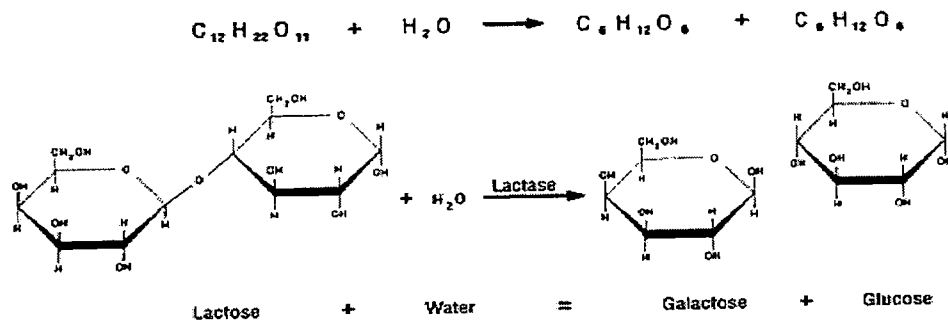
เวย์เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการผลิตเนยแข็งหรือการแยกเคซีนจากนมสด เวย์มีลักษณะเป็นของเหลวใสมีสีค่อนข้างขาวอมเหลือง (Marshall, 1982) องค์ประกอบของเวย์โดยทั่วไปพบว่าประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตสร้อยละ 4-5 โปรตีนร้อยละ 1 และเกลือแร่ร้อยละ 1 (Roukas และคณะ, 1998)

1.8.1 ประเภทของเวย์ เวย์แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามความเป็นกรด (Titable acidity) ได้แก่

1.8.1.1 สวีทเวย์ (Sweet whey) เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการบวนการผลิตเนยแข็งชนิดแข็ง เช่น เชดดา (Cheddar cheese) เกาดา (Gouda cheese) สวิส (Swiss cheese) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.10-0.20 และมีค่าพีเอชระหว่าง 5.8-6.1

1.8.1.2 แอซิดเวย์ (Acid whey) เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการตกตะกอนนม โดยการเติมกรดหรือเกลือแร่ลงไปโดยตรงในการผลิตเนยแข็งชนิดอ่อน เช่น คอทเทจ (Cottage) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.40-0.60 และมีค่าพีเอชระหว่าง 4.0-5.0 (Kosikowski, 1977) สรุปลักษณะที่แตกต่างของเวย์ทั้งสองชนิดดังตารางที่ 1.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.8 แสดงสูตรโครงสร้างของน้ำตาลแลคโตสที่ถูกไฮโดรไลซ์

ที่มา : <http://www.indiana.edu/~ensiweb/lessons/tp.2.gif>

1.8.2.2 โปรตีน โปรตีนในเวย์เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนในน้ำนมซึ่งเป็นโปรตีนตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง โปรตีนในเวย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ เบตาแลคโตโกลบูลิน (β -lactoglobulin) และแอลฟาแลคทอลบูมิน (α -lactalbumin) โดยเบตาแลคโตโกลบูลินจะมีอยู่ประมาณร้อยละ 50 – 60 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือเจือจางสามารถตกตะกอนได้ด้วยเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตและเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในแง่การให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลว (วรรณมา ตั้งเจริญชัย, 2532) ส่วนแอลฟาแลคทอลบูมิน มีอยู่ประมาณร้อยละ 15-20 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนได้เมื่อถูกความร้อน ส่วนที่เหลือ คือ ซีรัมอัลบูมิน อิมมูโนโกลบูลิน เอนไซม์ต่างๆ และโปรตีนอื่นๆ

1.8.3 การใช้ประโยชน์จากเวย์

ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง พบว่าจะมีน้ำเวย์ซึ่งเป็นผลพลอยจากการผลิตนั้นเป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปเวย์จะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง ถ้าเปรียบเทียบค่า BOD ระหว่างน้ำเสียที่ปล่อยลงแม่น้ำลำคลองควรบำบัดน้ำจมนมีค่า BOD เหลือประมาณ 20 แต่เวย์มีค่า BOD อยู่ระหว่าง 4000-4800 ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Scott, 1986) ดังนั้นการนำน้ำเวย์ที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งมาใช้ประโยชน์จึงน่าจะเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มคุณค่าให้กับน้ำเวย์และลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียได้ ดังนั้นนักวิจัยจึงได้ศึกษาหาทางนำเวย์มาใช้ประโยชน์มีรายงานดังนี้

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาการนำเวย์มาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. delbrueckii* โดยเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 36 และยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร พบว่ากรดแลคติกที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างได้คือ 40 กรัมต่อลิตร ภายใน 84 ชั่วโมง

Bogdanova (1974) ได้ศึกษาการนำเวย์มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโดยการนำเวย์มาพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 95-97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหมนเหียงเอาเฉพาะส่วนใสมาเติมหัวเชื้อ *L. acidophilus* และเติมเชื้อยีสต์ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 30–33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง

Fitzpatrick และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *L. casei* โดยเติมยีสต์ สกัด มอลต์ และถั่ว เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *L. casei* พบว่าสามารถ เปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 94.37) ให้เป็นกรดแลคติก (32.95 กรัมต่อลิตร)

1.9 อุปกรณ์และวิธีการ

1.9.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท PYREX^R

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX^R

คิวเวต (cuvette)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท SHIMADZU รุ่น C-R7 Ae plus

เครื่องปั่นเหียง (centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องเขย่าของ บริษัท Gallenkamp

เครื่องอบร้อนของ บริษัท Binder

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -83 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO รุ่น MDF-U 4086S

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตู้ปมเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkampตู้เขี่ยเชื้อ (lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

โถดูดความชื้น

ปีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท PYREX^R

ปิเปตต์ (pipette) ของบริษัท PYREX^R

ปั๊ม Peristaltic pump ของบริษัท Heidolph รุ่น PD 5201

สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.89 เซนติเมตร ของบริษัท Cole-Parmer Instrument Company รุ่น Tygon tubing 2-stop

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^R

1.9.2 สารเคมี

แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3)

แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

เปปโตน (peptone)

แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

แลคโตส (lactose)

ยีสต์สกัด (yeast extract)

โซเดียมแอลจิเนต (sodium alginate) ของบริษัท Carlo Erba^R

เพคตินจากส้ม(citrus pectin)ของบริษัท Sigma^R

เพคตินจากแอปเปิ้ล (apples pectin)ของบริษัท Fluka^R

เพคตินจากบริษัท Himedia^R

1.10 วัตถุดิบ

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

1.10.1 การเก็บวัตถุดิบ

เวย์ที่ใช้ในงานวิจัยจะเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส โดยนำมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งานต่อไป

1.10.2 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ ประยุกต์จาก Kassler (1981)

นำเวย์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการแยกโปรตีนออกจากเวย์ ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกไขมันโดยกรองด้วยกระดาษกรองGlass fiber (GC-50) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จะได้น้ำเวย์ที่พร้อมใช้ในการทดลอง

1.11 การสกัดเพคตินจากใบกรูงเขมา (ประยุกต์จาก พิเชษฐ เทพบำรุง. 2546)

ใบกรูงเขมาที่ใช้ในงานวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขต สกลนคร 199 หมู่ 3 ถ.พังโคน-วาริชภูมิ อ.พังโคน จ.สกลนคร 47160

1.11.1 การเตรียมตัวอย่างใบกรูงเขมา

นำใบกรูงเขมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (blender) แล้วชั่ง 10 กรัม นำมาเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองเอาสารละลายทิ้งไป นำใบหมาน้อยที่ได้จากการกรองมาเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาใบหมาน้อยแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสให้แห้งสนิท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.11.2 ขั้นตอนการสกัดเพคตินจากไบหมาน้อย

นำไบหมาน้อยที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้ว ชั่ง 5 กรัม ใส่ปิกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร นำไปสกัดเพคตินแบบร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นกรองแยกเอากากของไบหมาน้อยออกขณะร้อน แล้วนำสารละลายที่ได้จากการกรอง มาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum evaporator) ให้เหลือ 1 ใน 3 ส่วนของสารละลาย จากนั้นนำมาตกตะกอนเพคตินโดยเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนของสารละลายเพคตินต่อสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 1:2 โดยปริมาตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง กรองแยกเอาตะกอนเพคติน แล้วล้างตะกอนเพคตินด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 4-5 ครั้ง หลังจากนั้นอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บดเป็นผงร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh ซึ่งน้ำหนักของเพคตินที่ได้แล้วนำไปคำนวณหาร้อยละของปริมาณเพคติน

1.12 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1.12.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแล้วลาก (streak) ลงบนอาหารแข็ง MRS แล้วนำไปป่มในตู้ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Youssef และคณะ. 2000) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

1.12.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง

เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Ha และคณะ. 2003) เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Senthuran และคณะ. 1999) (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) จากนั้นดูเซลล์แขวนลอยลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ปริมาตรร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหาร (ปริมาตรแปรผันตามการทดลอง) นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นเติมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีตะกอนเซลล์ เขย่าให้เข้ากันจนเกิดสารแขวนลอยเซลล์ จะได้เชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์อิสระหรือสำหรับเซลล์ตรึง

1.13 อาหารสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก

นำเวย์ที่เป็นของเหลวที่เตรียมได้จากข้อ 1.10.2 มาเติมด้วยสารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ทริปติเคสชอยบรอต 0.25 กรัมต่อลิตร โดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร และ แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ปรับพีเอชให้ได้ $6.5 (\pm 0.1)$ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

อาหารที่ใช้ในอาหารหมักในระดับฟลาสก์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตร (ร้อยละ 70) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และอาหารที่ใช้ในอาหารหมักในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตร 1400 มิลลิลิตร (Nancib และคณะ. 2000) จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.14 การตรึงเซลล์

1.14.1 การตรึงเซลล์ด้วยเพคติน

การตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา เตรียมเพคตินให้อยู่ในรูปโพแทสเซียมเพคเตต โดยทำปฏิกิริยา de-esterification ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับหัวเชื้อเริ่มต้น จากนั้นหยดสารผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ผ่านปั๊ม (peristaltic pump) โดยใช้สายยางซิลิโคน นำเม็ดเจลบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างแคลเซียมไอออนที่มากเกินไปและตัวเซลล์ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้ม จะได้เม็ดเจลเซลล์ตรึงที่ได้ไปใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

1.15 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาเพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

- ศึกษาความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ร้อยละ 3, 4 และ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- ศึกษาปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ร้อยละ 3, 5 และ 7 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
- ศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสายยาง 0.89, 1.52 และ 2.02 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาเพาะเลี้ยงในอาหารหางนมปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะตั้งนิ่ง (Dembczynski และ Jankowski, 2002) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นเวลา 432 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างตามข้อ 1.16

1.16 การวิเคราะห์

นำน้ำหมักมาวิเคราะห์ปริมาณกรดโพธิ์ฟิโอนิก น้ำตาลแลคโตสที่เหลือ และวัดค่าพีเอช โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดโพธิ์ฟิโอนิกด้วยเครื่อง HPLC (high-performance liquid chromatography) ใช้คอลัมน์ Inertsil C8-3 เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.7 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (Deionize water) และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (ประยุกต์จากฎานี สัตะนันท์, 2541) และวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสที่เหลือด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก ตามวิธีของ Dubois, 1956

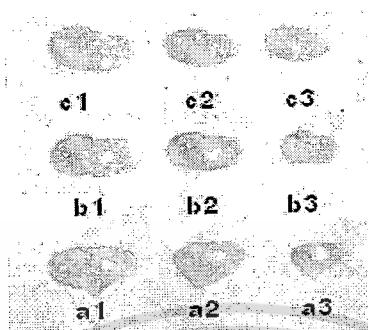
1.17 ผลการทดลอง

1.17.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา

เมื่อตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ร้อยละ 3, 4 และ 5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสายยาง 0.89, 1.52 และ 2.02 มิลลิเมตร และปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3, 5 และ 7 จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาหมักในอาหารหางนมปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะตั้งนิ่ง เป็นเวลา 432 ชั่วโมง เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวัดปริมาณกรดโพธิ์ฟิโอนิก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 คือ ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ เพคตินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสายยาง 1.52 มิลลิเมตร และพบว่าเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 สามารถผลิตกรดโพธิ์ฟิโอนิกได้เท่ากับ 18.5 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 336 ชั่วโมง ดังตารางที่ 1.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 3, 4 และ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าเมื่อใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาความเข้มข้นร้อยละ 3 เม็ดเจลมีลักษณะเป็นรูปหยดน้ำ (รูปที่ 1.9) และเกิดการแตกได้ง่าย เนื่องจากมีการพอร์มเจลของแคลเซียมเพคเตตเจลที่ไม่สมบูรณ์ มีผลทำให้เซลล์สามารถรั่วไหลออกจากเม็ดเจลได้ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมามากกว่าร้อยละ 4 พบว่าเม็ดเจลมีลักษณะเป็นทรงกลม (รูปที่ 1.9) และมีความแข็งแรงขึ้น แต่พบปัญหาเรื่องความสามารถในการแพร่และการกระจายตัวของเซลล์เกิดขึ้น ทำให้เซลล์ภายในเม็ดเจลได้รับอาหารไม่เพียงพอ เนื่องจากการแพร่ผ่านของอาหารเป็นไปได้อย่าง จึงทำให้ความสามารถในการผลิตกรดโพธิ์ฟิโอนิกลดลง และพบว่าการใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นร้อยละ 4 สามารถผลิตกรดโพธิ์โอนิกได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ และเม็ดเจลมีความคงตัวไม่เปลี่ยนรูปในระหว่างการทดลอง ดังนั้นจึงเหมาะสมต่อการนำมาตรึงเซลล์



รูปที่ 1.9 แสดงผลการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาที่ความเข้มข้นต่างๆ (a_1 - a_3 = 3%, b_1 - b_3 = 4% และ c_1 - c_3 = 5%) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง ที่ขนาดต่างๆ (a_1 , b_1 , c_1 = 2.02 มม., a_2 , b_2 , c_2 = 1.52 มม. และ a_3 , b_3 , c_3 = 0.89 มม.)

สำหรับผลการศึกษาปริมาณของเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3, 5 และ 7 (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อการเพิ่มการผลิตกรด และ เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นจนถึงร้อยละ 5 สามารถผลิตกรดโพธิ์โอนิกได้สูงสุด อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากกว่าร้อยละ 5 ไม่ส่งผลให้การผลิตกรดโพธิ์โอนิกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากข้อจำกัด (substrate limitation) เนื่องจากเซลล์ภายในเม็ดเจลเกิดการแย่งอาหารเพื่อนำไปใช้สำหรับการเจริญและการผลิตกรดโพธิ์โอนิก

สำหรับผลการศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 0.89, 1.52 และ 2.02 มิลลิเมตร ซึ่งขนาดของสายยางมีผลต่อขนาดของเม็ดเจล พบว่าการใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 2.02 มิลลิเมตร ทำให้เกิดเม็ดเจลขนาดใหญ่ (รูปที่ 1.9) ไม่ส่งผลให้การผลิตกรดโพธิ์โอนิกเพิ่มมากขึ้น แต่ในขณะที่การใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยางที่มีขนาดเล็กทำให้เกิดเม็ดเจลขนาดเล็ก (รูปที่ 1.9) ทำให้เม็ดเจลมีพื้นที่ผิวมากขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลของสารอาหารสามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้เร็วกว่าเม็ดเจลที่มีขนาดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

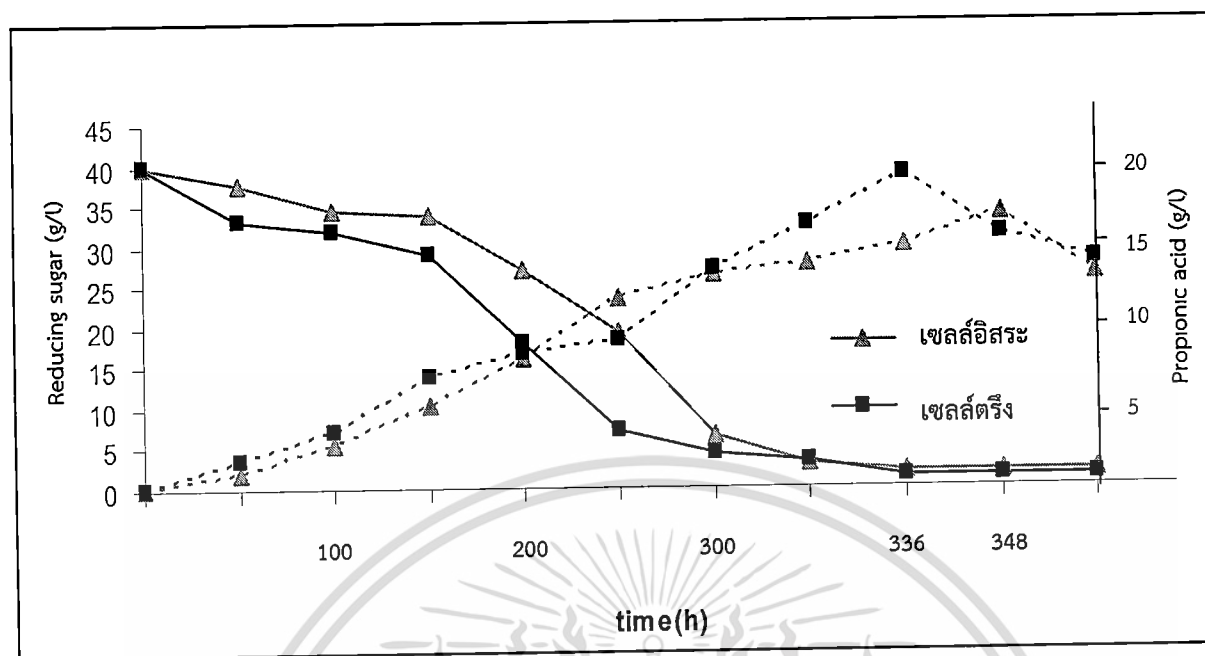
Table 1.4 Effect of pectin concentration, innerdiameter of silicone tube and inoculum for immobilization on propionic acid production by immobilized *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

Pectin concentration (%) (A)	Innoculum (%) (B)	Innerdiameter of silicone tube (mm) (C)		
		0.89 (c ₁)	1.52 (c ₂)	2.02 (c ₃)
3 (a ₁)	3 (b ₁)	13.04 ^{jk}	13.61 ^k	12.09 ^l
	5 (b ₂)	14.58 ^e	14.82 ^f	13.60 ^g
	7 (b ₃)	15.97 ^{bc}	15.10 ^{cd}	14.41 ^e
4 (a ₂)	3 (b ₁)	14.56 ^g	14.78 ^g	13.07 ^{ji}
	5 (b ₂)	17.86 ^a	18.50 ^a	16.23 ^d
	7 (b ₃)	17.94 ^a	16.76 ^b	15.92 ^{bc}
5 (a ₃)	3 (b ₁)	13.4 ^h	13.69 ^{hi}	12.17 ^k
	5 (b ₂)	14.04 ^{cd}	14.73 ^d	13.70 ^f
	7 (b ₃)	14.32 ^d	14.62 ^e	13.99 ^e

Value with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาการผลิตกรดไพรูวิกกับเซลล์อิสระของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารหางนม ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนี้ ระยะเวลาในการหมัก 432 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าเซลล์อิสระสามารถผลิตกรดไพรูวิกได้เท่ากับ 16.88 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 348 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 1.10 การที่เซลล์อิสระสามารถผลิตกรดไพรูวิกได้น้อยกว่าเซลล์ตรึง เนื่องจากเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น การผลิตกรดไพรูวิกจะมีความเข้มข้นมากขึ้นด้วย ส่งผลให้กรดไพรูวิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (product inhibition) ทำให้ความสามารถของเชื้อในรูปเซลล์อิสระสามารถผลิตกรดไพรูวิกได้น้อยลง แต่ในขณะที่เซลล์ตรึงมีสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงมาเป็นวัสดุตรึงที่ช่วยปกป้องตัวเซลล์จากน้ำหมัก อีกทั้งสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมายังมีคุณสมบัติทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้ดี จึงส่งผลให้สามารถกรดไพรูวิกได้เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

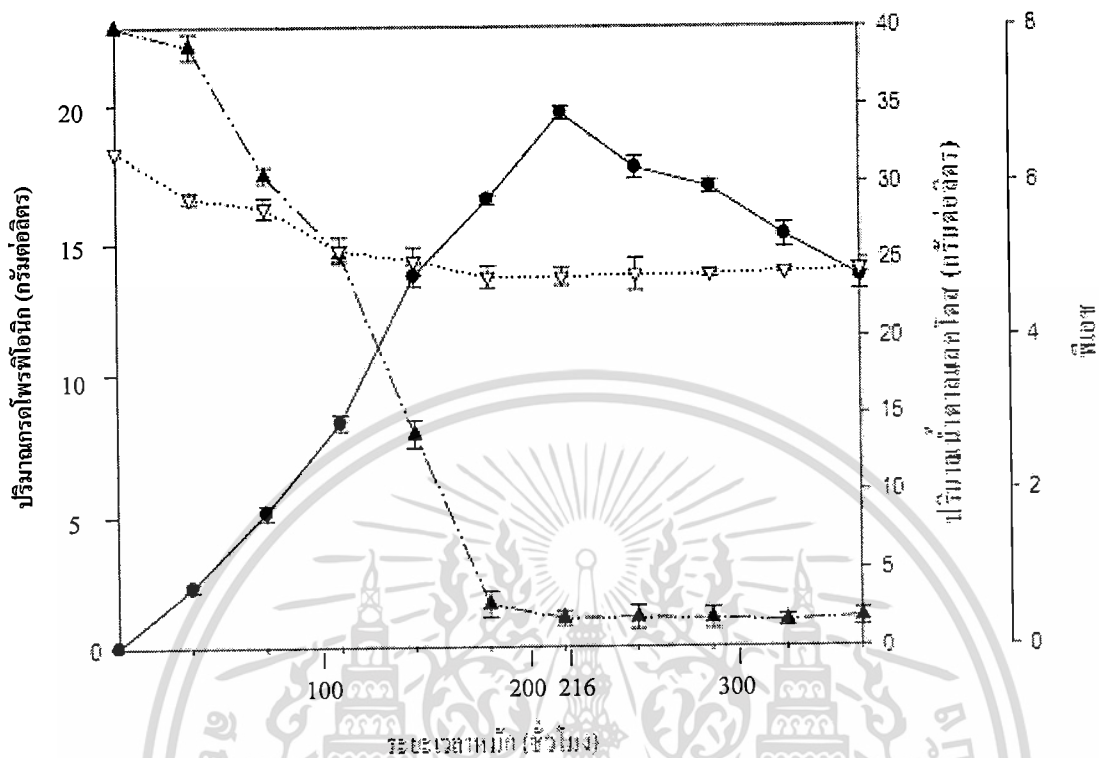


รูปที่ 1.10 แสดงปริมาณกรดไพรูวิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง ในอาหารหางนม ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

1.17.2 ศึกษาศักยภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารพอลิเมอร์จากใบกรุงเขมาโดยการนำกลับมาใช้ใหม่ (cell recycle) เพื่อผลิตกรดไพรูวิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อทำการศึกษาการผลิตกรดไพรูวิกจากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดพอลิเมอร์จากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เมื่อใช้สภาวะดังกล่าวในการผลิตกรดไพรูวิกในถังหมัก พบว่าสามารถผลิตกรดไพรูวิกได้ 20.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระซึ่งสามารถผลิตกรดไพรูวิกได้ 19.24 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เช่นกัน และเมื่อศึกษาการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ พบว่าสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้ 5 รอบการหมัก

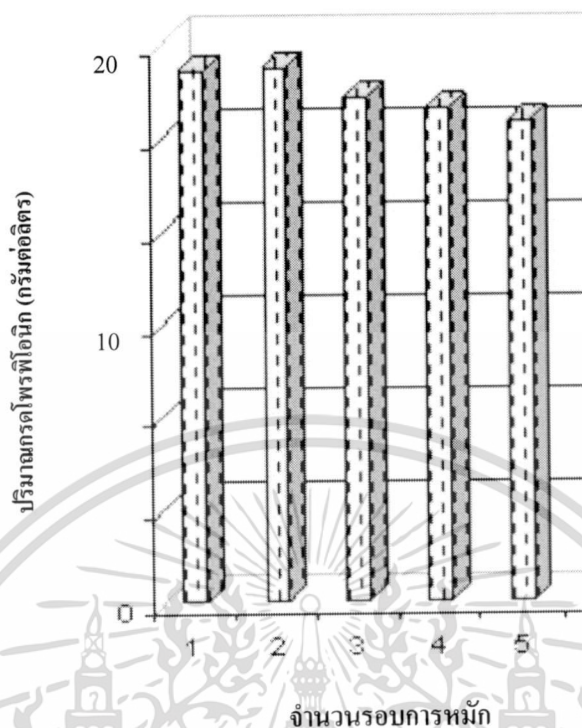
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.11 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที

ผลการศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที (เนื่องจากที่เวลา 216 ชั่วโมงของการหมักน้ำตาลแลคโตสมีการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดโพรพิโอนิกตกเพิ่มขึ้นสูงสุด หลังจกนั้นการผลิตกรดโพรพิโอนิกจะค่อยๆ ลดลง และปริมาณน้ำตาลแลคโตสเหลือน้อยมากจนเกือบหมด) หลังจากทุกๆ รอบการหมักที่ 216 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเวทย์ที่ใช้ในการหมัก และทำซ้ำโดยใช้อาหารเวทย์ใหม่หลังจากล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ พบว่าสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุด 20.5 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.595 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ 0.552 กรัมต่อกรัม แสดงดังรูปที่ 1.11 จากผลการทดลองพบว่าสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 5 รอบการหมัก แสดงดังรูป 1.12 และตารางที่ 1.5 แต่เมื่อสิ้นสุดการหมักรอบที่ 5 เม็ดเจลมีการแตกและละลายตัวเกือบทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถหมักรอบต่อไปได้อีก และเมื่อพิจารณาการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกลดลงเรื่อยๆ เมื่อจำนวนรอบในการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากเซลล์อาจเกิดการเสื่อมสภาพ (cell degeneration) เซลล์อ่อนแอ (inactivated cells) และความเสื่อมสภาพของเม็ดเจล ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดโพรพิโอนิกลดลง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.12 แสดงจำนวนรอบของการหมักกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ

ตารางที่ 1.5 แสดงจำนวนรอบของการหมักกรดโพรพิโอนิก อัตราการผลิต และผลได้ของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึง ด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ

จำนวนรอบการหมัก	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อลิตร)
1	20.50	0.593	0.543
2	20.50	0.595	0.552
3	19.05	0.451	0.509
4	18.87	0.434	0.489
5	18.43	0.419	0.473

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.18 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบ เพคตินจากใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์และการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ คือ ใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.52 มิลลิเมตร โดยใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 4 และใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่า *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 20.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระซึ่งสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 19.24 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เช่นกัน และเมื่อศึกษานำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ พบว่าสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้ 5 รอบการหมัก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กขพรรณ วงศ์เจริญ. 2548. “การศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณสารเพคติน และสารอัลคาลอยด์ใน
กรงเขมา (*Cissampelos pareira* L.)” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- จิรศักดิ์ ศรีสมศักดิ์ และธนากร อัมมะเทา. 2543. “การหาปริมาณเพคตินจากใบหมาน้อย.” ปัญหา พิเศษ
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- จิราภรณ์ สังข์สุด. 2549. “การผลิตและคุณสมบัติของเพคตินผงที่สกัดจากกรงเขมา.” วิทยานิพนธ์วิทยา
ศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร (วิทยาศาสตร์การอาหาร) มหาวิทยาลัย วลัยลักษณ์ .
- ชยันต์ พิเชียรสุนทร, แม้นมาส ขวลิต และวิเชียร จีรวงส์. 2542. คำอธิบายตำราพระโอสถพระนารายณ์.
กรุงเทพฯ : อมรินทร์.
- ญานี ลีตะนันท์. 2541. “การสกัดและการทำกรดแลกติกให้บริสุทธิ์จากน้ำหมัก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ
ทหารลาดกระบัง.
- ณรงค์ ศิริรัมย์. 2546. “ การสกัดและการหาลักษณะเฉพาะของเพคตินที่ได้จากกากฝรั่ง.วิทยานิพนธ์วิทยา
ศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ติยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์. 2549. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ
Lactococcus lactis IO-1โดยวิธีTaguchi.” ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- เทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอกาส, วรรณภา กัญจนมยุร และปิ่นเนตร ศรีธาราธิคุณ. 2545. การวิเคราะห์ ปริมาณ
เพคตินในใบหมาน้อยด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- น้ำทิพย์ นาเชียงใต้ และยุวภา ทศบุตร. 2550. “ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อคุณภาพของเพคตินที่ สกัดได้
จากใบหมาน้อย.” ปริญญาวิทยาศาสตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะทรัพยากรธรรมชาติและ
อุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร.
- พยอม ตันติวัฒน์. 2521. สมุนไพร. กรุงเทพฯ : สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย.
- พิเชษฐ เทบารุง. 2546. “การหาปริมาณเพคตินและคุณภาพของเพคตินจากใบหมาน้อย.” วิทยานิพนธ์
เอกปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- พิพัฒน์ ไทรทอง. 2548. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอสตาแซนทิน.” ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- มาริษา ไชยโอสถ. 2549. “การสกัดเพกตินจากของเหลือทิ้งของขนุน.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา.
- มัทธิยา จงนิตยกาล. 2545. “การบำบัดน้ำทิ้งขั้นต้นของโรงงานนมด้วยแบคทีเรียแลคติก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ราชบัณฑิตยสถาน. 2538. อนุกรมวิธานพืช อักษร ก. กรุงเทพฯ : เพื่อนพิมพ์.
- วรรณมา ตั้งเจริญชัย. 2532. เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการนมและผลิตภัณฑ์นม. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- วุฒิ ธรรมเวช. 2540. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ: รวมสาส์น (1977) จำกัด.
- ศิริประภา มั่นตรง. 2550. “การเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยการใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนต.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ศิริวรรณ ศรีสรฉัตร สมใจ ศรีโภาค และเทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอภาส. 2533. รายงานการวิจัย การศึกษาแนวทางการสกัดเพกตินจากใบหมาน้อยและใบบัวโคก. มหาสารคาม : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒมหาสารคาม.
- สมใจ ศิริโภาค. 2544. จุลชีวอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.
- สัมภาษณ์ คำผุย. 2533. “การสกัดเพกตินจากใบหมาน้อย.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2544. เทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตร- ศาสตร์.
- อาทิตย์ ธานี. 2548. “การผลิตกรดแลคติกจากกลูโคส ไฮโลส และสารสกัดจากขานอ้อยโดย *Lactococcus lactis* IO-1.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- An Zhang, Shang-Tian Yang.(2009) “Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*” , **journal of Biochemistry**. G Model PRBI-8706; Article in press ,No of Pages 6.
- Arasaratnam, V. Senthuran, A. and Balasubramaniam, K. 1996. “Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*.” **Enzyme and Microbial Technology**. 19 : 482-486.
- Barbirato,F.,Chedaille,D. and Bories, A.1997. “Propionic acid fermentation from glycerol : comparison with conventional substrates”. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 47:441-446.
- Bogdanova, G.J. 1974. New whole products of improve quality (in Russian). Moscow : Pishcevaya Promishlenost.
- Bunchanan, R.L. and Ayres, J.C. 1976. “Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999” . **Journal of Food Protection**. 49 : 128 – 132.
- Chen man, Y.B.,L. S. Wei and A.L. Nelson. 1988. **Inactivation of lipoxygenase in Whole Soybean by pH Adjustment**. Food Science and Technology in Industrial development V.1 Proceeding of Food Conference.
- 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.
- Daniel, R.1995. Microbial Physiology and Metabolism. Wm.C. Brown Communication,Inc.
- Filya,i. sucu, e. and karabulut, a.2004. “The effect of *Propionibacterium acidipropionici* , with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages”. **Journal of Applied Microbiology**. Volume 97, Number 4, October 2004 , pp. 818-826 (9)
- Fitzpatrick, J.J., Murphy, C., Mota, F.M. and Pauli, T. 2003. “Impurity and cost considerations for nutrient supplementation of whey permeate fermentations to produce lactic acid for biodegradable plastics.” **International Dairy Journal**. 13 : 575 – 580.
- Goswami, V. and Srivastava, A.K. 2000. “Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*” . **Journal Biochemical Engineering**. 4 : 121-128.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา 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* spp. *shermanii* ". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 53 : 435 – 440.
- J.P.F. D'Mello.2000. **Farm Animal Metabolism and Nutrition** .Biotechnology Department, The Scottish Agricultural College,Edinburgh,UK :P. 438.
- Jefferson,C. Susan, Luciana, José, Ashok and Carlos. 2008. Batch Fermentation Model of Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* in Different Carbon Sources. **Journal of Applied Biochem Biotechnology** , 151:333–341
- Liu, KeShun. 1997. **Soybean: chemistry, technology, and utilization**. New York: Chapman & Hall: 25-94.
- Lewis, V. and Yang, S. 1992. "propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* : effect of growth substrate".**Applied Microbiology and Biotechnology**. 37 : 437-442.
- Moss,M.O, and J.E. Smith. **Industrial Application of Microbiology**. London :Surrey university Press, 1977, 105-149
- Martinez-Campos, R. and Torre, M. 2002. "Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose" . **Biotechnology Letters**. 24 : 427-431.
- Olbrich, H. Die Melasse. Berlin : Institut fur Garungsgewerbe, 1956
- 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.
- Panesar P. S., Kennedy J. F., Knill C. J. and Kosseva. M. R. 2007. "Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L(+) lactic acid production from whey." **Applied Microbiology Biotechnology**. 74 : 35–42.
- Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. **Industrial Microbiology**. 3th ed. Mc Graw Hill Co, Inc., New York. P. 50.
- Quesada-Chanto, A., Afschar, A.S. and Wagner, F. 1994. "Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose" . **Applied Microbiology and Biotechnology**. 42 : 16-21.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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.
- Racker, M.O., Bern, C.J., Johnson, L.A. and Glatz, B.A. 1992. "Preservative of high moisture Maize by various propionate treatments". **Cereal Chemists**. 69 : 66 – 69.
- Ramsay , J.A., Hassan,M.C. and Ramsay,B.A. 1998. "Biological conversion of hemicelluloses to propionic acid". **Enzyme and Microbial Technology**. 22 : 292 – 295.
- 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.
- Schuppert ,B., Schink ,B. and Trosch, W.1992. "Batch and continuous production of propionic acid from whey permeate by *Propionibacterium acidipropionici* in a three-electrode amperometric culture system". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 37:549-553.
- Tyree, R.W., Clausen, E.C. and Gaddy, J.L. 1991. "The production of propionic acid from sugars by fermentation through lactic acid as an intermediate". **Journal of Chemists Technology and Biotechnology**. 50 : 157-166.
- Tomoaki K., Kazuhiro ,T. Masahito, H. Eri, N. Hiroyosh, D. Takaaki, T. Masayuki, T.2008. "Production of Extracellular Bifidogenic Growth Stimulator (BGS) from *Propionibacterium shermanii* Using a Bioreactor System with a Microfiltration Module and an On-line Controller for Lactic Acid Concentration". **Journal of Bioscience and bioengineering** Vol. 105, No. 3, 184–191.
- Vandegraft, E.E., Hesseltine, C.W. and Shotwell, O.L. 1975. "Grain preservative : Effect on Aflatoxin and ochratoxin production". **Cereal Chemists**. 52 : 79-84.
- Vandana Goswami , A.K. Srivastava . (2000) "Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*." **Biochemical Engineering Journal** 4 Pages 121-128.
- Woskow, S.A. and Glatz, B.A. 1991. "Propionic acid production by a propionic acid-tolerant of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation". **Applied Environment Microbiology**. 57 : 281-288.
- White, J. 1954 **Yeast Technology**. London : Chapman and Hall.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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