สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

PRODUCTION OF PROPIONIC ACID FROM WHEY BY BATCH FERMENTATION OF *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

TO74431T

สุรนารถ อร่ามเรือง

SURANART ARAMRUANG

วพ.
ส๙๖ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....74431.....
วัน,เดือน,ปี.....28 ก.ย. 2550.....

b.....1180385x.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF PROPIONIC ACID FROM WHEY BY BATCH FERMENTATION OF *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

SURANART ARAMRUANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATS STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965
นักศึกษา	นาย สุรนารถ อร่ามเรือง
รหัสประจำตัว	470639010
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2550
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 พบว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุ 3 ตัว ได้แก่ ไดโพแทสเซียสไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวย์เป็นตัวทำละลาย ทำการหมักด้วยถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชที่ 6.5 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณ 15.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 200 ได้ค่าผลผลิตกรดโพรพิโอนิก และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.39 และ 0.077 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ทดสอบการยับยั้งเชื้อราเปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายด้วยวิธีทางเคมีพบว่า กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยวิธีทางชีวภาพมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้เช่นเดียวกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Production of Propionic Acid from Whey by Batch Fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965
Student	Mr. Suranart Aramruang
Student ID	47063910
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2007
Thesis Advisor	Associate Professor Sukjai Choojun

ABSTRACT

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถประสบความสำเร็จได้เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. สุขใจ ชูจันทร์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่ามาให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เป็นประโยชน์ระหว่างการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร พนา โลหะทรัพย์ทวี รศ.ดร พรรณี ฐิตาพิชิต และ ผศ. ลินจง สุขลำภู ที่กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่ามาให้ความรู้คำปรึกษา

ขอขอบพระคุณ บริษัท Minor Cheese Limited ที่อนุเคราะห์เวย์ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นำมาใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา และเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีตลอดจนการอำนวยความสะดวกต่างๆระหว่างทำงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อทำเรื่องการขอใช้ห้องปฏิบัติการนอกเวลาราชการ ตลอดจนการอำนวยความสะดวกต่างๆระหว่างทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ นางสาว ฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ(พี่เดียร์) และเพื่อนๆนักศึกษาทุกคน ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจให้ตลอดมา ทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนย์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุรนารถ อร่ามเรือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VII

สารบัญรูป VIII

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร

2.1 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก 3

2.2 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของกรดโพรพิโอนิก 5

2.3 อันตรายของกรดโพรพิโอนิก 7

2.4 เวย์ 7

2.5 การใช้ประโยชน์จากเวย์ 10

2.6 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก 14

2.7 แบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิก 17

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก 19

2.9 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก 24

2.10 การทำให้บริสุทธิ์ 26

2.11การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ*Propionibacterium*สายพันธุ์ต่างๆ 28

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ 30

3.2 สารเคมี 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.3 วัตถุดิบ 31

3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย 31

3.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ 32

3.6 การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก 33

3.7 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับฟลาสก์เปรียบเทียบกับการผลิตในถังหมักขนาด 2ลิตร 35

3.8 การสกัดกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ 36

3.9 การศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยวิธี Agar diffusion method 36

3.10 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ 36

บทที่ 4 ผลการทดลองแล้ววิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ 37

4.2 ผลการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก 40

4.3 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับฟลาสก์เปรียบเทียบกับการผลิตในถังหมักขนาด 2ลิตร 48

4.4 ผลประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยวิธี Agar diffusion method 51

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 53

บรรณานุกรม 54

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 61

ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ 63

ภาคผนวก ค ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ 73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

ประวัติผู้เขียน 84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราที่พีเอชต่างๆ 4

2.2 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก 6

2.3 องค์ประกอบโดยประมาณของสวีทเวย์และแอซิดเวย์ 8

2.4 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในนม เคซีน และเวย์ 10

2.5 องค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์ 11

2.6 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ 29

4.1 แสดงปริมาณกรดที่ผลิตได้จากอาหาร 13 สูตร โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* 37

4.2 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ ที่ชั่วโมง 210 เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เหมาะสม 40

4.3 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ ที่ชั่วโมง 210 เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เหมาะสม 43

4.4 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้และปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ ชั่วโมงที่ 566 เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม 46

4.5 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ผลผลิต อัตราการผลิต และ ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและถังหมักขนาด 2 ลิตร 48

4.6 แสดงค่า P-value ของการเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้ถังหมักและฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้ วิธี T-test 49

4.7 แสดงค่า p-valueของการเปรียบเทียบระหว่างกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าและกรดที่ผลิตได้ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยวิธี T- test ในการยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิด 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 กรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิก 3

2.2 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก 5

2.3 สูตรโครงสร้างของน้ำตาลแลคโตสที่ถูกไฮโดรไลส์ 9

2.4 แสดงขั้นตอนการผลิต และการใช้ประโยชน์ของ Whey permeate 11

2.5 ความเป็นไปได้ที่จะนำเวย์มาใช้ประโยชน์ 13

2.6 เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* 18

2.7 การการทดสอบการย้อมติดสีของเชื้อเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* 18

2.8 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสและแลคเตต โดยเชื้อ *Propionibacterium* 24

2.9 การสร้าง ซัคซิเนต และ โพรพิโอเนต โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ 25

2.10 วิถีอะคริเลตของการสร้างโพรพิโอเนต 26

2.11 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก 27

4.1 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 13 สูตร เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 38

4.2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 13 สูตร เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 39

4.3 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 41

4.4 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือในการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 42

4.5 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.6 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 44

4.7 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 45

4.8 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 45

4.9 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)ที่เหมาะสมเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 566 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 47

4.10 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 556 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง 47

4.11 แสดงปริมาณกรดที่ผลิตได้ ในการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร 49

4.12 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือในการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร 50

4.13 แสดงผลของกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ด้วยวิธีชีวภาพในการยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดด้วยวิธี agar diffusion method 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ผลิตภัณฑ์อาหารเช่นอาหารสัตว์ ผลิตภัณฑ์เบเกอรีส่วนใหญ่จะเกิดการเน่าเสียเนื่องจากเชื้อราเป็นจำนวนมากในทุกๆปี การใช้สารเคมีในการยับยั้งเชื้อราเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย แต่ในปัจจุบันมีข้อเรียกร้องจากผู้บริโภคในการใช้สารช่วยในการเก็บรักษาอาหารจากธรรมชาติมากขึ้นจึงเป็นเหตุให้เกิดความสนใจในแบคทีเรียจากธรรมชาติมายับยั้งเชื้อราและยีสต์ ซึ่งล่าสุดมีรายงานว่าเชื้อ *Propionibacterium* สามารถป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อราและยีสต์ได้ โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะสร้างกรดโพรพิโอนิกซึ่งมีผลในการยับยั้งเชื้อราได้เป็นพิเศษ

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งขบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตเพื่อการค้านิยมผลิตโดยกระบวนการทางเคมีเนื่องจากได้ผลผลิตสูงตามความต้องการและมีระยะเวลาในการผลิตเร็วกว่ากระบวนการทางชีวภาพแต่กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้มีกระบวนการยุ่งยากเพราะมีสารก่อให้เกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อมในช่วงการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการผลิตทางชีวภาพเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีความเป็นพิษและสามารถใช้กับอุตสาหกรรมประเภทอาหารได้ ค่าใช้จ่ายในการผลิตไม่สูงนัก การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยกระบวนการทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium*

การผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพมีข้อจำกัดเป็นผลมาจากการผลิตกรดโพรพิโอนิก จากกระบวนการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่น้อย เช่น การหมักแบบกะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียงร้อยละ 1-3 ซึ่งใช้เวลาในการหมัก 7-14 วัน(Schuppert และคณะ. 1992) จึงได้มีการคิดหาวิธีเพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีต่างๆ เช่น การใช้การตรึงเซลล์(Yang และคณะ. 1994 ; Suwannakham และ Yang. 2005) การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะ(Martinez-Campos และ Torre. 2002) การใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่องและการคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโพรพิโอนิก(Quesada-Chanto และคณะ. 1994)

เวย์เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็งในการผลิตเนยแข็งจะมีเวย์เป็นผลิตผลพลอยได้ถึงร้อยละ 85-90 ของน้ำนมที่ใช้ในการผลิต โดยทั่วไปเวย์จะมีปริมาณมีค่า BOD ที่สูงอยู่ในช่วง 4,000 – 4,800 เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งที่สามารถปล่อยสู่แม่น้ำลำคลองได้ซึ่งมีค่า BOD อยู่ที่ 20 ถือว่าเป็นปริมาณที่สูงมากและเป็นอันตรายที่ค่อนข้างสูง ปัจจุบันนิยมนำเวย์มาใช้ประโยชน์ เช่น นำเวย์ไปผลิตเป็นเวย์ผง เวย์เข้มข้น และเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ มากกว่าที่จะเสียค่าบำบัดน้ำเสีย ซึ่งการทดลองนี้เป็นอีกแนวทางในการใช้เวย์ให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1ศึกษาการใช้เวย์เป็นซับสเตรต ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

1.2.2ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

1.2.3ศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายเป็นการค้าในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์และทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ได้แก่ การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอนเนตที่ใช้เป็นสารปรับสภาพ pH ที่เหมาะสม ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับฟลาสก์เปรียบเทียบกับในถังหมักขนาด 2 ลิตร วิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของเซลล์ กรดโพรพิโอนิกที่ได้ น้ำตาลแลคโตสที่ใช้ จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายเป็นการค้าโดยวิธีการวิเคราะห์ agar diffusion method

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีทางชีวภาพซึ่งเป็นที่ยอมรับในเรื่องความปลอดภัย มากกว่าการผลิตทางเคมี

1.4.2ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

1.4.3ทราบถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราของกรดโพรพิโอนิก

1.4.4เป็นการเพิ่มมูลค่าของเวย์ที่เป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งมาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

1.4.5 เป็นการลดต้นทุนในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิกเป็นกรดไขมันสายสั้นๆอยู่ในกลุ่มของ Aliphatic monocarboxylic acid กรดโพรพิโอนิกสามารถพบได้ตามธรรมชาติในอาหารประเภทหมักดอง ในเหงื่อของคน Swiss cheese และในกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง กรดโพรพิโอนิกสามารถละลายได้ดีในน้ำ เอทานอล และอีเทอร์ ส่วนเกลือโพรพิโอเนทสามารถละลายน้ำได้ร้อยละ 30 แต่ไม่ละลายในไขมัน (Lind และคณะ. 2005)

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่(Himmi และคณะ. 2000) และอาหารสัตว์(Schuppert. 1992) และนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการการทำพลาสติกในรูปของ cellulose propionate (Barbirato และคณะ. 1997) ในอุตสาหกรรมน้ำหอมในรูปของ ethyl propionate ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวทำละลาย (Czaczyk และคณะ. 1995) นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Lind และคณะ . 2005) และเป็นสารที่ช่วยเพิ่มกลิ่นรสของอาหาร(Yang และคณะ. 1994)

การใช้ในอาหารนิยมใช้ในรูปของเกลือมากกว่ากรดโดยจะอยู่ในรูปของเกลือแคลเซียม โซเดียม และโปแทสเซียม โดยเกลือโซเดียมจะละลายได้ดีกว่าเกลือแคลเซียม ดังรูปที่ 2.1

CH_3-CH_2-COOH	CH_3-CH_2-COONa	$(CH_3$-CH_2-$COO)_2Ca$
กรดโพรพิโอนิก	โซเดียมโพรพิโอเนต	แคลเซียมโพรพิโอเนต

รูปที่ 2.1 กรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิก

ที่มา : ศิวาพร ศิวเวช (2546)

มีการใช้กรดโพรพิโอนิกและเกลือแคลเซียมหรือโซเดียมโพรพิโอเนตในรูปสารกันบูดเพื่อใช้ในการถนอมอาหารประเภทขนมปัง เค้ก และเนยแข็งชนิดต่างๆ โดยใช้ป้องกันการเจริญของรา และการเกิดเมือกหรือยางเหนียวในโด (dough) หรือแป้งขนมปังที่ผ่านการนวดแล้ว นอกจากนี้ยังใช้เกลือโพรพิโอเนตในการควบคุมการเจริญของเชื้อราใน เนยสด แยม เยลลี่ ผัก และผลไม้ได้ดีอีกด้วย โดยพบว่ากรดโพรพิโอนิกจะไปยับยั้งเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยเข้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปแข่งขันกับอะลานิน(alanine) และกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์(Braner และคณะ. 1990) สารประกอบนี้ให้ผลในการป้องกันได้ดีในอาหารที่เป็นกรดต่ำ เนื่องจากโมเลกุลของกรดและเกลือไม่ค่อยแตกตัว พีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของโพรพิโอนิกอยู่ในช่วง 3-5 โดยกรดโพรพิโอนิกจะมีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ 3.4 ถึง 4.5 โดยที่พีเอช 4 มีโมเลกุลของกรดและเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 88 ในขณะที่พีเอช 6 จะมีโมเลกุลที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 6.7 กรดที่ไม่แตกตัวทำให้มีผลยับยั้งการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ ซึ่งสารประกอบของกรดโพรพิโอนิกหรือเกลือของกรดนี้ให้ผลในการป้องกันได้ดีในอาหารที่เป็น pH ต่ำ ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่น้อยที่สุดในการยับยั้งเชื้อราที่ระดับพีเอชต่างๆแสดงดัง ตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราที่พีเอชระดับต่างๆ

เชื้อจุลินทรีย์	pH3	pH5	pH7	pH9
Chactomonium globosum	0.04%	0.04%	-	-
Alternaria solani	0.04%	0.06%	-	-
Penicillium citrinum	0.04%	0.08%	-	-
Aspergillus niger	0.08%	0.08%	-	-

หมายเหตุ – ไม่มีการยับยั้ง

ที่มา : ศิวาพร ศิวเวช (2546)

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้กรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิกในอาหารชนิดต่างๆมีรายงานดังต่อไปนี้

ประวัติ ตันบุญเอก และคณะ (2525) รายงานว่า การใช้กรดโพรพิโอนิกปริมาณร้อยละ 1.5 ในเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 26 เป็นการป้องกันเชื้อราไม่ให้เจริญเติบโตในระยะเวลา 1 เดือนและตรวจไม่พบอะฟลาทอกซินเลย และได้ทดลองใช้สารผสมระหว่างกรดโพรพิโอนิกกับแอมโมเนียมบิสโพรพิโอเนต ในอัตราส่วน 8 ต่อ 2 พบว่าที่ระดับของสารผสม 6 ลิตรต่อเมล็ดข้าวโพด 1 ตัน สามารถควบคุมการสร้างอะฟลาทอกซินได้ตลอดระยะการทดลอง 12 สัปดาห์

กุลยา จันทร์อรุณ (2533) รายงานว่าการใช้แคลเซียมโพรพิโอเนต และโซเดียมโพรพิโอเนต ปริมาณร้อยละ 0.2 ถึง 0.4 ตามลำดับกับขนมปัง จะสามารถป้องกันเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเมือกได้ การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของโซเดียมโพรพิโอเนตจะให้ผลที่ พีเอช 3.5 ถึง 4.5 ดีกว่าที่ พีเอชสูง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vandegraft และคณะ (1975) ได้ทำการทดลองใช้กรดโพรพิโอนิกร้อยละ 0.1 เติมลงในเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 28 พบว่าตลอดการทดลอง 29 สัปดาห์ ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* กับ *Aspergillus ochraceus* และสารอะฟลาทอกซิน B_1 กับสารโอคร่าทอกซินเลย

Buchanan และ Ayres (1976) รายงานว่าการใช้กรดโพรพิโอนิก 0.1 กรัมต่อ 100 มิลลิกรัมของอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* และสร้างอะฟลาทอกซินได้บางส่วน แต่ถ้าเพิ่มเป็น 0.2 กรัมจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และอะฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ ในระยะเวลา 7 วัน

2.2 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของกรดโพรพิโอนิก

ชื่อสามัญ : กรดโพรพิโอนิก (propionic acid)

กรดโพรพิโอนิกยังสามารถเรียกได้อีกหลายชื่อดังนี้

: กรดเมธิลอะซิติก (methylacetic acid)

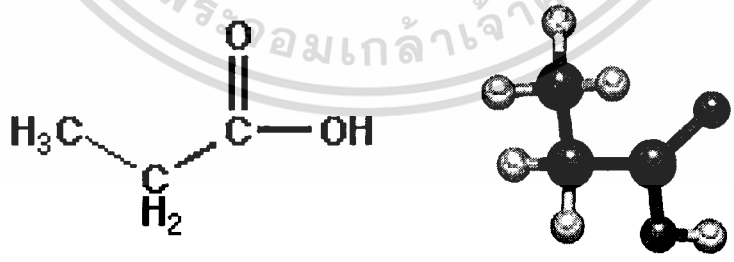
: กรดโพรเพนโนอิก (propanoic acid)

: กรดคาร์บอกซีอีเทน (carboxyethane)

: กรดอีเทนคาร์บอกซีลิก (ethanecarboxylic acid)

: กรดซูโดอะซิติก (pseudoacetic acid

กรดโพรพิโอนิกมีสูตรทางเคมีคือ $C_3H_6O_2$ มีสูตรโครงสร้างแสดงดังรูป 2.2 และคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิกแสดงดังตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างทางโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก

ที่มา : www.firehouse.com/mz/images/2003/9/12_organic3.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2.2 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ	กรดโพรพิโอนิก
น้ำหนักโมเลกุล	74.08
Conversion factor	1 พีพีเอ็มเท่ากับ 3.02 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เมตร 1 มิลลิกรัม/ลูกบาศ์กเมตรเท่ากับ0.33 พีพีเอ็ม ที่ 25 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	(-20)ถึง (-22) องศาเซลเซียส
จุดเดือด	141.1 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น	0.992 - 0.994
การละลายน้ำ	สามารถละลายน้ำได้
ค่าพีเอช	2.9
การละลายในสารละลาย	สามารถละลายได้ใน เอทธานอล ไดเอธิล อีเทอร์และคลอโรฟอร์ม
ความดันบรรยากาศ	2.55
ความดันไอ	0.32 ถึง 0.4 กิโลปาสคาล
อัตราการระเหย	ไม่ระเหย
อุณหภูมิวิกฤต	339 องศาเซลเซียส
ค่าความเป็นกรด	กรดอ่อน pKa 4.87
ความดันวิกฤต	5370 กิโลปาสคาล
ความคงตัว	มีความคงตัว
การกัดกร่อนเหล็ก	สามารถกัดกร่อน เหล็กกล้า นิกเกิล โครเมียม และ ตะกั่ว
สภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง	อุณหภูมิเกิน 50 องศาเซลเซียส
วัตถุที่ควรหลีกเลี่ยง	1.สารออกซิไดซ์ 2.Reactivemetal 3.Reducing agent 4.กรดแก่

ที่มา : http://www.absoluteastronomy.com/encyclopedia/p/pr/propionic_acid.h

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 อันตรายของกรดโพรพิโอนิก

2.3.1 อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อระบบทางเดินหายใจ

กรดโพรพิโอนิกทำให้เกิดอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ โดยความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดในอากาศ จะทำให้คัดจมูก เจ็บคอ ไอ เสียงแหบ หายใจติดขัด ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรเคลื่อนย้ายผู้ป่วยออกจากที่ซึ่งมีกรดโพรพิโอนิกและนำผู้ป่วยไปยังที่ที่มีอากาศปลอดโปร่ง แล้วนำส่งแพทย์

2.3.2 อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อผิวหนัง

อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อผิวหนังจะมีความรุนแรงระดับปานกลางถึงรุนแรงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดและลักษณะการสัมผัส หากสัมผัสกรดโดยตรงจะทำให้ผิวเกิดรอยแดงและเจ็บ ถ้ารุนแรงจะทำให้ผิวไหม้เกิดแผลพุพองและเนื้อเยื่อถูกทำลาย บาดแผลจะจางลงหลังจาก 40 นาที ผิวที่แดงอาจเกิดการบวมและเนื้อเยื่อตาย(necrosis) และจะหายดีใน 3 วัน การสัมผัสกรดอาจส่งผลอย่างรุนแรงหากไม่ทำการล้างกรดออกจากผิวหนัง อาจทำให้เกิดบาดแผลถาวรได้ จากการศึกษาพบว่ากรดโพรพิโอนิกสามารถซึมผ่านผิวหนัง ทำให้เกิดอันตรายได้ ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรล้างบริเวณผิวหนังที่โดนกรดด้วยน้ำสะอาดทันที ถ้ากรดมีความเข้มข้นสูงและบาดแผลมีอาการหนัก ควรนำส่งแพทย์

2.3.3 อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อตา

อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อตาหากถูกไอของกรดที่มีความเจือจางเข้าตา ทำให้เกิดอาการตาแดงและเจ็บ ถ้าถูกกรดที่มีความเข้มข้นเข้าตาโดยตรง ทำให้กระจกตาไหม้ โดยระดับความรุนแรงขึ้นกับความเข้มข้นของกรด ถ้ารุนแรงมากอาจส่งผลถาวรและทำให้ตาบอด ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรล้างบริเวณผิวหนังที่โดนกรดด้วยน้ำสะอาดทันที แล้วนำส่งแพทย์โดยทันที

2.4 เวย์ (Whey)

เวย์เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็ง หรือการแยกเคซีนจากนมสด(ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ. 2526) มีลักษณะเป็นของเหลวใสมีสีค่อนข้างเขียวอมเหลือง (Marshall. 1982) องค์ประกอบของเวย์โดยทั่วไปพบว่า มีปริมาณน้ำตาลแลคโตสอยู่ในปริมาณมากกว่าสารอาหารอื่น (Westerguard. 1983) คือ ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตสร้อยละ 4-5 โปรตีนร้อยละ 1 และเกลือร้อยละ 1 (Roukas. 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 ประเภทของเวย์

Alfa-Laval (1987) แบ่งเวย์ออกได้เป็น 2 ประเภท ตามความเป็นกรด (titable acidity) ได้แก่

1. สวีทเวย์ (sweet whey) เป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งชนิดแข็ง เช่น เชดดา (Cheddar cheese), เกาดา (Gouda cheese), สวิส (Swiss cheese) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.10 – 0.20 และมีค่าพีเอชระหว่าง 5.8 – 6.1

2. แอซิดเวย์ (acid whey) เป็นผลิตผลพลอยได้จากการตกตะกอนนม โดยการเติมกรดหรือเกลือแร่ลงไปโดยตรงในการผลิตเนยแข็งชนิดอ่อน เช่น คอทเทจ (cottage) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.40 – 0.60 และมีค่าพีเอชระหว่าง 4.0 – 5.0 (Kosikowski. 1977) องค์ประกอบของเวย์มีค่าไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของน้ำนมและขบวนการผลิตเนยแข็ง เช่น เวย์ที่ได้จากการผลิตคอจเทจ จะมีปริมาณกรดแลคติกสูง เพราะน้ำตาลแลคโตสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก โดยแบคทีเรียแลคติก (Hussong และคณะ. 1973)

สรุปองค์ประกอบที่แตกต่างของเวย์ทั้งสองชนิดดังตารางที่ 2.3 พบว่าสวีทเวย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างขององค์ประกอบเช่นเดียวกับแอซิดเวย์ โดยแลคติกแอซิดเวย์ (lactic acid whey) จะได้จากการผลิตคอทเทจชีส ส่วนไฮโดรคลอริก (hydrochloric) หรือซัลฟิวริกแอซิดเวย์(sulphuric acid whey) ได้จากการผลิตเคซีน (Nielsen and Ullum. 1989)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบโดยประมาณของสวีทเวย์และแอซิดเวย์

องค์ประกอบ (ร้อยละ)	สวีทเวย์		แอซิดเวย์	
	เชดดา	เกาดา	แลคติกแอซิดเวย์ (คอจเทจชีส)	ไฮโดรคลอริก/ ซัลฟิวริกแอซิดเวย์(เคซีน)
ปริมาณของแข็ง	6.00	5.50	6.00	6.30
น้ำ	94.00	94.50	94.00	93.70
ไขมัน	0.06	0.05	0.05	0.05
โปรตีน	0.80	0.68	0.80	0.80
เถ้า(เกลือแร่)	0.50	0.45	0.67	0.80
น้ำตาลแลคโตส	4.49	4.18	3.63	4.50
กรดแลคติก	0.15	0.14	0.85	0.15

ที่มา : Nielsen และ Ullum (1989)

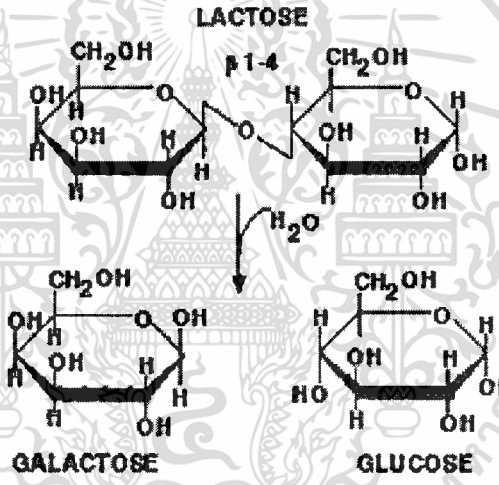
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 องค์ประกอบหลักทางเคมีของเวย์

2.4.2.1 น้ำตาลแลคโตส

น้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลที่พบในน้ำนมเท่านั้น ในน้ำนมวัวมีน้ำตาลแลคโตสอยู่ประมาณร้อยละ 4.7 ซึ่งต่ำกว่าในน้ำนมมนุษย์ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสอยู่ประมาณร้อยละ 6.3 น้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลชนิดรีดิวซิง (reducing sugar) มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับน้ำตาลทราย คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ และเมื่อถูกไฮโดรไลส์แล้วจะได้น้ำตาล 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส ดังสมการดังต่อไปนี้

$$\underset{\text{แลคโตส}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + \underset{\text{น้ำ}}{H_2O} \xrightarrow{\text{เอนไซม์ แลคเทส}} \underset{\text{กลูโคส}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{กาแลคโตส}}{C_6H_{12}O_6}$$



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของน้ำตาลแลคโตสที่ถูกไฮโดรไลส์

ที่มา : www.ratjes.nl/ lactose.htm

เมื่อน้ำตาลแลคโตสได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 110 – 130 องศาเซลเซียสจะทำให้มีการสูญเสียน้ำ ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียสจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเรียกว่า แลคโตสคาราเมล ดังนั้น ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์นมจะไม่มีการใช้ความร้อนสูงถึง 175 องศาเซลเซียส เพราะจะทำให้สีของผลิตภัณฑ์เป็นสีน้ำตาลไหม้

2.4.2.2 โปรตีน

โปรตีนในเวย์เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนในน้ำนมซึ่งเป็นโปรตีนตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง ดังแสดงในตารางที่ 2.4 โปรตีนในเวย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ เบตาแลคโตโกลบูลิน (beta – lactaglobulin) และแอลฟาแลคทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บูมิน (Alpha – lactabumin) โดยเบตาแลคโตโกลบูลินจะมีอยู่ประมาณร้อยละ 50 – 60 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือเจือจางสามารถตกตะกอนได้ด้วยเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$) โปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในแง่การให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลว (วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2532) ส่วนแอลฟาแลคทอลบูมินมีอยู่ประมาณร้อยละ 15 - 20 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนได้เมื่อถูกความร้อน ส่วนที่เหลือ คือ ซีรัมอัลบูมิน อิมมูโนโกลบูลิน เอนไซม์ต่างๆ และโปรตีนอื่นๆ (Webb and Whitter. 1970) ความแตกต่างขององค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์แสดงไว้ในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในนม เคซีน และเวย์

กรดอะมิโน	องค์ประกอบ (กรัม/100 กรัมโปรตีน)		
	นม	เคซีน	เวย์
ทริปโตเฟน	1.4	1.4	2.1
ฟีนิลอะลานีน	5.2	5.1	3.8
ลิวซีน	10.4	10.4	11.1
ไอโซลิวซีน	6.4	5.7	6.8
ทรีโอนีน	5.1	4.6	8.0
เมทไทโอนีน	2.7	2.8	2.4
ไลซีน	8.3	8.3	9.9
วาลีน	6.8	6.8	6.8

ที่มา : Renner (1983)

2.5 การใช้ประโยชน์จากเวย์

เนื่องจากเวย์ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม นักวิจัยจึงได้ศึกษาหาทางนำเวย์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังมีรายงานการใช้ประโยชน์จากเวย์ดังนี้ (ชลัท ศานติวรางคณา. 2534)

2.5.1 Whey permeate

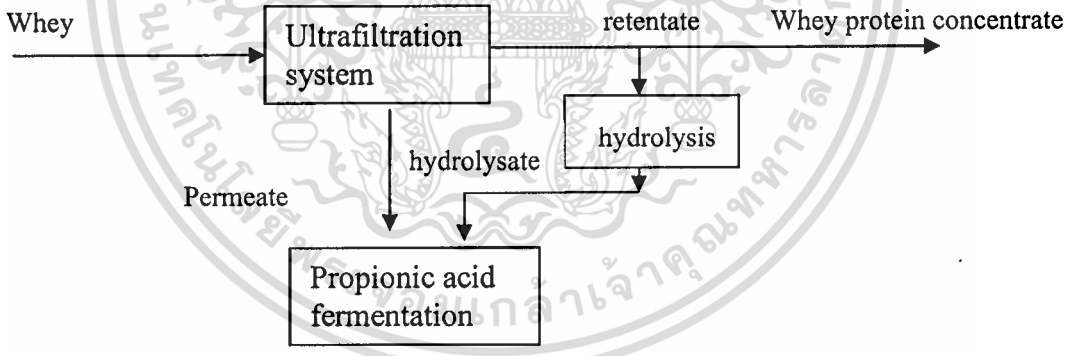
Whey permeate เป็นผลิตผลพลอยได้จากการนำเวย์มาผลิตเป็นโปรตีนเวย์เข้มข้น มีแลคโตสและไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้เป็นส่วนประกอบหลัก จึงมีความสนใจในการนำ whey permeate มาใช้แทนแหล่งคาร์บอนอื่นที่มีราคาแพงในการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการทางชีวภาพ ดังรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์

ชนิดของโปรตีนในเวย์	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโปรตีน	ค่าพีเอช	น้ำหนักโมเลกุลดาลตัน $x10^3$
แอลฟาแลคโตโกลบูลิน	3.0	50	5.3 – 5.5	18.3
เบตาแลคทอลบูลิน	0.7	12	4.2 – 4.5	14
โปรติเอส เปปโตน	1.4	23	-	4.1 – 4.8
โบรวิน ซีรัม อัลบูมิน	0.3	5	5.1	69
อิมมูโนโกลบูลิน	0.6	10	5.5 – 8.3	15 – 1000
แลคโตเฟอร์ริน	0.05	0.8	9.0	81 -84
แลคโตเพอร์ออกซิเดส	0.03	0.5	9.6	89

ที่มา : Marshall (1982)



รูปที่ 2.4 แสดงขั้นตอนการผลิต และการใช้ประโยชน์ของ Whey permeate

ที่มา : Fitzpatrick และ O'Keeffe (2001)

2.5.2 โปรตีนเวย์เข้มข้น

โปรตีนเวย์เข้มข้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่ละลายได้และโปรตีนที่ตกตะกอนมีวิธีการทำคือนำเวย์มาทำให้มีสภาพเป็นกลาง จากนั้นนำไประเหยจนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับร้อยละ 62 ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นแยกเพื่อเอาแลคโตสและเกลือแร่ออกมาให้เหลือแต่โปรตีนจากนั้นนำไปกรอง จะได้เป็นโปรตีนเวย์เข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 5 เดือน นำไปใช้ในการผลิตอาหารเด็ก ผลิตภัณฑ์ขนมอบและไอศครีม (ชลัท ศานติวรางคณา. 2534)

2.5.3 ผลึกแลคโตส

เวย์ที่สามารถนำมาผลิตเป็นผลึกแลคโตสได้นั้นสามารถใช้ได้ทั้งเวย์สดและเวย์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกแล้ว ผลึกแลคโตสสามารถนำมาผลิตเป็นลูกกวาด ใช้เป็นสารขัดฟันในยาสีฟัน ใช้เป็นสารป้องกันการจับตัวเป็นก้อน (ชลัท ศานติวรางคณา. 2534)

2.5.4 การผลิตเนยแข็งจากเวย์

การผลิตเนยแข็งจากเวย์ทำได้โดยนำเวย์มาระเหยภายใต้สภาพสูญญากาศจนมีความเข้มข้นร้อยละ 80 แล้วจึงลดอุณหภูมิก่อนที่จะบรรจุพิมพ์ ตัวอย่างเนยแข็งจากเวย์ ได้แก่ ไมซอสท์ (Mysost) จีทอสท์ (Gjetost) พูลทอสท์ (Putost) สุพรีม (Supriam) เป็นต้น (ชลัท ศานติวรางคณา. 2534)

2.5.5 การผลิตวิตามินบี 12 และไรโบฟลาวิน

การผลิตวิตามินบี 12 และไรโบฟลาวินทำได้โดยใช้เวย์เป็นสารอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Propionibacterium shermanii* สำหรับผลิตวิตามินบี 12 และใช้เป็นสารอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ *Clostridium acetobutyricus* ในการผลิตไรโบฟลาวิน (ชลัท ศานติวรางคณา. 2534)

2.5.6 รายงานการศึกษาวิจัยที่นำเวย์มาใช้ประโยชน์อื่นๆ

Bogdanova (1974) ได้ศึกษาการนำเวย์มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโดยการนำเวย์มาพาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 95 – 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง เอาเฉพาะส่วนใสมาเติมหัวเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และเติมเชื้อยีสต์ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 30 – 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง

Gurr และคณะ (1984) ได้ศึกษาการผลิตโยเกิร์ตโดยการนำเวย์ไปกรองแล้วนำส่วนใสมาผสมกับหางนมพาสเจอไรส์ บ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมทรีโอนีนปริมาณร้อยละ 0.1 และเติมหัวเชื้อ *Bifidobacterium bifidum* หรือ *Bifidobacterium longum* ปริมาณร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Colomban และคณะ (1993) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจาก whey permeate ในการหมักจะมีการเติมน้ำและสารอาหารลงไปใน whey permeate หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อ มีการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการใช้วิธี Ultrafiltration เชื้อที่ใช้คือ *Propionibacterium thoenii* (ATCC 4871), *Propionibacterium jensenii* (ATCC 4870, 4867 และ CNRZ 83, 731), *Propionibacterium freudenreichii* supsp.*freudenreichii* (NCIB 5959 และCNRZ 89, 725, 726, 728, 729)

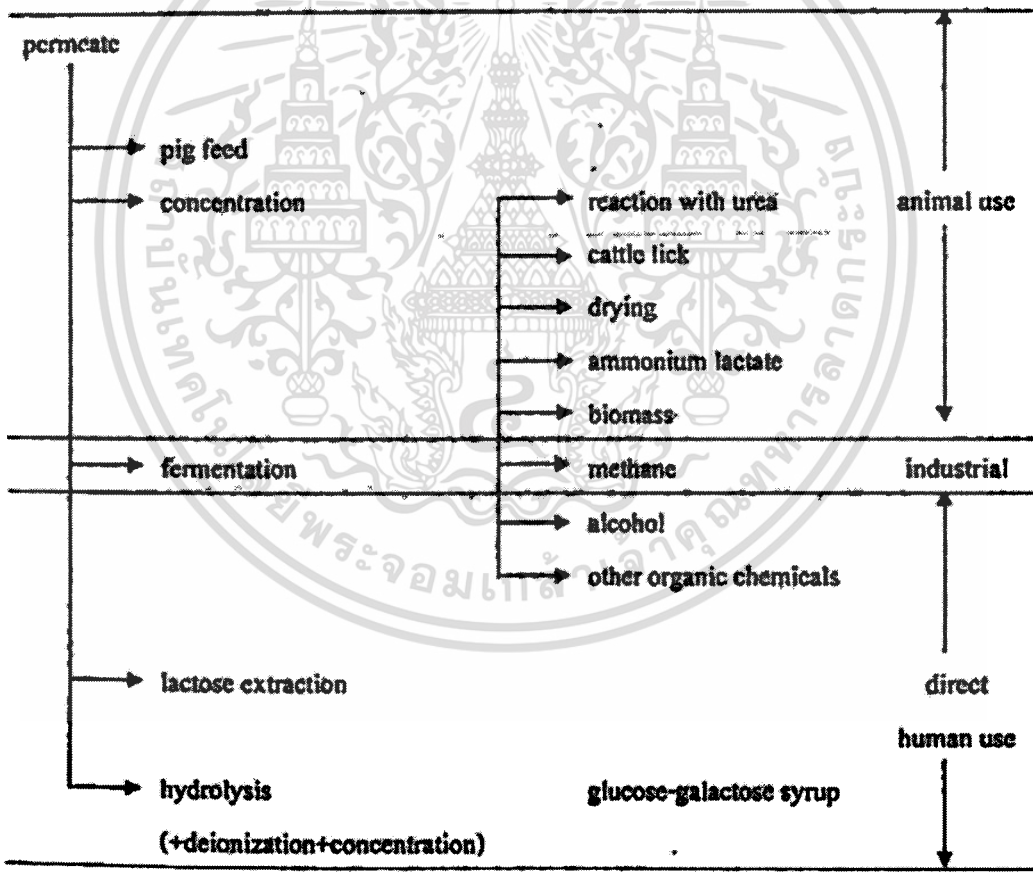
เอกสารนี้เป็นสิ่งที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Propionibacterium freudenreichii subsp. *shermanii* (NICB 5964, CNRZ 433, 722, 724 และ SO 2908, 2910, 7916) และ *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (CNRZ 164)

Yang และคณะ (1994) ได้ศึกษาการผลิตเกลือโพรพิโอเนตจาก whey permeate โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 ร่วมกับเชื้อ *Streptococcus lactis* OSU 588 เพื่อผลิตเกลือโพรพิโอเนตจากเวย์ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เวย์ 2 ชนิด คือsweet whey และ de-lactose whey

Yang และ Huang (1995) ได้ศึกษาการผลิตเกลือโพรพิโอเนตจากเวย์ด้วยการหมักแบบกะ โดยการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง เชื้อที่ใช้คือ *Propionibacterium acidipropionici* (ATCC 4875) *Lactococcus lactis* (OSU 588) และ *Lactobacillus helveticus* (ATCC 15009)

แผนผังแสดงความเป็นไปได้ในการนำเวย์มาใช้ประโยชน์แสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ความเป็นไปได้ที่จะนำเวย์มาใช้ประโยชน์

ที่มา : Pedersen และ Werner (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก

2.6.1 การผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีทางเคมี

การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยวิธีสังเคราะห์ทางเคมีเริ่มต้นจากการเกิด Hydroformyltion ของก๊าซคาร์บอนโมโนออกไซด์ ไฮโดรเจน และ เอทีรีน ได้เป็นโพรพิโอนอลดิไฮด์ดังสมการที่ 1

สมการที่ 1 การผลิตโพรพิโอนอลดิไฮด์

$$\underset{\text{คาร์บอนโมโนออกไซด์}}{CO} + \underset{\text{ไฮโดรเจน}}{H_2} + \underset{\text{เอทีรีน}}{C_2H_4} \rightarrow \underset{\text{โพรพิโอนอลดิไฮด์}}{CH_3CH_2CHO}$$

โพรพิโอนอลดิไฮด์จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียสได้เป็นกรดโพรพิโอนิก ดังสมการที่ 2

สมการที่ 2 การออกซิเดชันโพรพิโอนอลดิไฮด์

$$\underset{\text{โพรพิโอนอลดิไฮด์}}{CH_3CH_2CHO} + \underset{\text{ออกซิเจน}}{\tfrac{1}{2}O_2} \rightarrow \underset{\text{กรดโพรพิโอนิก}}{CH_3CH_2COOH}$$

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Propionic_acid

ข้อดีข้อเสียของกระบวนการผลิตด้วยวิธีทางเคมี

ข้อดี : ใช้เวลาในการผลิตสั้นและได้ผลผลิตตามต้องการ

ข้อเสีย : สารโพรพิโอนอลดิไฮด์ เป็นสารเคมีที่มีอันตราย

2.6.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการทางชีวภาพ

การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยกระบวนการทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium* โดยการเปลี่ยนแปลงของ กรดไขมันในกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารที่เชื้อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและสายพันธุ์ของเชื้อ(เอนไซม์ที่มีในแต่ละสายพันธุ์)ที่ผลิตกรด เป็นตัวกำหนดวิถีในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

Champagne และคณะ (1989) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *P. shermanii* สายพันธุ์ B-123 ที่ถูกตรึงอยู่ในแคลเซียมแอลจิเนทในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมหางนมและแลคเตตในการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าเชื้อ B-123 จะใช้แลคเตตในการเจริญได้ดีกว่าแลคโตสที่มีอยู่ในหางนม เนื่องจากหางนมที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักนี้ได้มาจากการผลิตเนยแข็งที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อแลคโตบาซิลลัส(*Lactobacillus*) ซึ่งมีพีเอชที่เป็นกรดจึงต้องทำให้เป็นกลางด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ก่อนที่จะทำการหมักด้วยเชื้อ B-123 และพบว่าอัตราการหมักจะสูงขึ้นเมื่อปรับพีเอชของหางนมด้วย แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และความเข้มข้นของแลคเตตที่ใช้อยู่ระหว่าง ร้อยละ 1-2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักกรดโพรพิโอนิก คือ 37 องศาเซลเซียส โดยที่อัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติกจะสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Woskow และ Glatz (1991) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคโตสจากหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P9 และP200910 ในสภาพการหมักแบบกะและกึ่งกะ พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P200910 ให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 47 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าผลผลิตที่ได้จากสายพันธุ์ P9 และจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกสูงสุดโดยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ

Lewis และ Yang (1992(a)) ศึกษากระบวนการหมักกรดโพรพิโอนิกโดยใช้แลคโตสกลูโคสและแลคเตตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichil* spp. *shermanii* ในสภาพการหมักแบบกะ โดยเติมกลีเซอรอลจำนวน 20 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อผลิตกรด พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ใช้เวลาในการหมักสั้นกว่า *P. shermanii* ถึง 2 เท่า คือ 54 ชั่วโมงและ 110 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่ได้พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ให้ผลผลิตที่สูงกว่าเชื้อ *P. shermanii* คือ 12 กรัมต่อลิตร และ 9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในทำนองเดียวกันการเติมกลูโคสจำนวน 20 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากเชื้อ *P. acidipropionici* ก็สูงกว่าเช่นกัน คือ 8.7 กรัมต่อลิตร และ 6.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบแหล่งของธาตุคาร์บอนจากทั้ง 2 แหล่ง พบว่าการใช้กลีเซอรอลจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าการใช้กลูโคส คือ 12 กรัมต่อลิตร และ 8.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกและวิตามินบี 12 จากซูโครส พบว่าความเข้มข้นของ $FeSO_4.7H_2O$ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ธาตุโคบอลต์ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร 5,6dimethykbenzimidazol 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 12 กรัมต่อลิตร นั้นมีความจำเป็นที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม สำหรับในการผลิตเพื่อให้ได้กรดโพรพิโอนิกนั้นจะต้องทำในสภาวะที่ไม่มีอากาศที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และในการผลิตวิตามินบี12 นั้นทำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีอากาศที่พีเอช 6.5

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคเตตจาก corn steep liquor (CSL) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* สายพันธุ์ P200910 เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแอลจิเนทและเชื้ออิสระในสภาพการหมักแบบกะ กึ่งกะและต่อเนื่อง พบว่าการหมักแบบกะจะแสดงผลผลิตของกรดสูงสุดภายในเวลา 36 ชั่วโมง การใช้แลคเตตเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าการใช้กลูโคสและเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตจะให้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าเชื้ออิสระ ส่วนการหมักแบบกึ่งกะใช้เวลาในการหมักนาน 250 ชั่วโมง ความเข้มข้นสูงสุดของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้กลูโคสจะสูงกว่าการใช้แลคเตต คือ 57 และ 45.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในการหมักแบบต่อเนื่อง การใช้กลูโคสจะให้ผลผลิตของกรดโดยเชื้อที่ถูกตรึงสูงกว่าการใช้แลคเตต

เอกสาร... ...การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Babirato และคณะ (1997) เปรียบเทียบการเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิก 3 ชนิด คือ *Propionibacterium acidipropionici* สายพันธุ์ ATCC25562 *P. acnes* ATCC6919 และ *Clostridium propionicum* ATCC25522 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ กลีเซอรอล กลูโคส และกรดแลคติกเพื่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่า *P. acidipropionici* สายพันธุ์ ATCC25562 ให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุดโดยใช้เวลาในการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียอีก 2 สายพันธุ์ และพบอีกว่าการใช้กลีเซอรอลเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ ATCC25562 จะได้ผลผลิตของกรดที่สูงกว่าการใช้กลูโคสและกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน

Ramsay และคณะ (1998) ได้ศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพเพื่อเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสเป็นกรดโพรพิโอนิก ในการศึกษาใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ hemicellulose hydrolysate ร้อยละ 60 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร การเกิดกรดจะเกิดควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของเชื้อ มีอัตราการเจริญจำเพาะคือ 0.1 และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกคือ 0.23 กรัมต่อลิตรชั่วโมง การเจริญและการผลิตกรดจะถูกยับยั้งเมื่อมีความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิก 2 กรัมต่อลิตร สุดท้ายได้กรดโพรพิโอนิก 18 กรัมต่อลิตร

Himmi และคณะ (2000) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคส กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* ssp.*shermanii* และ*Propionibacterium acidipropionici* จะได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ และได้ผลิตผลพลอยได้คือ กรดอะซิติก n-propanol และกรดซัคซินิก จากการทดลองนี้พบว่า เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน จะผลิตกรดโพรพิโอนิกได้มากที่สุด เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นได้เร็วกว่า 0.64 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดสูงกว่า 0.42 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ได้จะมากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นถึง 2 เท่า ส่วนเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการใช้กลีเซอรอลกับการสร้างผลผลิต แสดงว่าเมแทบอไลท์ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* นั้นปรับตัวเพื่อนำไปใช้ในการสร้างสารประกอบตัวอื่นได้ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีเยี่ยมสำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

Goswami และ Srivastava (2000) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ด้วยวิธีการหมักแบบกึ่งกะ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้แลคโตสเป็นซับสเตรต พีเอช 6.5 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเริ่มต้นของแลคโตสที่ใช้คือ 47.7 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 20.75 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราการผลิตได้ 0.23 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Martinez - Campos และ Torre (2002) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยการหมักแบบกึ่งกะจากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* มีการเติมกลูโคสหรือแลคเตตหรือสารผสมระหว่างกลูโคสและแลคเตต กลูโคสและเลคเตตจะถูกใช้ใน ปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การใช้แลคเตตและกลูโคสร่วมกันจะเพิ่มอัตราการผลิตโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) แล้วยังเป็นการเพิ่มส่วนของธาตุคาร์บอนสำหรับที่จะนำไปใช้ในการผลิตชีวมวล เมื่อใช้แลคเตตและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์ผลผลิตของโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) มีค่าเท่ากับ 7.6 เมื่อใช้แลคเตตอย่างเดียวผลิตภัณฑ์ที่เป็นโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) มีค่าเท่ากับ 1.34 และเมื่อใช้กลูโคสอย่างเดียวผลิตภัณฑ์ที่เป็นโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) มีค่าเท่ากับ 1.85 ปริมาณธาตุคาร์บอนที่เก็บเกี่ยวได้ในชีวมวลมีค่าเท่ากับ 0.09 เมื่อใช้กลูโคสอย่างเดียว มีค่าเท่ากับ 0.12 เมื่อใช้แลคเตตอย่างเดียว และมีค่าเท่ากับ 0.21 เมื่อใช้แลคเตตและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์

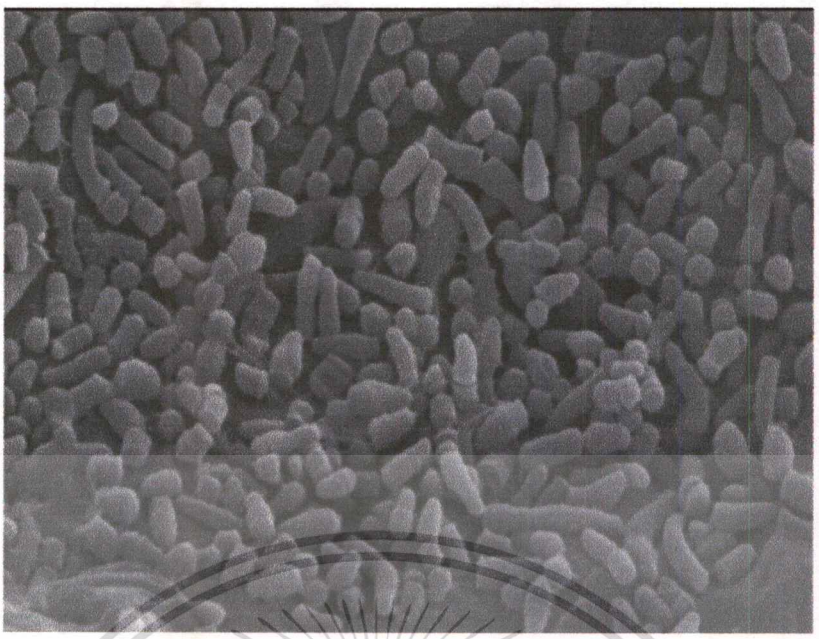
2.7 แบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิก

เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดโพรพิโอนิกอยู่ในสกุล *Propionibacterium* ซึ่งเรียกว่าเป็น propionic acid bacteria พบครั้งแรกโดยแยกได้จาก Swiss cheese ผลลัพธ์จากกระบวนการหมักจะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะทำให้เกิดลักษณะที่เป็นรูพรุนในเนยแข็ง

รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Propionibacterium* มีรูปร่างหลายแบบได้แก่ รูปร่างกลม ท่อนยาว ท่อนไม้กระบอง การเรียงตัวของเซลล์อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวกแสดงดังรูป 2.7 มีการเจริญแบบแฟคคัลเททีฟแอนแอโรบ (facultative anaerobe) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส สามารถหมักได้กรดโพรพิโอนิก ซัคซินิก อะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ มีความต้องการทางอาหารที่ซับซ้อน เจริญเติบโตช้า แหล่งที่พบแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมหรือกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นม มีอยู่ด้วยกัน 6 สายพันธุ์ คือ *Propionibacterium freudenreichil, P. jensenil, P. theonil, P. acidipropionici, P. coccoides* และ *P. cyclohexanicum* ส่วนกลุ่มที่สองคือ กลุ่มที่เจริญอยู่บนผิวหนังของมนุษย์หรือกลุ่มที่ทำให้เกิดสิว กลุ่มนี้ไม่ค่อยมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม

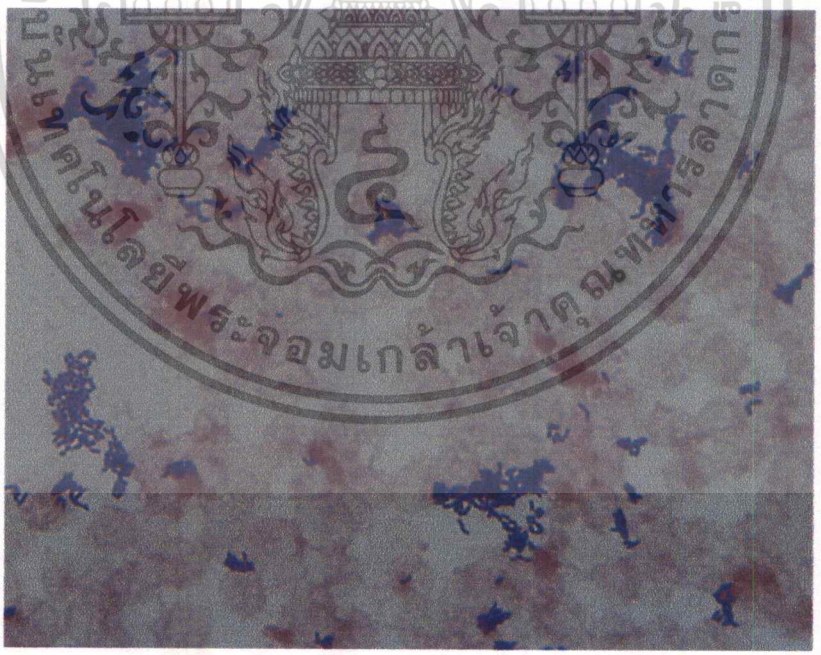
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

74431



รูปที่ 2.6 เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici*

ที่มา : www.bio-pro.de/.../ ulm/aknebakterium_338x261.jpg



รูปที่ 2.7 การทดสอบการย้อมติดสีของเชื้อเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici*

ที่มา : www.betterhumans.com/.../ Contex/2004-07-29-1.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

2.8.1 แหล่งคาร์บอน

วัตถุดิบที่แบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เช่น สารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก กลีเซอรอล แมนนิทอล สารประกอบคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ กลูโคส มอลโทส แลคโตส ซูโครส และแป้ง (Prescott และ Dunn. 1959)

แบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก ดังสมการ

$$1.5C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$$

(กลูโคส) (กรดโพรพิโอนิก) (กรดอะซิติก)

แบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* ยังสามารถเปลี่ยนกรดแลคติกไปเป็นกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติกดังสมการ

$$3CH_3CHOHCOOH \longrightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$$

(กรดแลกติก) (กรดโพรพิโอนิก) (กรดอะซิติก)

(Tyree และคณะ. 1991)

Lewis และ Yang (1992(a)) ศึกษาผลของซับสเตรตที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 ที่ถูกตรึง ซับสเตรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนประกอบด้วย แลคโตส กลูโคส และแลคเตต ในการหมักเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นที่เท่ากัน พบว่าแลคเตตจะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าแหล่งคาร์บอนอื่นๆ

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาการเปลี่ยนน้ำตาลหรือกากน้ำตาลไปเป็นกรดโพรพิโอนิกของ *P. acidipropionici* ในกระบวนการหมักแบบกะที่อัตราการเจือจาง 0.1 ต่อชั่วโมง ได้กรดโพรพิโอนิก 30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิต 0.36 – 0.45 กรัมกรดโพรพิโอนิกต่อกรัมซูโครส และคิดเป็นอัตราการเกิดผลผลิตได้ 3 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ในการศึกษาความคงตัวของเซลล์ที่ถูกตรึงโดยทำการหมักแบบกะใช้ *Propionibacterium acidipropionici* P200910 พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกในรอบที่สิบจะมีค่าร้อยละ 50 – 70 ของรอบที่หนึ่งโดยใช้อาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

Quesada – Chanto และคณะ (1994) ศึกษาพบว่า *Propionibacterium shermanii* PZ-3 และ *Propionibacterium acidipropionici* NRRL B3569 ทั้งสองสายพันธุ์สามารถใช้ซูโครสเพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นกรดโพรพิโอนิกโดยไม่ทำให้เกิดการยับยั้งโดยซับสเตรตในช่วงความเข้มข้น 30 – 170 กรัมซูโครสต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yang และ Huang (1995) ทดลองทำการหมักแบบ recycle batch จากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกจะได้ร้อยละ 90 ของผลผลิตทางทฤษฎี

Barbirato และคณะ (1997) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับกลูโคสและกรดแลคติก โดยใช้เชื้อ 3 สายพันธุ์ คือ *Propionibacterium acidipropionici, Propionibacterium acnes* และ *Clostridium popionicium* ทำการหมักแบบกะ ใช้กลีเซอรอลเป็นซับสเตรตเริ่มต้นปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ผลผลิตส่วนใหญ่ที่ได้ คือกรดโพรพิโอนิก (0.844 โมลต่อโมล) และได้ผลิตผลพลอยได้ คือกรดซัคซินิก (0.055 โมลต่อโมล) กรดอะซิติก (0.023 โมลต่อโมล) กรดฟอร์มิก (0.020 โมลต่อโมล) และ n-propanol (0.036 โมลต่อโมล) พบว่าเมื่อใช้กลูโคสและกรดแลคติกเป็นซับสเตรตจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกต่ำ คือร้อยละ 17 และร้อยละ 13 ตามลำดับซึ่งจะต่ำกว่าใช้กลีเซอรอลเป็นซับสเตรต นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นจะส่งผลให้อัตราการผลิตกรดสูงขึ้น (0.36 กรัมต่อลิตรชั่วโมง) และได้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกคือ 42 กรัมต่อลิตร

Himmi และคณะ (2000) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลและกลูโคสโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* และ *Propionibacterium freudenreichii* ssp.*shermanii* ทำการหมักแบบกะในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ได้กรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ และได้ผลิตผลพลอยได้ คือกรดอะซิติก กรดซัคซินิก และ n-propanol

2.8.2 แหล่งไนโตรเจน

สมใจ ภัสสัตยางกูล. (2527) ทดลองศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของ *Propionibacterium* sp. Arl AKU 1251 พบว่ายีสต์สกัดมีผลต่อการเจริญของเชื้อมากโดยใน complete medium ที่ขาดยีสต์สกัด เชื้อจะเจริญได้น้อยในขณะที่ขาด pancreatic digest of casein หรือ acid hydrolysate of casein เชื้อยังคงมีอัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกับ complete medium

Prescott และ Dunn (1959) พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่ออัตราการหมักและอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติก *Propionibacterium shermanii* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด ยีสต์สกัด และเนื้อสัตว์ แต่ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

Colomban และคณะ (1993) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้แหล่งไนโตรเจนดังนี้ ยีสต์สกัด ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด และโปรตีนเวย์เข้มข้น พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดผลิตกรดโพรพิโอนิกจะได้ปริมาณสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yang และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในเวย์ โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ คือ ทริปทิเคสซอยบรอท และ ยีสต์สกัด พบว่าจะได้ปริมาณกรดสูงสุดเมื่อใช้ ทริปทิเคสซอยบรอท และยีสต์สกัด เติมลงไปในเวย์ปริมาณ 20 และ10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Yang และ Huang (1995) ศึกษาการหมักแบบกะของ *Propionibacterium acidipropionici* พบว่าเมื่อเพิ่มยีสต์สกัดร้อยละ 1 ลงในอาหารจะได้อัตราการผลิต 0.68 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ซึ่งมากกว่าอาหารที่ไม่เติมยีสต์สกัด

2.8.3 แหล่งเกลือแร่

Gebgardt และคณะ (1970) ศึกษาพบว่าโคบอลท์มีอิทธิพลต่อการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโคบอลท์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเชื้อ *Propionibacterium shermanii* ร้อยละ 55 – 60 ของน้ำหนักแห้ง แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโคบอลท์การเจริญของเชื้อจะลดลง

Quesada–Chanto และคณะ (1994) พบว่าเหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญของ *Propionibacterium shermanii* โดยเมื่อเติม $FeSO_4.7H_2O$ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารจะเป็นความเข้มข้นปริมาณที่เหมาะสมในการเจริญ

2.8.4 แหล่งวิตามิน

Thompson (1943) ทดลองศึกษาพบว่า กรดแพนโททินิก และ ไบโอติน เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของ *Propionibacterium shermanii* และ *Propionibacterium jensenii*

2.8.5 แคลเซียมคาร์บอนเนต ($CaCO_3$)

แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารที่ช่วยรักษาค่าพีเอช (บัพเฟอร์)โดยแคลเซียมคาร์บอเนตเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดโพรพิโอนิกจะได้เกลือแคลเซียมโพรพิโอเนตและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลช่วยลดปฏิกิริยาการยับยั้งเชื้อโดยกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นยังมีผลช่วยให้เกิดสภาวะไม่มีอากาศให้สมบรูณ์มากขึ้น (Altaf และคณะ. 2006) ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกยังไม่มีการรายงานการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตแต่ในการผลิตกรดแลคติกได้มีรายงานการใช้แคลเซียมคาร์บอนเนตอย่างแพร่หลาย

Kurosawa และคณะ (1988) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus awamori* ร่วมกับ *Streptococcus lactis* ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสูตรอาหารที่ทำการหมักเติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเป็น 5 ทำการกวนด้วยอัตรา 150 – 190 รอบต่อนาที ได้ผลผลิตกรดสูง 50 กรัมต่อลิตร

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* เติมกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในเวย์ ทำการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง สูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้กลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัดปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ทำการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่าง cane sugar ร้อยละ 10 กับ ยีสต์สกัดร้อยละ 1 เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส พีเอช 7 กวนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าทำการหมักด้วย cane sugar ได้ผลผลิตกรดสูงสุด

Michelson และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตการแลคติกโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* SIM-7DSM 14043 เปรียบเทียบกับเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073 อาหารที่ใช้ทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073 เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเป็น 6 พบว่า *Lactobacillus delbrueckii* ผลิตกรดแลคติกได้ 52 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 และเชื้อ *Bacillus coagulans* ผลิตกรดแลคติกได้ 56 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 10

Altaf และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV6 ทำการหมักในอาหารแข็ง ใช้แหล่งไนโตรเจนราคาถูกแทนเปปโตนและยีสต์สกัด ในอาหารที่ใช้ในการหมักเติม แคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อเปลี่ยนกรดแลคติกเป็นเกลือแลคเตตและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นทำให้เกิดสภาวะไม่มีอากาศให้สมบรูณ์มากขึ้น ภาวะที่ใช้ในการหมักคือพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน พบว่าผลิตกรดแลคติกได้ ร้อยละ 96 (กรัมกรดแลคติกที่ผลิตได้ต่อกรัมซับสเตรตที่ใช้ไป)

2.8.6 พีเอชของอาหาร

พีเอชของอาหารที่เหมาะสมแก่การเจริญอยู่ระหว่าง 6.5 – 7.0 (Tittster. 1940 ; Champagne และคณะ. 1989 ; Crespo และคณะ. 1990 ; Yang และคณะ. 1994) แต่เจริญได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 (Prescott และ Dunn. 1959) ที่พีเอช 4.0 จุลินทรีย์ *Propionibacterium acidipropionici* ไม่สามารถเจริญได้ และถ้าพีเอชสูงกว่า 7.0 การเจริญจะลดลงอย่างรวดเร็ว (Seshadri และ Mukhopadhyay. 1993)

Colomban และคณะ (1993) ได้ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยศึกษาที่พีเอช 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 เชื้อที่ใช้ศึกษาคือ *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium jensenii, Propionibacterium thoenii, Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Freudenreichii, Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* พบว่าเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ที่ทำการหมักโดยใช้พีเอชเริ่มต้น 6.5 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด

2.8.7 อุณหภูมิ

โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของ *Propionibacterium sp.* อยู่ระหว่าง 30–35 องศาเซลเซียส(Cavin และคณะ. 1985) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Propionibacterium jensenii* คือ 30 องศาเซลเซียส (Colomban และคณะ. 1993) การผลิตกรดโพรพินิกจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิไปถึง 37 องศาเซลเซียส แต่อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติกจะลดลง (Champagne และคณะ. 1989)

Seshadri และ Mukhopadhyay (1993) ทดลองศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อจะเพิ่มสูงขึ้นที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียสแล้วจะมีผลทำให้อัตราการเจริญจำเพาะลดลงอย่างรวดเร็ว

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตวิตามินบี 12

Yang และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 โดยใช้อุณหภูมิ 25 30 และ35 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

2.8.8 การให้อากาศ

Shaposhnikow และ Vorob'eva (1963) พบว่า *Propionibacterium jensenii* สามารถเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศใกล้เคียงกับภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

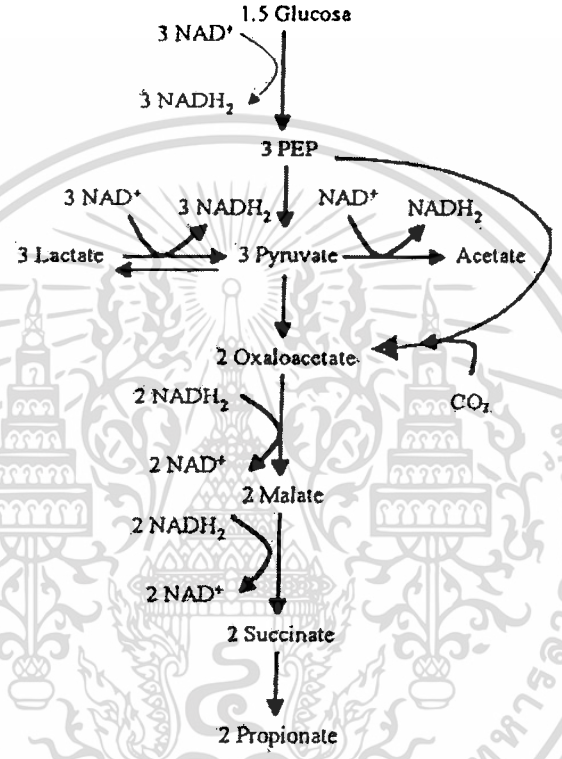
Menon และ Shemin (1967) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium shermanii* ภายใต้สภาวะมีอากาศอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกจะต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุดในสภาวะไม่มีอากาศ เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตกรดอะซิติก การผลิตวิตามินบี 12 จะเพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก

การผลิตกรดโพรพิโอนิกสามารถเกิดขึ้นได้หลายวิถีด้วยกันโดยคาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ถูกใช้ไปในการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลผลิตโดยเชื้อ *Propionibacterium* โดยเริ่มจากสารตัวกลางที่สำคัญคือ ไพรูเวท ออกซาโรอะซิเตต(Oxaloacetate) และซัคซิเนต ตามลำดับที่ได้มาจากกลูโคสหรือแลคเตต (Papoutsakis และ Meyer, 1985) ดังรูป 2.8



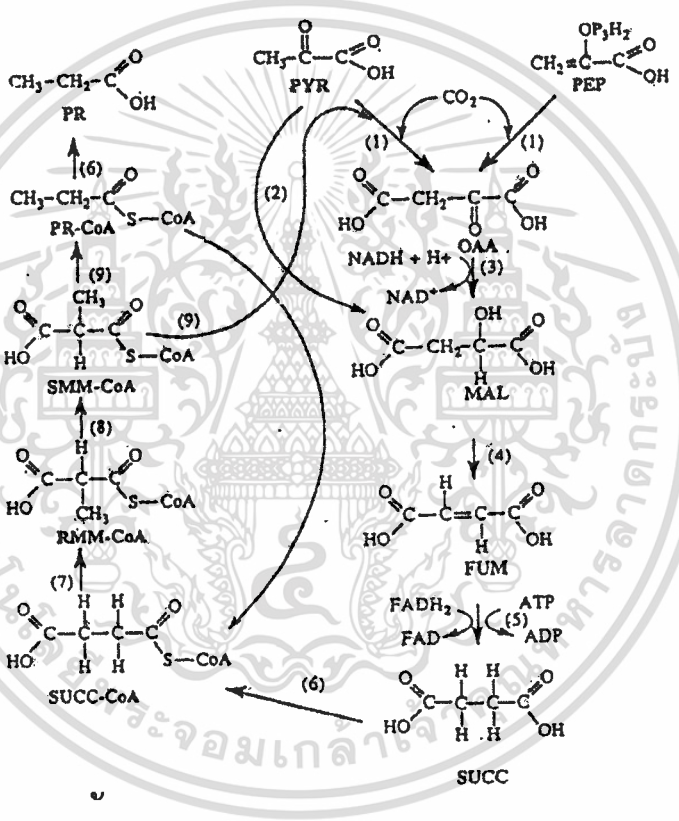
รูปที่ 2.8 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสและแลคเตตโดยเชื้อ *Propionibacterium*

ที่มา : Papoutsakis และ Meyer (1985)

รูปที่ 2.9 แสดงการเปลี่ยนไพรูเวทเป็นซัคซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์อย่างระเอียด โดยการสร้างจะเริ่มต้นจากการสร้างออกซาโรอะซิเตตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้กับไพรูเวท(pyruvate)หรือให้กับฟอสโฟอีนอลไพรูเวท(PEP) จะถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอล-มาเลต(L-malate)โดยการทำงานของเอนไซม์มาริกดีไฮโดรจิเนส (malic dehydrogenase) กรดมาริก(malic acid)ที่ได้จะถูกดึงน้ำออกโดยเอนไซม์ฟูมาเรส(fumarase)ทำให้ได้กรดฟูมาริก(fumaric acid) ซึ่งปฏิกิริยานี้ผันกลับได้ จากนั้นฟูมาเรตจะถูกเปลี่ยนให้เป็นซัคซิเนตโดยเอนไซม์ฟูมาเลตรีดักซ์เตส(fumarate reductase) ซัคซิเนตเป็นตัวกลางในกระบวนการโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซัคซิเนตจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โคเอทรานเฟอ-เรส (CoA tranferase)ได้ซัคซินิลโคเอ(succinyl CoA) ปฏิกิริยาต่อไปซัคซินิลโคเอจะเปลี่ยนไปเป็นอาร์-เมททิลมาโลนิลโคเอ(R-methyl- malonyl CoA)โดยเอนไซม์อาร์-เมททิลมาโลนิลมิวเตส(R-methyl malonylmutase) หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนอาร์-เมททิลมาโลนิลโคเอไปเป็นเอส-เมททิลมาโลนิลโคเอ(S-methyl malonyl CoA) คาร์บอนของเอส-เมททิลมาโลนิลโคเอจะถูกย้ายออกไปรวมกลับไพรูเวททำให้เกิดการสร้างออกซาโรอะซิเตต เมื่อคาร์บอนเคลื่อนย้ายออกไปจะทำให้ได้โพรพิโอนิลโคเอ(propionyl CoA) หลังจากนั้นโคเอ(CoA)จะถูกย้ายออกจากโมเลกุลเพื่อนำไปใช้กับซัคซินิกตัวต่อไป และทำให้ได้กรดโพรพิโอนิก



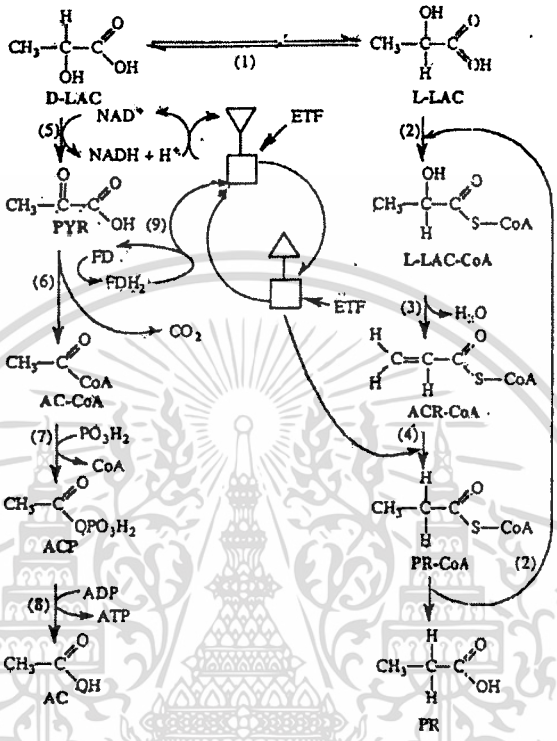
รูปที่ 2.9 การสร้าง ซัคซิเนต และ โพรพิโอเนต โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

ที่มา : Daniel (1995)

รายละเอียดของวิถีอะครีเลต(acrylate)ของการสร้างโพรพิโอเนตได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.10 กรดโพรพิโอนิกจะถูกสร้างขึ้นตามลำดับโดยเริ่มต้นจากการเปลี่ยนรูปของแอล-แลคเตต(L-lactate) ไปเป็นแอล-แลคติลโคเอ(L-lactryl CoA)โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์โคเอทรานเฟอเรส(CoA transferase) แอล-แลคติลโคเอจะเปลี่ยนรูปกลายไปเป็นอะซิลิลโคเอ(acrylyl CoA)โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีไฮดราเทสอะซิลิลโคเอ(dehrydratase acrylyl CoA) อะซิลิลโคเอจะเปลี่ยนไปเป็นโพรพิโอนิลโคเอ

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของฟราโวโปรตีน(flavor protein) โพรพิโอนิลโคเอจะย้ายโมเลกุลโคเอไปสู่แอล-แลคเตตเพื่อสร้างแอล-แลคติลโคเอ และเกิดเป็นกรดโพรพิโอนิกอิสระ การสร้างอะซิเตต (acetate) และคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดควบคู่กับการสร้างโพรพิโอเนต



รูปที่ 2.10 วิถีอะครีเลตของการสร้างโพรพิโอเนต

ที่มา : Daniel (1995)

2.10 การทำกรดโพรพิโอนิกบริสุทธิ์

ในการผลิตกรดโพรพินิดด้วยวิธีการทางชีวภาพ ขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการคือการทำให้บริสุทธิเพื่อแยกกรดที่ผลิตได้ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีวิธีการทำ 2 วิธี

2.10.1 วิธีทางกายภาพ โดยใช้แผ่นเมมเบรนเป็นตัวคัดเลือกกรดโพรพิโอนิก

Ozadali และคณะ (1996) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติกด้วยการหมักแบบกึ่งกะโดยเชื้อ *P.acidipropionici* โดยใช้ระบบการสกัด 2 ระบบคือ flat-sheet-supported liquid membrane และ The hollow – fiber

1. flat-sheet-supported liquid membrane ประกอบด้วย Minisette tangential-flow stainless-stell sanitary cell เตรียมเมมเบรนโดยการจุ่มเมมเบรนลงใน tri-n-octylphosphine oxide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

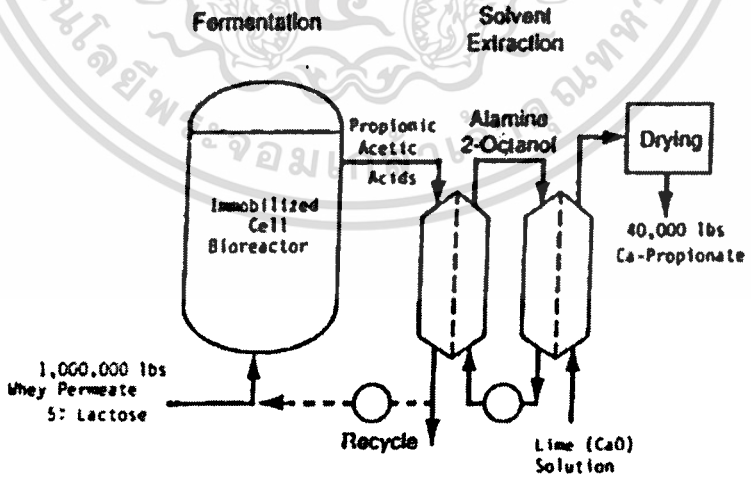
ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้ n-decane เป็นตัวทำละลาย เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจุ่มใน H_2O_2 ร้อยละ 3 เป็นเวลา 30 นาที สารละลายที่ใช้ล้างเมมเบรนใช้คือ NaOH ความเข้มข้น 0.1N.

2. The hollow – fiber ที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบด้วย 96 hydrophobic isotactic polypropylene fiber ที่บรรจุอยู่ใน glass shell สารละลายที่ใช้ล้างเมมเบรนคือ tri-n-octylphosphine oxide ร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้ keresene เป็นตัวทำละลาย

กำหนดให้น้ำหมักไหลผ่านระบบทั้ง 2 ด้วยความเร็ว 40 มิลลิลิตรต่อนาที และสารละลายที่ใช้ล้างเมมเบรนมีอัตราการไหล 24 มิลลิลิตรต่อนาที

2.10.2 วิธีทางเคมี โดยใช้สารอะลิฟาติกเอมีนในการสกัด (Wardell และ King. 1978 ; Ricker และคณะ. 1980 ; Kertes และ King. 1986 ; Wennersten. 1983 ; Tamada และ King. 1990 ; Yang และคณะ. 1991) โดยกรดจะทำปฏิกิริยากับเอมีนได้เป็นสารประกอบ acid-amine complexes และละลายในสารที่มีค่า distribution coefficients ที่สูงเพื่อแยกกรดที่เราต้องการออกจากสารที่ไม่ใช่กรด

Lewis และ Yang (1992(b)) ได้ศึกษากระบวนการสกัดกรดโพรพิโอนิกจากกระบวนการหมักโดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต กระบวนการการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้แสดงดังรูปที่ 2.11 โดยน้ำหมักจากถังหมักจะผ่านคอลัมภ์ 1-in.glass ที่บรรจุด้วย ceramic saddles ที่มีขนาด 0.25 นิ้ว และใช้สาร alamine 336 ร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ที่ละลายด้วย 2-octanol เป็นตัวสกัดสาร สารที่สกัดได้จากคอลัมภ์ เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 N จะได้สารประกอบของเกลือแคลเซียมโพรพิโอเนต



รูปที่ 2.11 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก

ที่มา: Lewis และ Yang (1992(b))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gu และคณะ (1998) ได้ศึกษาการสกัดกรดโพรพิโอนิกจากการบวนการหมักพบว่าสารละลายที่สามารถสกัดกรดโพรพิโอนิกจากน้ำหมักมี 3 ตัว คือ alamine 304-1(trilaurylamine) ที่ละลายใน octanal , 1-dodecanol และ witcohol 85 NF (oleyl alcohol) ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า alamine 304-1 ร้อยละ 30-40 ที่ละลายใน octanal มีความสามารถในการสกัดดีที่สุดแต่ 2-octanol จะเป็นพิษต่อแบคทีเรียโพรพิโอนิกจึงเลือก alamine 304-1 ที่ละลายใน witcohol 85 NF ที่ให้ผลที่รองลงมาเป็นสารที่ใช้ในการสกัด

2.11 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ

ปัจจัยหลักของการผลิตกรดโพรพิโอนิกขึ้นอยู่กับที่สายพันธุ์ของเชื้อดังตารางที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2.6 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆที่เวลา 70 ชั่วโมง และ pH ที่ 40 ชั่วโมง

Species	Strain reference	Propionic acid(g/l)	pH
P. acidipropionici	ATCC 4965	9.8	4.65
	CNRZ 287	7.5	4.67
	CNRZ 721	2.0	5.67
	CNRZ 733	0.0	4.40
P. thoenii	ATCC 4871	8.0	4.62
P. jensenii	ATCC 4870	0.0	5.82
	CNRZ 83	2.0	5.10
	ATCC 4867	0.0	5.10
	CNRZ 731	0.0	4.11
P. freudenreichii subsp. freudenreichii	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
P. freudenreichii subsp. shermanii	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

ที่มา : Colomban และ คณะ (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การวิจัย

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

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

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

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

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของบริษัท Phytotron climate simulator

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องอบลมร้อน ของบริษัท Binder

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่นLIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

โถดูดความชื้น

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

เข็มเขี่ยเชื้อ (niddle)

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX^{R}

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^{R}

กระบอกตวง (cylinder)ของบริษัท PYREX^{R}

บีกเกอร์ (beaker)ของบริษัท PYREX^{R}

ปิเปตต์ (pipette)

คิวเวต (แก้ว)

3.2 สารเคมี

ยีสต์สกัด (yeast extract)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปปโตน (peptone)

ทริปทิเคส ซอย บรอท (trypticase soy broth)

แลคโตส (lactose)

วุ้น (agar)

น้ำกลั่น

ไดโพแทสเซียสไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . 4 H_2O$)

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

3.3 วัตถุดิบ

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

3.3.1การเก็บวัตถุดิบ (เวย์)

เวย์ที่ใช้ในงานวิจัยจะเก็บที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส โดยนำมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชม.ก่อนนำไปใช้งานต่อไป

3.3.2 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ ประยุกต์จาก Kessler (1981)

นำเวย์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน ผ่านเครื่องหมุ่นเหวียง(centrifuge) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเพื่อแยกโปรตีนที่ตกตะกอนออก นำส่วนใสกรองด้วยกระดาษกรอง Glass fiber(GC-50) 2 รอบ จะได้เวย์ที่พร้อมใช้ในการทดลอง

3.4 เชื้อจุลินทรีย์

3.4.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.4.2 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) เขี่ยเชื้อจำนวน 1 ลูป แล้วจิ้ม (stap) ลงบนอาหารวุ้น MRS (ภาคผนวก ก.) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง(stationary flask)เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันจุกสำลีที่ปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.4.3 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก.) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 4 วัน เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

3.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 13 สูตร

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยมีสูตรอาหารทั้งหมด 13 สูตรดังตารางต่อไปนี้

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

หมายเหตุ + หมายถึง เติม - หมายถึง ไม่เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณสารอาหารที่ใช้ในอาหารทั้ง 13 สูตร ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ทริปทิเคสซอยบรอท 5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลแลคโตส 40 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุ 3 ตัว ได้แก่ ไดโพแทสเซียสไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร โดยอาหารสูตรที่ 1 ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย อาหารสูตรที่ 2- 13 ใช้เวย์เป็นตัวทำละลาย เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 350 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 ($\pm$ 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อจากข้อ 3.4.3 ร้อยละ 5 ลงในอาหารทั้ง 13 สูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีของ A.O.A.C.2000 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดย HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois. 1956 (ภาคผนวกข)

3.6 การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

3.6.1 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมทำโดยเลือกสูตรอาหารที่ทำให้เชื้อผลิตกรดได้ดีที่สุดจากข้อ 3.5 โดยผันแปรชนิดแหล่งไนโตรเจน ดังนี้

สูตรที่ 1 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 เติมยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งไนโตรเจนเดิม

สูตรที่ 2 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 เติมสารเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งไนโตรเจนเดิม

สูตรที่ 3 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งไนโตรเจนเดิม

สูตรที่ 4 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 เติมยูเรียความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งไนโตรเจนเดิม

สูตรที่ 5 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งไนโตรเจนเดิม

สูตรที่ 6 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 เติมแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งไนโตรเจนเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารทำโดยการเตรียมอาหารแต่ละสูตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 350 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้6.5 (± 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อจากข้อ 3.4.3 ร้อยละ 5 ลงในอาหารแต่ละสูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีของ A.O.A.C. 2000 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดย HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois. 1956 (ภาคผนวกข)

3.6.2 ศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

ศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนทำโดยเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุดจากข้อ 3.6.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนปริมาณร้อยละ 0.5 1 1.5 และ 2 ได้สูตรอาหาร 4 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.1เติมความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.5

สูตรที่ 2 :สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.1เติมความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ1

สูตรที่ 3 :สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.1เติมความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 1.5

สูตรที่ 4 :สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ3.6.1เติมความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ2

การเตรียมอาหารทำโดยการเตรียมอาหารแต่ละสูตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 350 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อจากข้อ 3.4.3 ร้อยละ 5 ลงในอาหารแต่ละสูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีของ A.O.A.C. 2000 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดย HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois. 1956 (ภาคผนวกข)

3.6.3 การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ แคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมทำโดยเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุดจากข้อ 3.6.2 โดยผันแปรความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณร้อยละ 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 ได้สูตรอาหาร 5 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.2 เติมความเข้มข้นของ $CaCO_3$ร้อยละ 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่ 2 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.2 เติมความเข้มข้นของ $CaCO_3$ร้อยละ 1

สูตรที่ 3 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.2 เติมความเข้มข้นของ $CaCO_3$ร้อยละ 1.5

สูตรที่ 4 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.2 เติมความเข้มข้นของ $CaCO_3$ร้อยละ 2

สูตรที่ 5 : สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.2 เติมความเข้มข้นของ $CaCO_3$ร้อยละ 2.5

การเตรียมอาหารทำโดยการเตรียมอาหารแต่ละสูตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 350 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 ($\pm$ 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อจากข้อ 3.4.3 ร้อยละ 5 ลงในอาหารแต่ละสูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดย HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois. 1956 (ภาคผนวกข)

3.7 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับฟลาสก์เปรียบเทียบกับการผลิตในถังหมักขนาด 2ลิตร

3.7.1 การผลิตกรดระดับฟลาสก์

การศึกษาในหัวข้อการผลิตกรดโพรพิโอนิกระดับฟลาสก์ทำโดยเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมจากที่ได้ศึกษาในข้อ 3.6 ทำการหมักในสภาพการหมักแบบกะที่สภาวะนิ่ง โดยใช้ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1.4 ลิตร (ร้อยละ 70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 ($\pm$ 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการ วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดย HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois. 1956 (ภาคผนวกข)

3.7.2 การผลิตกรดโดยใช้ถังหมัก 2 ลิตร

การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้ถังหมัก 2 ลิตรทำโดยเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมจากที่ได้ศึกษาในข้อ 3.6 มาทำการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้การหมักในถังหมัก สภาพการหมักแบบกะ ถังหมักที่ใช้ขนาด 2 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.4 ลิตร (ร้อยละ70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที (Quesada-Chanto. 1994 ; Paik and Glatz. 1994) ไม่ต้องพ่นอากาศ เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพรพิโอนิกโดย HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois. 1956 (ภาคผนวกข)

3.8 การสกัดกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ ประยุกต์จาก Zhong Gu และคณะ (1997)

การสกัดกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยเติม Dodecylamine ร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ละลายใน 2-octanol ในน้ำหมักด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกสารประกอบ acid-complex ที่สกัดได้ด้วยการกรอง โดยใช้กระดาษกรอง Glass fiber(GC-50) นำสารประกอบ acid-complex ละลายน้ำ แล้วนำมากลั่นภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 60 มิลลิบาร์ ทดสอบความบริสุทธิ์ของสารที่สกัดได้โดยเครื่อง HPLC

3.9 การศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยวิธี agar diffusion method (สมใจ ภัสสัตยางกูล. 2001)

ทดสอบประสิทธิ์ภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยวิธี Agar diffusion method ทดสอบกับเชื้อรา 5 ชนิดได้แก่ *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae., Rhizopus nigrican, Rhisopus oligosporus., ,Penicillum sp.* เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ใช้วิธี spread plate โดยทำสารละลายสปอร์ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายสปอร์ 0.1 มิลลิลิตร ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้เชื้อกระจายไปทั่วอาหาร นำแผ่นกลม(ขนาด 1 เซนติเมตร) จุ่มสารละลายกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ (ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร) กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้า(ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร) และน้ำกลั่น วางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการ spread เชื้อราเรียบร้อยแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หรือขึ้นอยู่กับการเจริญของเชื้อรา ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราวัดจากบริเวณการยับยั้ง(บริเวณโซนใส)โดยวัดส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ

3.10 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิจัยในหัวข้อ 3.6 และ 3.7 ใช้การวางแผนการทดลองทำแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิจัยในหัวข้อ 3.7 และ 3.9 ใช้การวางแผนการทดลองแบบ paired samples T-test เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ในอาหารสูตรต่างๆ 13 สูตร เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง พบว่าอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตกรดมากที่สุดคืออาหารสูตรที่ 4 และ 10 โดยอาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วย เวย์ ยีสต์สกัด ทริปทิเคสซอยบรอท และแหล่งแร่ธาตุ อาหารสูตรที่ 10 ประกอบด้วยเวย์ ยีสต์สกัด และแหล่งแร่ธาตุ ซึ่งสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 4.93 และ 5.66 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากอาหาร 13 สูตร โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici*

อาหาร	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)
สูตรที่ 1 Y+TSB+L+M	2.05^{j}
สูตรที่ 2 W+Y+L+M	4.75^{c}
สูตรที่ 3 W+TSB+L+M	3.88^{d}
สูตรที่ 4 W+Y+TSB+M	4.93^{b}
สูตรที่ 5 W+Y+TSB+L	3.34^{e}
สูตรที่ 6 W+L+M	3.35^{e}
สูตรที่ 7 W+M	2.70^{i}
สูตรที่ 8 W+L	2.74^{hi}
สูตรที่ 9 W	2.81^{gh}
สูตรที่ 10 W+ Y +M	5.66^{a}
สูตรที่ 11 W+ Y	3.95^{d}
สูตรที่ 12 W+ TSB +M	3.28^{f}
สูตรที่ 13 W+ TSB	2.84^{g}

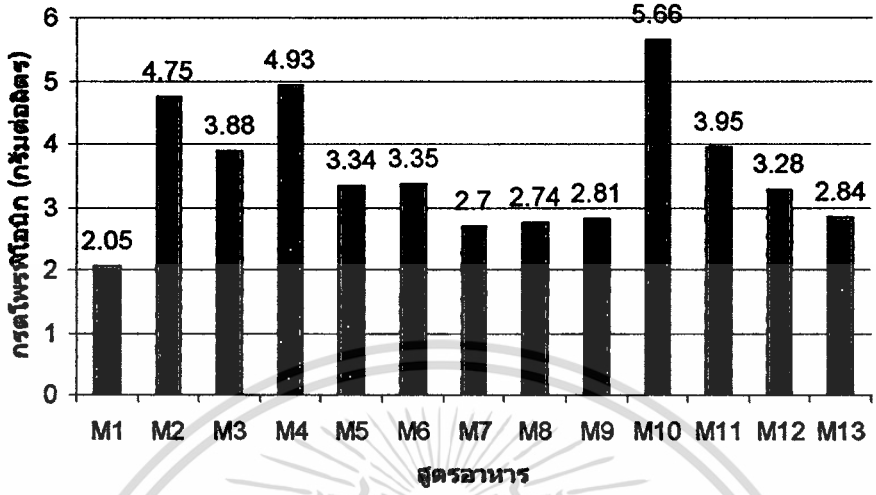
W = เวย์ TSB = ทริปทิเคสซอยบรอท Y = ยีสต์สกัด L = น้ำตาลแลคโตส M = แร่ธาตุ

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

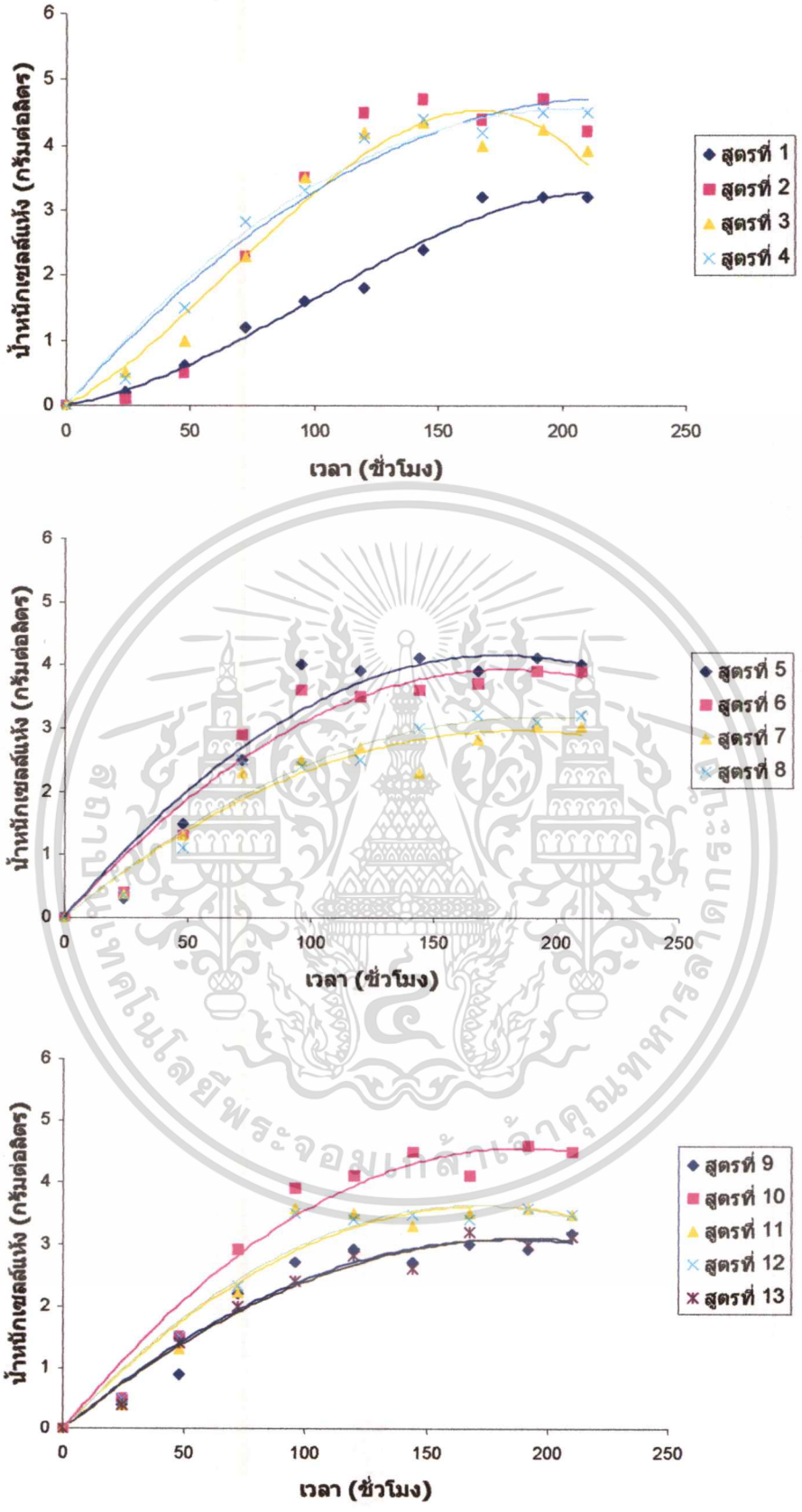


รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 13 สูตร เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยทั่วไปต้องมีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งแร่ธาตุที่เพียงพอต่อความต้องการ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรที่ใช้ในการทดลองพบว่าเวย์ที่ใช้ในการทดลองมีแหล่งคาร์บอนปริมาณที่มากเพียงพอจึงไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนอื่นๆอีก เพราะองค์ประกอบของเวย์จะมีน้ำตาลแลคโตสเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 4 และมีไนโตรเจนที่ละลายได้เป็นแหล่งไนโตรเจนแต่ปริมาณไนโตรเจนในเวย์มีปริมาณไม่เพียงพอเห็นได้จากอาหารสูตรที่ 6, 7, 8 และ 9 ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนพบว่าปริมาณกรดที่ผลิตได้มีปริมาณที่น้อยคือ 3.35, 2.7, 2.74 และ 2.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นต้องทำการเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมโดยจะเห็นได้ว่า อาหารสูตรที่ 10 มีการเติมยีสต์สกัด และสูตรที่ 4 มีการเติมยีสต์สกัดและทริปปีเคสซอยบรอทเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม ในส่วนของแร่ธาตุอาหารทั้ง 2 สูตรได้ใช้ ไดโพแทสเซียสไฮโดรเจนฟอสเฟต แมงกานีสซัลเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของอาหารทั้ง 13 สูตร พบว่าสอดคล้องกับปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งแร่ธาตุครบถ้วน (M4 และ M10) จะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าสูตรอาหารอื่นๆ แสดงดังรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 13 สูตร เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากอาหารทั้ง 13 สูตร สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุดได้แก่ สูตรอาหารที่ 10 และ 4 เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอาหารสูตรที่ 10 และ 4 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยอาหารสูตรที่ 10 ใช้ปริมาณสารอาหารน้อยกว่าสูตรที่ 4 แสดงว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนหลายชนิดไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิต (Border และคณะ. 1987) ถ้ามีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่มากเพียงพอ โดยเมื่อเติมทั้งยีสต์สกัด และทริปปีเคสซอยบรอท(M4)ให้การผลิตกรดโพรพิโอนิกน้อยกว่าการเติมยีสต์สกัดเพียงอย่างเดียว(M10) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกอาหารสูตรที่ 10 ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยเวย์ ยีสต์สกัด และแหล่งแร่ธาตุ เป็นแนวทางในการปรับปรุงเวย์เพื่อให้เป็นซับสเตรตในการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่อไป

4.2 ผลการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

4.2.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยใช้สูตรอาหารที่ 10 โดยผันแปรชนิดแหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัด เปปโตน โมโนโซเดียมกลูตาเมต ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต ทำการหมักเป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้และปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ ในชั่วโมงที่ 210 เพื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

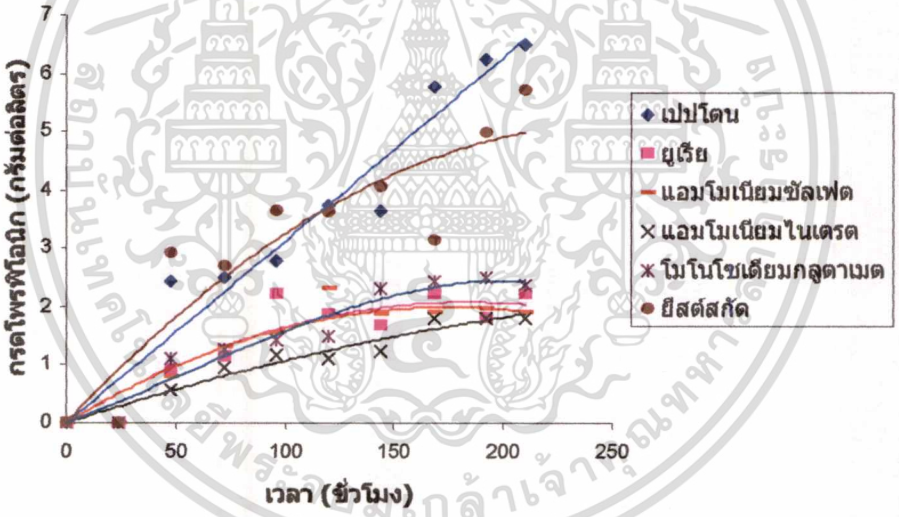
แหล่งไนโตรเจน	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ (ร้อยละ)
ยีสต์สกัด	5.63[b]	47.50
เปปโตน	6.46[a]	52.50
โมโนโซเดียมกลูตาเมต	2.24[c]	27.10
ยูเรีย	2.17[c]	24.60
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.87[d]	22.50
แอมโมเนียมไนเตรต	1.78[d]	20.30

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิจัยพบว่าเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด รองลงมาคือยีสต์สกัดโดยสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 6.46 และ5.63 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า เปปโตนและยีสต์สกัดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ราคาของเปปโตนจะมีราคาแพงมากกว่ายีสต์สกัด รวมทั้งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่จะใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Colomban และคณะ (1993) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้แหล่งไนโตรเจนได้แก่ ยีสต์สกัด ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด และโปรตีนเวย์เข้มข้น พบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด โดยสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกจะได้ปริมาณสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ และการทดลองของ Yang และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในเวย์เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ คือ ทริปทิเคสซอยบรอท ยีสต์สกัด และ พบว่าจะได้ปริมาณกรดสูงสุดเมื่อใช้ ยีสต์สกัด และทริปทิเคสซอยบรอทเติมลงไปในเวย์ปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

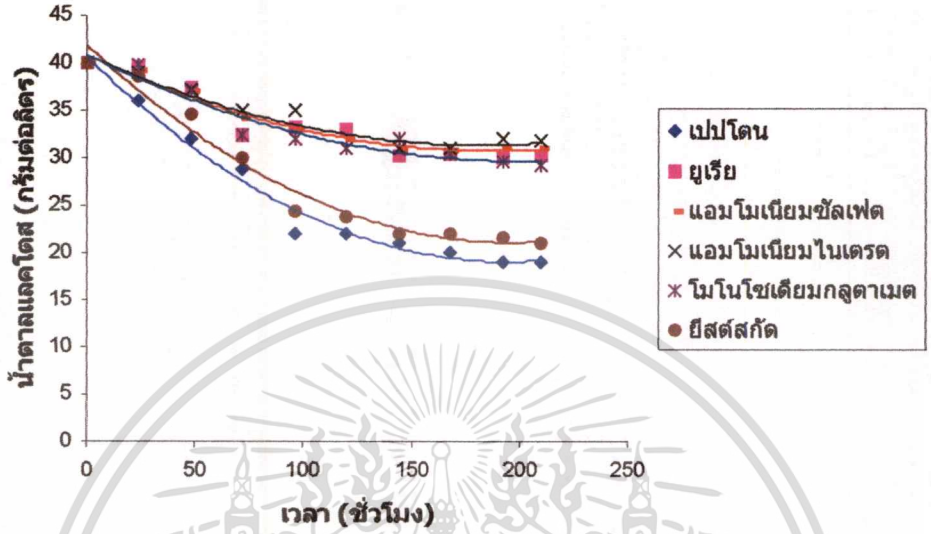


รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

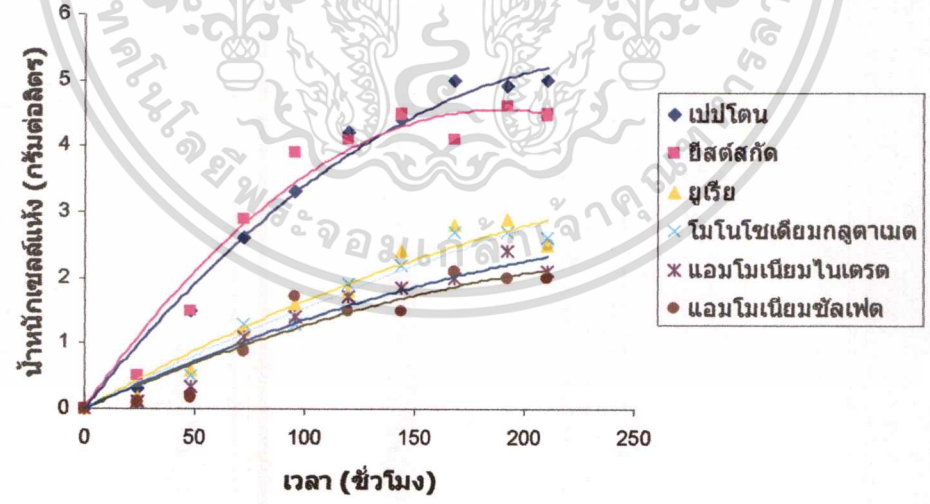
เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลพบว่าปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 0-100 ชั่วโมงและลดลงอีกเล็กน้อยจนสิ้นสุดการทดลอง สูตรอาหารที่ใช้ ยีสต์สกัด เปปโตน โมโนโซเดียมกลูตาเมต ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 47.5, 52.5, 27.1, 24.6, 22.5 และ 20.3 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.4 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิต และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าสูตรอาหารที่ใช้ยีสต์สกัดและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าสูตรอาหารที่ใช้ แหล่งไนโตรเจนอื่นๆ แสดงดังรูป 4.5



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือในการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์สกัดผลิตจากการเซลล์ยีสต์เป็นสารอาหารที่มีความอุดมสมบรูณ์สูงประกอบด้วยโปรตีนและองค์ประกอบอื่นๆเช่น ไทอามีน นิโคตินิก แพนโตธีนิก และไบโอติน ซึ่งเป็นสาเหตุให้อาหารเลี้องเชื้อที่มียีสต์สกัดเป็นส่วนประกอบเป็นอาหารที่อุดมสมบรูณ์สูงเหมาะสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก (Hsu และYang. 1991 ; Jain และคณะ. 1991 ; Colomban และคณะ. 1993) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการปรับปรุงเวย์เพื่อให้เป็นซับสเตรตในการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่อไป

4.2.2 ผลศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยใช้อาหารสูตรที่10 โดยผันแปรความเข้มข้นของยีสต์สกัด คือ ร้อยละ 0.5, 1, 1.5 และ 2 เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ ที่ชั่วโมง 210 เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เหมาะสม

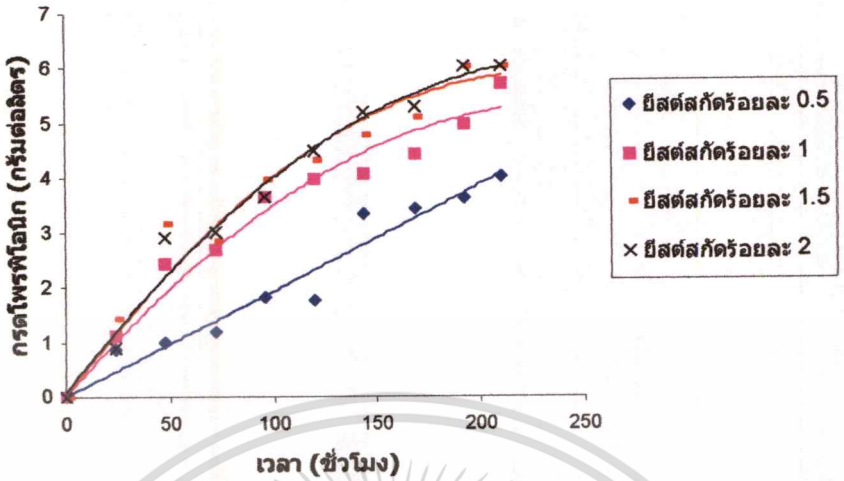
ปริมาณยีสต์สกัด	กรดโพรพิโอนิก(กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ (ร้อยละ)
ร้อยละ 0.5	3.92[c]	18.27
ร้อยละ 1	5.69[b]	47.50
ร้อยละ 1.5	5.93[a]	50.00
ร้อยละ 2	5.95[a]	50.00

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

พบว่าความเข้มข้นของยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 จะผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ต่ำที่สุดคือ 3.92 กรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นของยีสต์สกัดร้อยละ 1, 1.5 และ 2 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 5.69, 5.93 และ 5.95 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัดร้อยละ 1.5 และ 2 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพราะเนื่องมาจากยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดมากขึ้นจึงไม่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

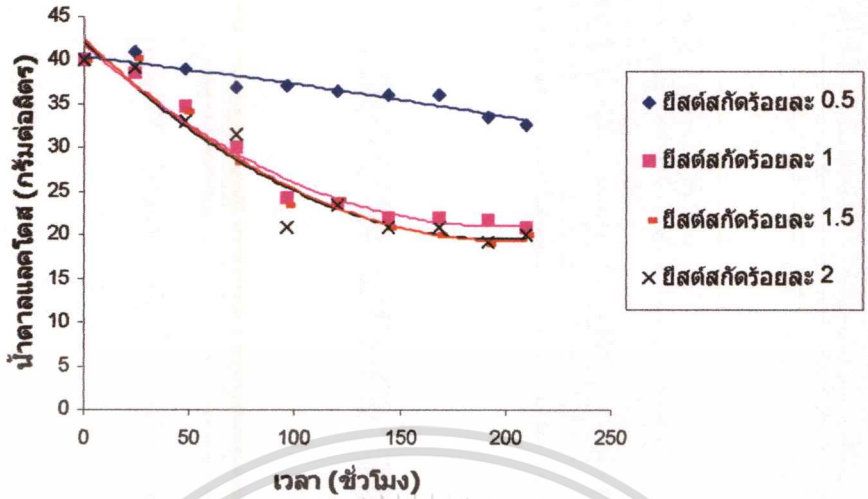


รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัด เมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

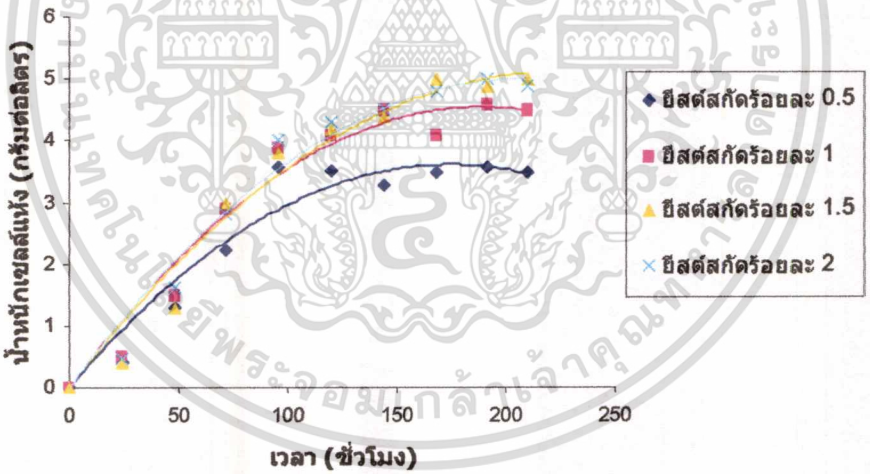
เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลพบว่าปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 0-100 ชั่วโมงและลดลงอีกเล็กน้อยจนสิ้นสุดการทดลอง สูตรอาหารที่ใช้ ยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1, 1.5 และ 2 เป็นแหล่งไนโตรเจนเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 18.27, 47.5, 50 และ 50 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.7 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น จากการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แห้งพบว่าสูตรอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดร้อยละ 1.5 และ 2 เป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า สูตรอาหารที่ใช้ ความเข้มข้นของยีสต์สกัดระดับอื่น แสดงดังรูป 4.8

โดยจากการวิจัยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดเพิ่มมากขึ้นจากร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 1.5 และร้อยละ 2 แต่ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อคิดในเชิงเศรษฐศาสตร์จึงไม่มีความจำเป็นในการใช้ความเข้มข้นในปริมาณที่สูงเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ร้อยละ 1 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Yang และ Huang (1995) โดยทำการศึกษาการหมักแบบกะของ *Propionibacterium acidipropionici* พบว่าเมื่อเพิ่มยีสต์สกัดร้อยละ 1 ลงในอาหารจะได้อัตราการผลิต 0.68 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ซึ่งมากกว่าอาหารที่ไม่เติมยีสต์สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

4.2.3 ผลการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ แคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุ 3 ตัว ได้แก่ ไดโพแทสเซียสไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวย์เป็นตัวทำละลาย ทำการทดลองผันแปรความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณร้อยละ 0.5, 1, 1.5, 2และ2.5 เป็นเวลา 566 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้และปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ ชั่วโมงที่ 566 เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

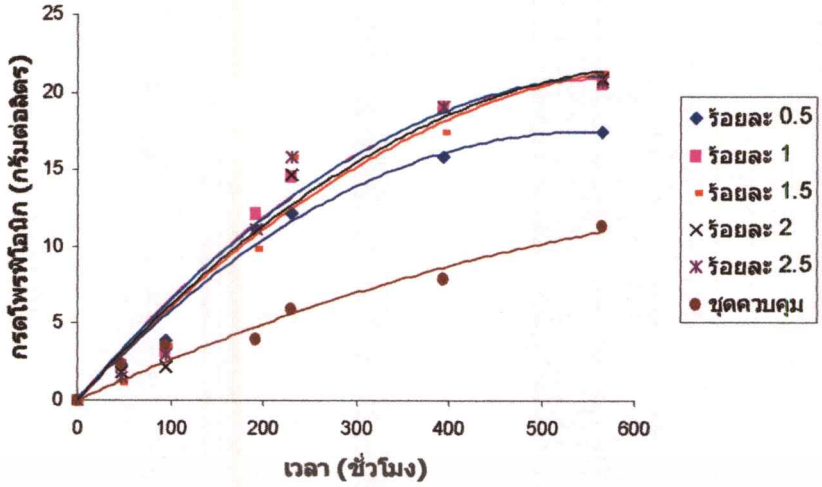
ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ (ร้อยละ)
ร้อยละ 0.5	17.36[b]	70.70
ร้อยละ 1	20.58[a]	94.25
ร้อยละ 1.5	20.78[a]	96.25
ร้อยละ 2	20.69[a]	99.50
ร้อยละ 2.5	20.66[a]	97.50
ชุดควบคุม (ไม่เติม$CaCo_3$)	11.30[a]	60.00

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

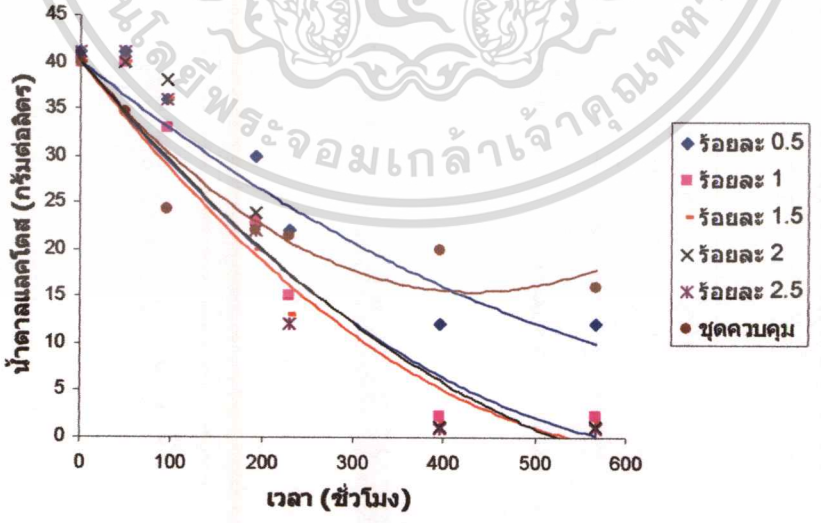
จากการทดลองพบว่าแคลเซียมคาร์บอเนตมีความสำคัญต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกอย่างมากดูได้จากชุดควบคุมที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดียวกันแต่ไม่ได้เติมแคลเซียมคาร์บอเนตสามารถผลิตกรดได้ 11.30 กรัมต่อลิตรที่ 566 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 พบว่าสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 17.36, 20.58, 20.78, 20.69 และ 20.66 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1, 1.5, 2 และ 2.5 ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ความสามารถในการผลิตกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้นสูงมาก เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เพราะแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารที่ช่วยรักษาค่าพีเอช(บัพเฟอร์) โดยแคลเซียมคาร์บอเนตเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดโพรพิโอนิกจะได้เกลือแคลเซียมโพรพิโอเนตและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลช่วยลดปฏิกิริยาการยับยั้งเชื้อโดยกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นยังมีผลช่วยให้เกิดสภาวะไม่มีอากาศให้สมบรูณ์มากขึ้น (Altaf และคณะ. 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 566 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลพบว่าปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างต่อเนื่องซึ่งต่างจากการใช้น้ำตาลที่ผ่านมาเป็นผลมาจากแคลเซียมคาร์บอเนต สูตรอาหารที่ใช้เข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณร้อยละ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 เมื่อสิ้นสุดการทดลองปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ70.7, 94.25, 96.25, 99.5 และ 97.5 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตพบว่า ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ60 แสดงดังรูปที่ 4.10 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้



รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมเมื่อทำการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นเวลา 556 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิจัยพบว่าถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตจากความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 1.5 และ 2 แต่การผลิตกรดโพรพิโอนิกไม่ได้เพิ่มขึ้น เพราะฉะนั้นจึงไม่มีความจำเป็นในการใช้ความเข้มข้นในปริมาณที่สูงเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ร้อยละ 1 ในการปรับปรุงเวย์เพื่อให้เป็นซับสเตรตในการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่อไป

4.3 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับฟลาสก์เปรียบเทียบกับการผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุ 3 ตัว ได้แก่ ไดโพแทสเซียสไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวย์เป็นตัวทำละลาย ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกระดับฟลาสก์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 300 ชั่วโมง และศึกษาการผลิตกรดโดยใช้ถังหมัก 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที และมีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 ตลอดการทดลองเป็นเวลา 300 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 14.2 และ 15.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.11 เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลให้ผลสอดคล้องกับปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ แสดงดังรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ผลผลิต อัตราการผลิต และ ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและถังหมักขนาด 2 ลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงค่า P-value ของการเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้ถังหมักและฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้ วิธี T-test

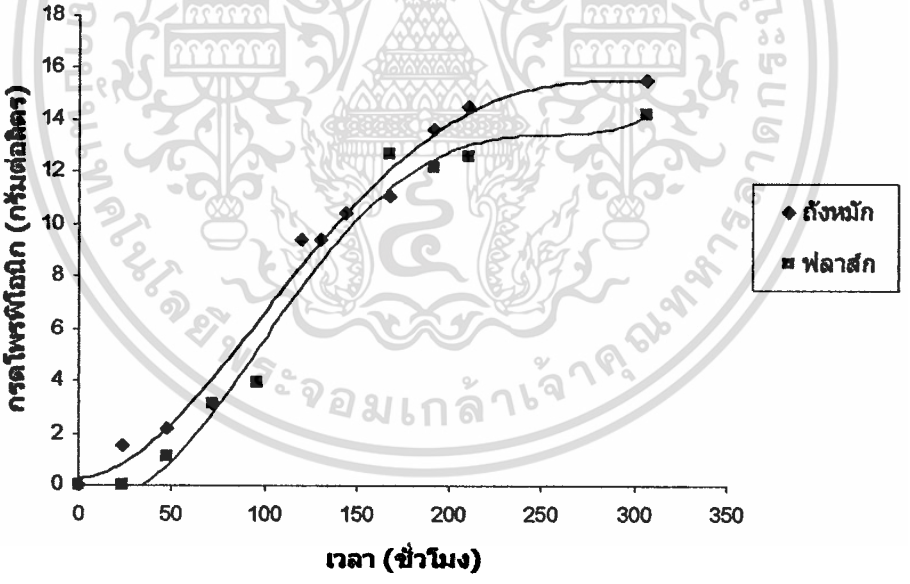
	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (Yield)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง)
ฟลาสก์	14.2	0.36	0.071
ถังหมัก	15.5	0.39	0.077
ค่า p-value	0.085^{ns}	0.319^{ns}	0.234^{ns}

หมายเหตุ

** ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

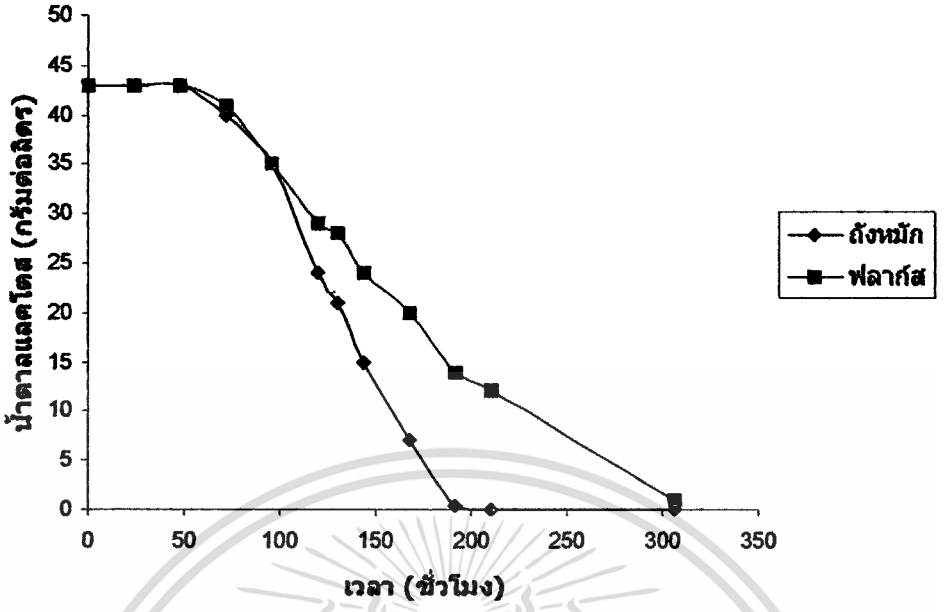
* ค่า p-value อยู่ในช่วง 0.01 < p-value < 0.05 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

ns ค่า p-value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ ในการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลือในการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร

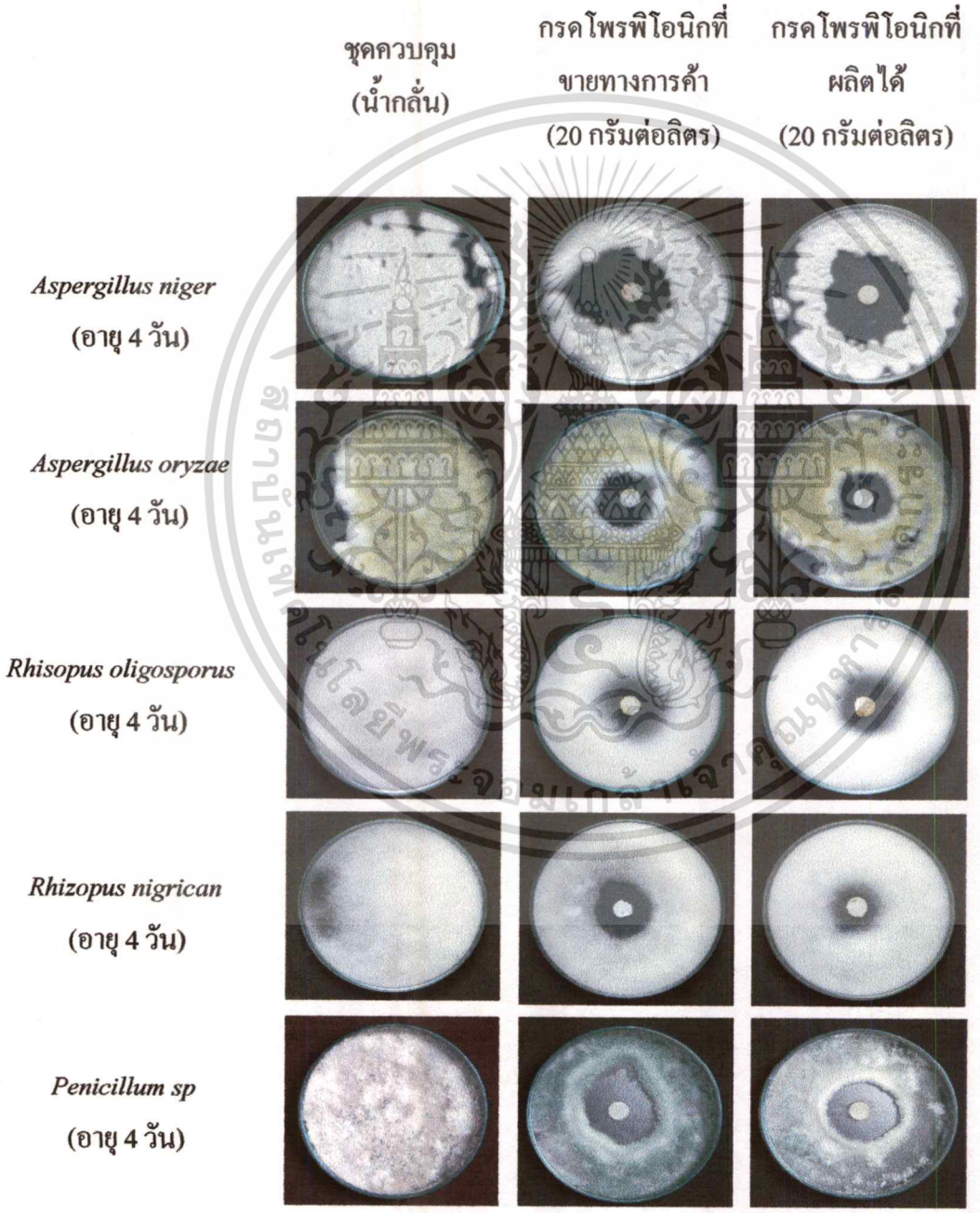
จากการทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยใช้ถังหมักและฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 15.5 และ 14.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าทั้งการผลิตโดยใช้ถังหมักและฟลาสก์ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.6 แต่อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกของถังหมักจะสูงกว่าระดับ ฟลาสก์ซึ่งให้ค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.077 และ 0.071 ตามลำดับ เพราะในถังหมักมีการกวนซึ่งช่วยให้เชื้อผสมคลุกเคล้ากับอาหารทำให้เชื้อได้รับอาหารอย่างทั่วถึงดูได้จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลจากรูปที่ 4.12 พบว่าการใช้น้ำตาลของเชื้อที่เลี้ยงในถังหมักลดลงเร็วกว่าการใช้น้ำตาลของเชื้อที่เลี้ยงในฟลาสก์ โดยในถังหมักปริมาณน้ำตาลจะหมดลงที่ชั่วโมงที่ 200 ซึ่งเร็วกว่าฟลาสก์ซึ่งหมดลงที่ชั่วโมงที่ 300 โดยปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 100 เหมือนกันทั้งพลาส์กและถังหมัก และการควบคุมพีเอชช่วยทำให้เชื้อสามารถสร้างกรดโพรพิโอนิกได้อย่างต่อเนื่องแม้จะผ่านการหมักมาเป็นเวลานาน ทั้งนี้การศึกษาระดับฟลาสก์เมื่อมีการผลิตกรดเป็นเวลานานพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงจนในที่สุดเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้อีกต่อไป

เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณกรดที่ผลิต ผลผลิต และอัตราการผลิต ที่ผลิตในถังหมักและฟลาสก์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักจะเร็วกว่าในฟลาสก์ โดยใช้เวลา 200 และ 300 ชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยวิธี Agar diffusion method

เมื่อนำกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ทดสอบการยับยั้งเชื้อราเปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายด้วยวิธีทางเคมี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.13 กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตทางวิธีทางชีวภาพมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้เช่นเดียวกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี ดังตารางที่ 4.7



รูปที่ 4.13 แสดงผลของกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ด้วยวิธีชีวภาพในการยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิดด้วยวิธี agar diffusion method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงค่า p-valueของการเปรียบเทียบระหว่างกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าและกรดที่ผลิตได้ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยวิธี T- test ในการยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิด

	Aspergillus niger	*Aspergillus oryzae*	*Rhizopus nigrican*	*Rhisopus oligosporus*	*Penicillum sp*
บริเวณยับยั้งของกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้า (เซนติเมตร)	4.2	3	3	3.7	4.1
บริเวณยับยั้งของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ (เซนติเมตร)	4.0	2.8	2.76	3.5	4.0
ค่า p-value	0.178^{ns}	0.07^{ns}	0.99^{ns}	0.178^{ns}	0.089^{ns}

หมายเหตุ ** ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

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

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

จากการทดลองพบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพที่มีความเข้มข้น 20กรัมต่อลิตรมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Rhizopus nigrican, Rhisopus oligosporu, Penicillum sp.* ได้บริเวณยับยั้ง 4.0, 2.8, 2.76, 3.5 และ 4 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้าที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรได้บริเวณยับยั้ง 4.2, 3.0, 3.0, 3.7 และ 4.1 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้าที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันพบว่าบริเวณยับยั้งมีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ากรดโพรพิโอนิกทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งมีการศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่มีต่อเชื้อราของ Lind และคณะ .2005 ได้ศึกษาผลของกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici, P. freudenreichil* subsp. *Shermanii, P. freudenreichil* subsp.*freudenreichii, P. theonil* และ *P. jensenil* ในการยับยั้งเชื้อยีสต์และรา พบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากวิธีทางชีวภาพสามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa, Kluyveromyces marxianus* และ เชื้อรา *Penicillium roqueforti, Aspergillus fumigatus* แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราจะดีกว่าเชื้อยีสต์ โดยดูจากบริเวณยับยั้งของเชื้อราที่มีขนาดใหญ่กว่าเชื้อยีสต์

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 พบว่าเวย์ที่นำมาเป็นซับสเตรตมีแหล่งคาร์บอนที่อุดมสมบูรณ์แต่แหล่งไนโตรเจนและแหล่งแร่ธาตุยังมีไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ดังนั้นในการนำเวย์มาใช้จึงจำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจนและแหล่งแร่ธาตุ และปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกอีกที่สำคัญที่สุดคือ แคลเซียมคาร์บอเนต โดยสามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต คือ ใช้เวย์เป็นตัวทำละลาย เติมยีสต์สกัดปริมาณร้อยละ 1 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณร้อยละ 1 เติมแหล่งแร่ธาตุ ซึ่งประกอบด้วยไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรกับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิต ผลผลิต และอัตราการผลิต ที่ผลิตในถังหมักและฟลาสก์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักจะเร็วกว่าในฟลาสก์ โดยใช้เวลา 200 และ 300 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ทดสอบการยับยั้งเชื้อราเปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายด้วยวิธีทางเคมี พบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตทางวิธีทางชีวภาพมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ช่นเดียวกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กุลยา จันทร์อรุณ. 2533. **เคมีอาหาร.** ภาควิชาตำราและเอกสารวิชาการ หน่วยศึกษานิเทศน์ กรมการฝึกหัดครู, กรุงเทพฯ. 315 หน้า.

ชลัท ศานติวรางคณา. 2534. **การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเครื่องดื่มจากเวย์.** ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร.คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

ประวัติ ตันบุญเอก, ดารา พวงสุพรรณ, ปริศนา เหมสุจิ และอรุณี วงษ์อุไร. 2525. **การศึกษาสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดสารพิษแอลฟลาทอกซิน.** รายงานผลการวิจัย พ.ศ. 2525 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2532. **เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการนมและผลิตภัณฑ์นม.** ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง , กรุงเทพฯ.

สมใจ ภัสสัตยางกูล. 2537. **การศึกษาวิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ และการนำไปปรับใชในการผลิตสารเมตาบอไลท์จากแบคทีเรียโพรพิโอนิก.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ. 2526. การผลิตผลิตภัณฑ์นมและการจัดการ. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเกี่ยวกับเทคโนโลยีอาหารนม ชุดที่ 3 . สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์, เชียงใหม่. 262 หน้า.

ศิวาพร ศิวเวช. 2546. **วัตถุเจือปนในอาหาร.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 169 หน้า.

Alfa – Laval. 1987. **Dairy Handbook**. Food Engineering AB, Sweden. 333 p.

Arasaratnam, V., Senthuran, A. and Balasubramaninm, K. 1996. "Supplementation of whey with glucose and different nitrogen source for lactic acid production by *Lactobcillus delbrueckii*". **Enzyme and Microbial Technology**. 19 : 482 – 486.

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

: 441 – 446.

Bogdanova, G.J. 1974. "New whole Products of improve quality (in Russian)". **Moscow. Pishcevaya Promishlenost.**

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

Braner, A.L., Davidson P.M. and S. Salminen. 1990. **Food additive**. Marcel dekker, Inc., New York. 760 pp.

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.

Cavin, J.F., Saint, C. and Divies, C. 1985. "Continuous production of Emmental cheese flavous and propionic acid starters by immobilized cells of a propionic acid bacterium". **Biotechnology Letter.** 7 : 821 – 826.

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. et.al. 1990. "Modeling of immobilized cell reactor for propionic acid fermentation". **Biotechnology and Bioengineering**. 36 : 705 – 716.

Czaczyk, K., Trojanowska, K. and Albrecht A. 1995. "Batch production of propionic acid by immobilized *Propionibacterium* sp. **Folia Microbiology.** 40 : 337-340.

Daniel, R. 1995. **Microbial Physiology and Metabolism**. Wm.C. Brown Communication, Inc.

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.

Fitzpatrick, J.J. and O'Keeffe, U. 2001. "Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid". **Process Biochemistry**. 37 : 183 – 186.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gebgardt, A.G., Kucheras, R.V., Laska, D.V. and Vogrin, A.G. 1970. "The interrelationship of nitrogen metabolism with the cabamide synthetic ability of *Propionibacterium shermanii*" . **Microbiology**. 39 : 380 – 384.

Goswami, V. and Srivastava, A.K. 2000. "Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*". **Journal Biochemical Engineering**. 4 : 121 – 128.

Gu, Z., Glatz, B.A. and Glatz, C.E. 1998. "Propionic acid production by extractive fermentation I. solvent considerations". **Biotechnology and Bioengineering.** 57 : 454-461.

Gurr, M.J., Marshall, V.M. and Fuller, F. 1984. "Fermented milk". **Intestinal microflora and nutrition In Fermente Milk**. IDF Bulletin Dee. 179 : 54-59.

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.

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

Hussong, R.V., Morth, E.H. and Vahaleris, D.G. 1973. **Cheese marking technology.** Noyes Data Corporation, Park Rideg, New Jersey : 7-12.

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

Kadam, S., Patil, S., Bastawde, K., Khire, J. and Gokhale, V. 2006. " Strain improvement of *Lactobcillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production". **Process Biochemistry.** 41 : 120 – 126.

Kertes, A.S. and King, C.J. 1986. "Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids". **Biotechnology of Bioengineering.** 28 : 269-282.

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

Kosikowski, F.V. 1977. **Cheese and fermented milk foods. Enwards Erothers,** Inc. Ann Arbor. Michigan : 701.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kurosawa, H.,Ishikawa, H. and Tanaka, H. 1988. "L- lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*". **Biotechnolog and Bioengineering** . 31 : 183 – 187.

Lewis, V. and Yang, S.1992(a). "Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* :effect of growth substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 37 : 437 – 442.

_____1992(b). "A novel extractive fermention process for propionic acid production from whey lactose". **Biotechnology Program.** 8 : 104-110.

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

Michelson, T., Kask, K., Jogi, E., Talpsep, E., Suitso, I. and Nurk, A. 2006. "L(+)-lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7DSM 14043 and its comparison with *Lactobcillus delbrueckii* ssp. *lactic* DSM 20073". **Enzyme and Microbial Technology**. 39 : 861 – 867.

Marshall, K.R. 1982 . Industrial isolation in developments in dairy chemistry. **Journal Applied Science.** 339 – 373.

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.

Menon, A. and Shemin, D. 1967. "Concurrent decrease of enzymic activities concerned with the synthesis of coenzyme B12 and of propionic acid in *Propionibacteria*". **Archricultural Biochemistry and Biophysiology**. 121 : 304 – 310.

Nielsen, E.W. and Ullum, J.A. 1989. **Dairy Technology**. Danish Turnkey Dairies Ltd., New York. 418 p.

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

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Papoutsakis, ET.and Meyer, CL. 1985. "Fermentation equations for propionic acid bacteria and production of assorted oxychemicals from various sugars". **Biotechnology bioengineering.** 27 : 67-80.

Pederson, A.H and Warner, H. 1978. **IDF Bull.** 106 p.

Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. **Industrial Microbiology**. 3rd ed. Mc Graw Hill Co, Inc., New York. 350 p.

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.

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 hemicellulose to propionic acid". **Enzyme and Microbial Technology**. 22 : 292 – 295.

Renner, E., 1983. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition**, Verl. Munchen.

Ricker, N.L., PittMan, E.F. and King, C.J. 1980. "Solvent extraction with amines for recovery of acetic acid from dilute aqueous industrial streams". **Journal of Separation Process Technology.** 1(2) : 23-30.

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

Schuppert, B., Schink, B. and Trosch, W. 1992. "Batch and continuous production of propionic Acid from whey permeate by *Propionibacterium acidi-propionici* in a three-electrode amperometric culture system". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 37 : 549 – 553.

Seshadri, N. and Mukhopadhyay, S.N. 1993. "Influence of environmental parameters on propionic acid upstream bioprocssing by *Propionibacterium acidipropionici*". **Journal of Biotechnology**. 29 : 321 – 328.

Shaposhrikow, V.N. and Vorob'eva, L.I. 1963. "Development of propionic acid bacteria and synthesis of vitamin B12 in synthetic and natural media". **Microbiology**. 32 : 204 – 208.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tamada, J.A. and King, C.J. 1990. "Extrction of carboxylic acids with amine extractants 3.Effect of temperature, water coextraction, and process considerations". **Indian Engineering Chemical Research.** 29 : 1333-1338.

Thompson, R.C. 1943. "The B-vitamin requirement of the Propionibacteria". **Journal of Bacteriology**. 46 : 99 – 104.

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

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.

Vandegraft, E.E., Hesseltine, C.W. and Shotwell, O.L. 1975. " Grain preservative : Effect on Aflatoxin and ochratoxin production". **Cereal Chemists**. 52 : 79 – 84.

Wardell, J.M. and King, C.J. 1978. "Solvent equilibria for extraction of carboxylic acids from water". **Journal of Chemical Engineering.** 23(2) : 144-148.

Webb, B.H.and Whitter, O.R. 1970. **Byproduct from milk**. 2nd. Edition. The AVI Publ. Co.Inc. Westprot, Connecticut : 428.

Wennersten, R. 1983. "The extraction of citric acid from fermentation broth using a solution of a tertiary amine". **Journal of Chemists Technology and Biotechnology.** 33 : 85-94.

Westerguard, V. 1983. **Milk Powder Technology Evaporations and Spray Drying**. A/S Niro-Atomizer, Copenhagen, Denmark. 147 p.

Woskow, S.A. and Glatz, B.A. 1991. "Propionic acid production by a propionic acid-tolerant of *P. acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation". **Applied Environment Microbiology**. 57 : 281-288 .

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

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

Yang, S.T., white, S.A. and Hsu, S.T. 1991. "Extraction of carboxylic acids with tertiary and quarternary amines : effect of pH". **Indian Engineering Chemical Research**. 30 : 1335-1342.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://www.firehouse.com/mz/images/2003/9/12_organic3.gif

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

http://www.bio-pro.de/.../ ulm/aknebakterium_338x261.jpg

http://www.ratjes.nl/ lactose.html

http://en.wikipedia.org/wiki/Propionic_acid

http://www.betterhumans.com/.../ Contex/2004-07-29-1.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

(meat extract)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมซิเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . 4 H_2O$)	0.05	กรัม

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

(meat extract)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไตรแอมโมเนียมซิเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . 4 H_2O$)	0.05	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมี

สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 3

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (โดยชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : กรดฟอสฟิวริก (H_3PO_4) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (โดยตวงกรดฟอสฟิวริก 3.4 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลแลกโตส วิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dobois. 1956)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. คิวเวตแก้ว
3. ปิเปต
4. Stirrer

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)
2. ฟีนอล 5% โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายแลคโตสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งแลคโตสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแลคโตสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่	สารละลายแลคโตส (400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายแลคโตสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0	1000	0
2	25	975	10
3	50	950	20
4	100	900	40
5	125	875	50
6	200	800	80

วิธีการ

1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายแลคโตสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

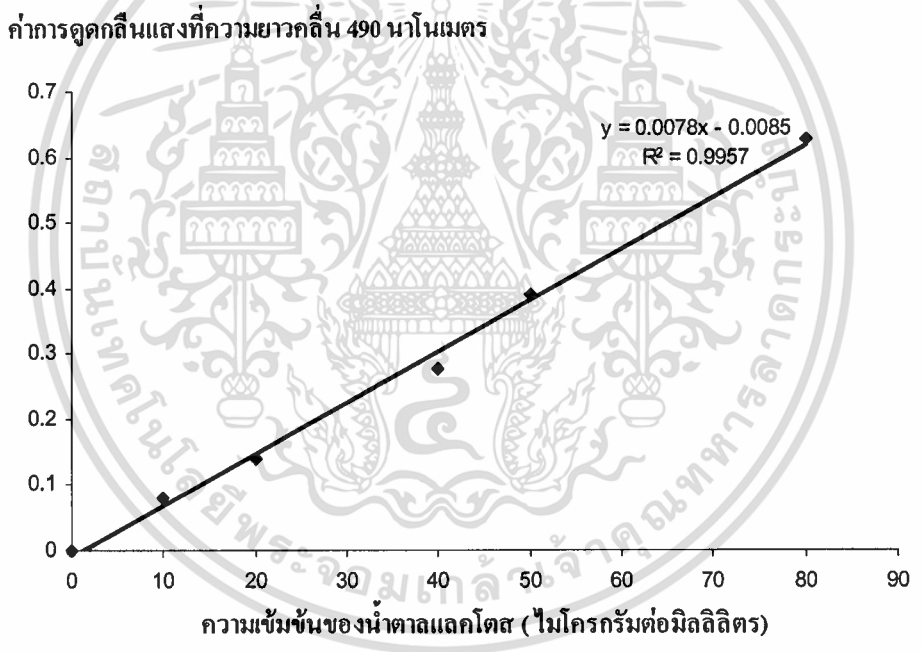
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆปล่อยลงที่ข้างหลอด

3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของแลคโตสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของแลคโตส(กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร)x(อัตราการเจือจาง)}}{\text{(ความชันของกราฟมาตรฐาน)x(1,000)}}$$



รูปที่ ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้น 0 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกด้วย HPLC

2.1 สภาวะที่ใช้ในวิเคราะห์กรดโพรพิโอนิกด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะที่ใช้ในวิเคราะห์กรดโพรพิโอนิกด้วยเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

คอลัมภ์ : Inertsil C8-3

เฟสเคลื่อนที่ : โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตรตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ : 20 ไมโครลิตร

เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง : 30 นาที

เครื่องตรวจสอบ : เครื่อง UV visible ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

การเตรียมตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ : ตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้มาจากส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงจากตัวอย่างที่เก็บเพื่อทำการวิเคราะห์ทุกชั่วโมง กรองส่วนใสผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อนการวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วย HPLC

2.2 การขั้นตอนการใช้เครื่อง HPLC

2.2.1 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

1. เปิดเครื่องทุกยูนิตของ HPLC
2. ยก Sinker ใส่ในขวดของ เฟสเคลื่อนที่
3. เปิด Drain ของปั้มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั้ม
4. ให้สังเกตว่าในสายของ Sinker มีฟองอากาสอยู่รึเปล่า ถ้ายังมีอยู่ให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
5. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจนปั้มหยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ปั้มหยุดทำงาน
6. ปิด Drain valve ที่ปั้ม
7. ตั้งค่าอัตราการไหล, ค่าความดันสูงสุด และค่าความดันต่ำสุด ที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับปั้ม (ค่าความดันสูงสุดคือความดันที่คอลัมภ์สามารถรับได้สูงที่สุด)
8. ตั้งพารามิเตอร์ให้กับเครื่องตรวจสอบ
9. สั่งให้ปั้มทำงานตามสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.2.2 ขั้นตอนการเปลี่ยน เฟสเคลื่อนที่

1. ปิดปั้ม HPLC
2. เทเฟสเคลื่อนที่ใหม่ลงในบีกเกอร์
3. เปิด Drain ของปั้มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั้ม
4. ยก Sinker ออกจากเฟสเคลื่อนที่เก่า แล้วจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มีเฟสเคลื่อนที่ใหม่อยู่
5. รอจนปั้มดูดเฟสเคลื่อนที่ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20 – 30 มิลลิลิตร
6. ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของ Sinker ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาด แล้วนำ Sinker จุ่มลงในขวดของ เฟสเคลื่อนที่ ใหม่
7. ในระหว่างขั้นตอนที่ 1- 6 ถ้าปั้มหยุดทำงาน ให้กดปุ่ม Purge อีกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ให้สังเกตว่าสายของ Sinker มีฟองอากาศอยู่หรือเปล่า ถ้ายังมีให้กด Purge ให้ ปั๊ม ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
9. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจนปั๊มหยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ปั๊มหยุดทำงาน
10. ปิด Drain valve ที่ปั๊มแล้วสั่งให้ปั๊มทำงานตามสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

หมายเหตุ : การเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ต้องคำนึงถึงด้วยว่าเฟสเคลื่อนที่เก่าและใหม่เข้ากันหรือเปล่า ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันได้ต้องใช้สารชนิดอื่นเป็นตัวเชื่อมกลาง โดย run เฟสเคลื่อนที่ ตัวเชื่อมกลางอย่างน้อย 20 นาที

ตัวอย่าง 1.) **Buffer Solution** ⟶ **น้ำกลั่น HPLC** ⟶ **Polar Origanic Solvent**

2.) **Non Polar Solvent** ⟶ **Iso–propanol Polar** ⟶ **Organic Solvent**

2.2.3 ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง

1. ตรวจดูสถานะของเครื่องแสดงผลให้อยู่ในสถานะ Ready
2. ตรวจดูให้แน่ใจว่าเครื่องตรวจสอบอยู่ในสถานะ Ready
3. รอจน Baseline ค่อนข้างนิ่ง
4. ถ้า Baseline นิ่งอยู่ที่ตำแหน่งสูงกว่าศูนย์เล็กน้อย สามารถสั่งศูนย์อัตโนมัติกด Z
5. ทำการฉีดตัวอย่าง

ตัวอย่าง การฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC

ล้างเข็มฉีดตัวอย่างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง

↓

ล้าง เข็มฉีดตัวอย่างด้วยตัวอย่างที่ต้องการจะฉีด 3 ครั้ง

↓

ดูดตัวอย่างโดยไม่ให้มีฟองอากาศในเข็มฉีดตัวอย่างแล้ว

ปรับปริมาตรให้ได้ตามที่จะฉีดเข้าระบบ HPLC

↓

แทงเข็มเข้าไปใน injector ให้สุด โดย injector ต้องอยู่ที่ตำแหน่ง **INJECT**

↓

ฉีด sample เข้าไปใน sample loop ของ injector

(ถ้าต้องการ fill sample ให้เต็ม loop ต้องฉีด sample มากกว่า valumm ของ loop ≥ 5 เท่า)

↓

เมื่อ HPLC system พร้อม ให้บิด injector มาตำแหน่ง **LOAD**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(กรณีที่ไม่มี Auto – start ให้กดปุ่ม **START ที่ C – R7**)

↓

รอประมาณ 5-10 วินาที แล้วดึง เข็มฉีดตัวอย่าง ออกจาก injector

↓

ล้าง injector ด้วยน้ำกลั่น 5-10 ml แล้วตามด้วยอากาศ 10-20 ml โดยใช้เข็มฉีดตัวอย่างพลาสติก

↓

เตรียมพร้อมฉีดตัวอย่างต่อไป

2.2.4 ขั้นตอนการปิดเครื่อง

1. หลังจาก ฉีดตัวอย่างสุดท้ายเสร็จแล้ว ให้ Run เฟสเคลื่อนที่ ต่ออีกประมาณ 30 นาที
2. สั่งปิดปั้ม
3. ปิดเครื่อง HPLC แล้วยก Sinker ให้พ้นเฟสเคลื่อนที่

หมายเหตุ : กรณีที่จะหยุดใช้ เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

2.2.5 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

1. Run เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run เฟสเคลื่อนที่ใช้เก็บคอลัมภ์ 30 นาที
3. ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

หมายเหตุ

1. การเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้งานมาเป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้เก็บคอลัมภ์ ต้องระวังการผสมกันระหว่าง เฟสเคลื่อนที่ทั้ง 2 ว่าสามารถผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันได้ดีต้องมีเฟสเคลื่อนที่ขั้นกลางอย่างละ 30 นาที
2. การล้างใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที หรือน้อยกว่า ขึ้นกับชนิดของคอลัมภ์

<u>ตัวอย่าง</u> การล้างเครื่อง โดยมี เฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารละลายบัพเฟอร์ และเฟสเคลื่อนที่ที่เก็บคอลัมภ์เป็น 70% MeOH

สารละลายบัฟเฟอร์ 30 นาที

↓

น้ำกลั่น (เฟสเคลื่อนที่ขั้นกลาง) 30นาที

↓

70% MeOH 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

↓

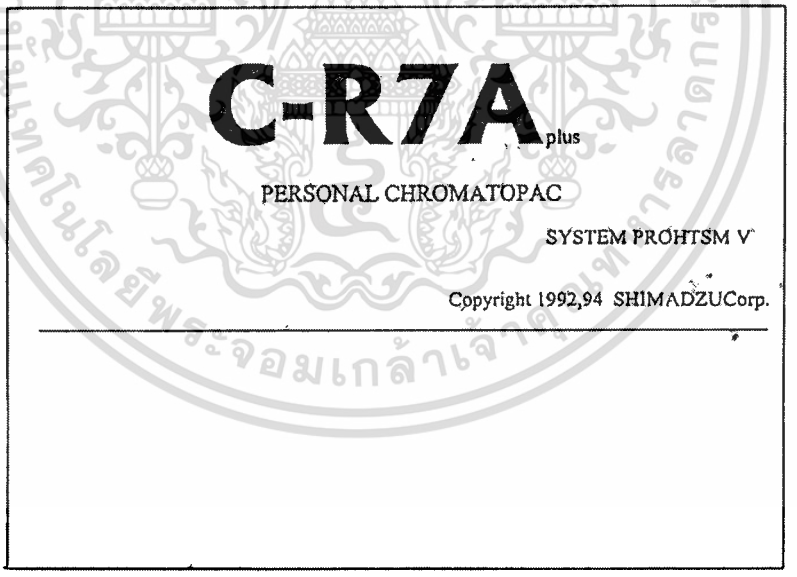
ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

2.2.6 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)

1. Run เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เก็บคอลัมภ์ 1 ชม.
3. หยุดปั้มแล้วถอดคอลัมภ์ออกจากระบบ แล้วต่อ pipe เปล่าแทนที่และปิดคอลัมภ์ด้วย plug ให้แน่น
4. เปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็น 70% MeOH แล้ว run เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง
5. ปิดปั้ม และปิดเครื่อง HPLC ทุกยูนิท
6. ยก sinker ออกจากขวด เฟสเคลื่อนที่ แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

2.2.7 ขั้นตอนการใช้งาน C-R7A

1. กดปุ่มเปิดเครื่อง C-R7A ในกรณีที่มี 2 Drive ให้ใส่แผ่น System disk ใน Drive 1 และแผ่นเก็บข้อมูลใน Drive 2 หน้าจอจะปรากฏ



2. กด WIN 1 จะปรากฏหน้าจอ Menu ของ WIN 1 เลือกข้อ 2 ตามด้วย **ENTER** จะปรากฏ เลือก L เพื่อเรียก Analysis File ในกรณีเคยสร้าง File เก็บไว้

E ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูก Load ขึ้นมาใช้งาน

R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่าใน Analysis File ที่ Load ขึ้นมาใช้งานอยู่

A ในกรรีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File กับทุกๆครั้งของการฉีด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีสร้าง Analysis File ใหม่

- เลือก **E** จะปรากฏหน้าจอของ Analysis File
- แก้ไขพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ WIDTH 5
  DRIFT(uV/min) 0
  และ T.DBL(min) 1000
- กด **EXIT** เพื่อออกจากหน้าจอ จะปรากฏคำถาม

Save FILE? Y : yes N: no

กด **Y** จะปรากฏ

Part 1:
File Name 2:

กำหนด Drive และชื่อ Analysis File ตามที่ต้องการตรงตำแหน่ง File Name ตามด้วย **ENTER** เช่น

Part 1:
File Name 2: ALCOHOL

หลังจากการ save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN1

3. ตั้งชื่อ File สำหรับ Save ข้อมูลของ Chromatogram เลือกข้อ 3 ตามด้วย ENTER จะปรากฏ

Chromatogram Storage Mode [S:set R:reset C:cancel latest A:auto-

เลือก S เมื่อต้องการตั้งชื่อ File สำหรับ save จะปรากฏ

Directory Part 1:
Chromatogram File [1: @CHRM1.C00] # of run (0 or 1~99) [ ] (0:serial)

กำหนด Drive และชื่อ File ตามด้วย " .C00" และ ENTER จำนวนโครมาโตแกรมที่ต้องการ Save ในชื่อเดียวกันนี้ (สูงสุด 99) และENTER เช่น

Directory Part 1:
Chromatogram File [1:test-unk.C00] # of run (0 or 1~99) [ ] (0:serial)

เลือก R เมื่อต้องการยกเลิกการตั้งชื่อข้างต้น

C ยกเลิกการ Save ของโครมาโตแกรมสุดท้าย

A เมื่อต้องการให้เครื่อง save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เลือกข้อ 1 จากหน้าจอ Menu ของ WIN1 จากนั้นรอจนสังเกตุเห็นเส้น Baseline ค่อนข้างเรียบจากนั้นทำการ Zero สัญญาณจาก Detector โดยปรับปุ่ม Zero ที่ Detector จนกว่าจะสามารถ Set 0 ที่ Detector ได้

5. ทำการ Test slope ของสัญญาณที่ส่งมาโดยการกด S ที่เครื่อง C-R7A เครื่องจะใช้เวลาในการทดสอบ ประมาณ 10 เท่าของค่า Width ที่ตั้งไว้ใน Analysis file หลังจากการทดสอบสิ้นสุดค่า Slope ที่ได้จะถูก Save ใน Analysis file อัตโนมัติถ้าต้องการแก้ไขให้กลับเข้าสู่ หน้า

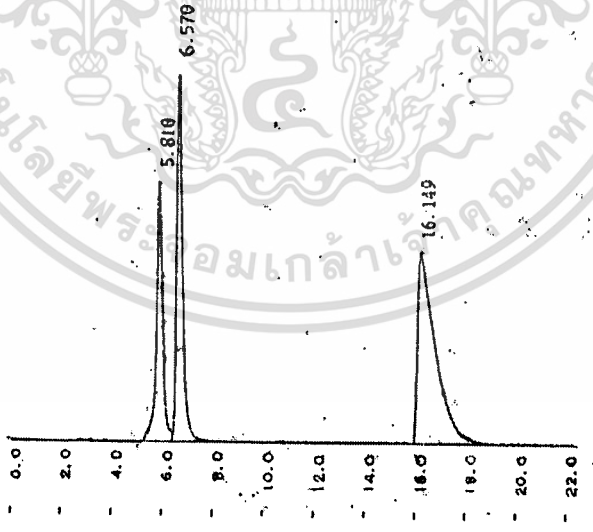
6. Menu ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis file

7. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณ และให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START

ในกรณีที่เครื่อง C-R7A สามารถเชื่อมต่อและควบคุมการทำงานของ HPLC ได้จะสามารถขอดูค่าต่างๆของ เครื่อง HPLC ผ่านเครื่อง C-R7A ได้จากหน้า Menu ของ WIN1 โดยเลือกข้อ **7: LC Monitor** ตามด้วย ENTER

2.2.8 ตัวอย่างโครมาโตแกรม

โครมาโตแกรมของสารมาตราฐานกรดแลคติก อะซิติก โพรพิโอนิก แสดงดังรูป ข-2 แสดงให้เห็นค่า retention time ของกรดแต่ละชนิด โดย retention time ของกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 5.81, 6.57 และ 16.1 นาที ตามลำดับ

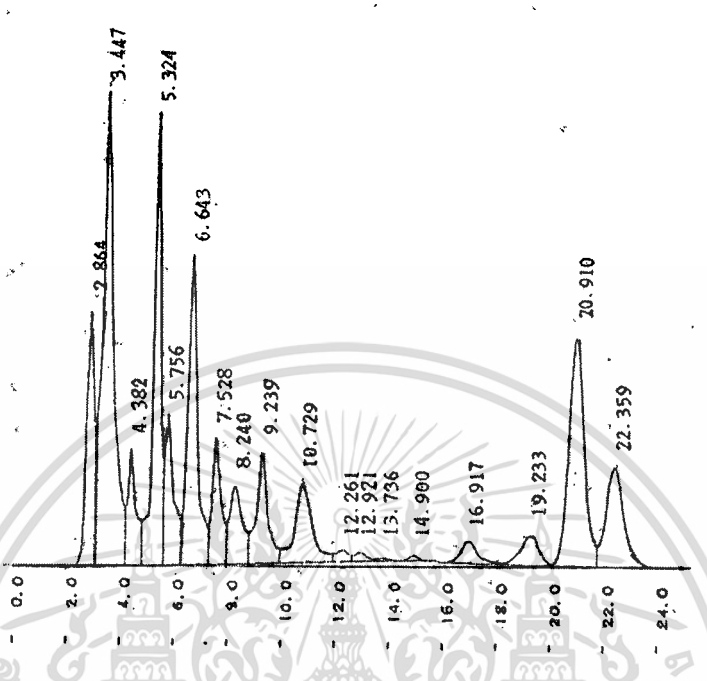


รูปที่ ข-2 แสดงค่า Retention time ของกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก

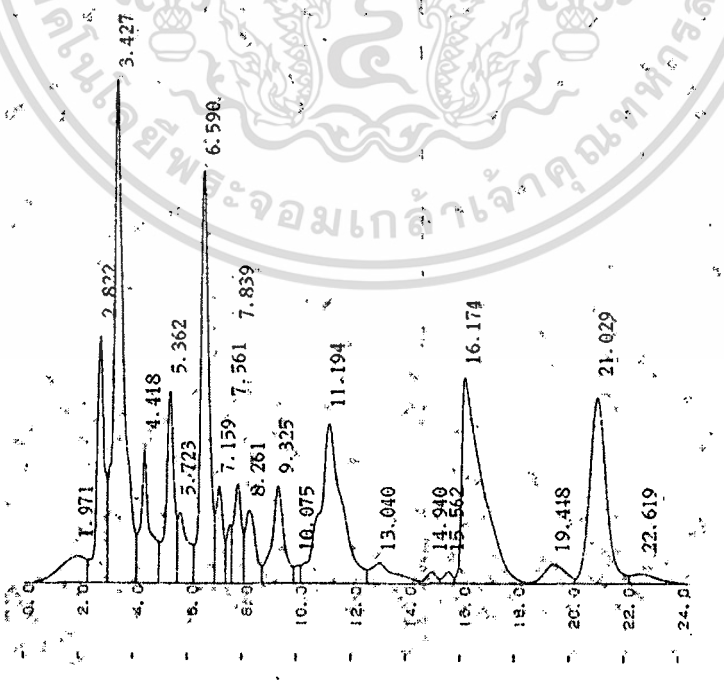
โครมาโตแกรมของกรดโพรพิโอนิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย ยีสต์สกัดปริมาณร้อยละ 1 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณร้อยละ 1 เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตรใช้

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวย์เป็นตัวทำละลาย เติมหัวเชื้อกรดโพรพิโอนิกร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ที่ชั่วโมงเริ่มต้น และชั่วโมงที่ 566 แสดงดังรูปที่ ข-3 และ ข-4 ตามลำดับ



รูปที่ ข-3 โครมาโตแกรมของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ชั่วโมงเริ่มต้น



รูปที่ ข-4 โครมาโตแกรมของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ชั่วโมง 566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

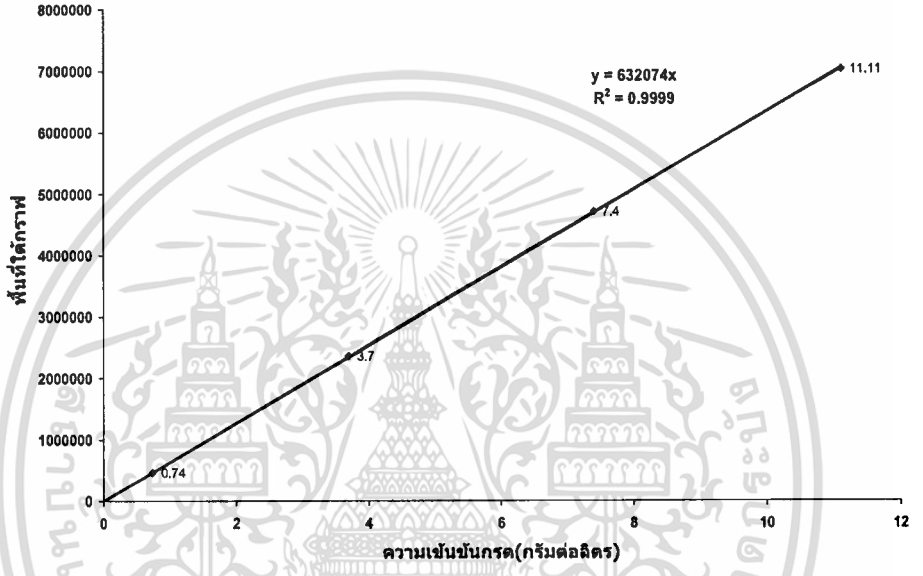
2.2.9 การทำกราฟมาตรฐานกรดโพรพิโอนิก

1. เตรียมสารละลายมาตราฐานของกรดโพรพิโอนิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

2. กรองผ่านผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

4. วิเคราะห์ด้วย HPLC เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

5. เขียนกราฟมาตราฐานระหว่างความเข้มข้น(แกนX) กับพื้นที่ใต้กราฟ (แกนY)



รูปที่ ข-5 กราฟมาตรฐานของกรดโพรพิโอนิกที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆ

3. การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (A.O.A.C. 2000)

1. ใช้ปิเปตดูดเซลล์แขวนลอย ใส่หลอดเซนติฟิวจ์หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. เทของเหลวส่วนใส (supernatant) ทิ้งไปล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์เป็นจำนวน 2-3 ครั้ง

3. นำเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

4. ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักเซลล์ที่แท้จริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร 13 สูตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	38.410	12	3.201	1223.848	.000
Within Groups	.068	26	.003		
Total	38.478	38			

Duncan

propionic	N	Subset for alpha = .05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M1=Y+TSB+L+M	3	2.0567									
M7=W+M	3		2.7000								
M8=W+L	3		2.7433	2.7433							
M9=W	3			2.8167	2.8167						
M13=W+TSB	3				2.8433						
M12=W+TSB+M	3					3.2867					
M5=W+Y+TSB+L	3						3.4800				
M6=W+L+M	3						3.5600				
M3=W+TSB+L+M	3							3.8867			
M11=W+Y	3							3.9533			
M2=W+Y+L+M	3								4.7500		
M4=W+Y+TSB+M	3									4.9333	
M10=W+Y+M	3										5.6667
Sig.		1.000	.309	.091	.529	1.000	.066	.122	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2. ผลการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

2.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	66.527	5	13.305	2175.283	.000
Within Groups	.073	12	.006		
Total	66.601	17			

data

Duncan

propioinic	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
ammoniumnitrate	3	1.7800			
ammoniumsulfate	3	1.8733			
urea	3		2.1700		
monosodiumglutamate	3		2.2400		
yeast extract	3			5.6333	
peptone	3				6.4633
Sig.		.170	.295	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2.2 ผลการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.553	3	2.851	1235.105	.000
Within Groups	.018	8	.002		
Total	8.572	11			

data

Duncan

propionic	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
yeast0.5	3	3.9267		
yeast1	3		5.6967	
yeast1.5	3			5.9367
yeast 2	3			5.9533
Sig.		1.000	1.000	.682

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ผลการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)ที่เหมาะสม

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	216.223	5	43.245	3744.121	.000
Within Groups	.139	12	.012		
Total	216.362	17			

data

Duncan

propionic	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
CaCO3=0	3	11.3067		
CaCO3=0.5	3		17.3667	
CaCO3=1	3			20.5867
CaCO3=2.5	3			20.6667
CaCO3=2	3			20.6933
CaCO3=1.5	3			20.7833
Sig.		1.000	1.000	.059

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับฟลาสก์เปรียบเทียบกับการผลิตในถังหมักขนาด 2ลิตร

ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิต

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	flask	14.2000	3	.20000	.11547
	fermenter	15.5000	3	.50000	.28868

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	flask & fermenter	3	-1.000	.000

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
flask - fermenter	-1.30000	.70000	.40415	-3.03890	.43890	-3.217	2	.085

ผลผลิต

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	flask	.3600	3	.02000	.01155
	fermenter	.3867	3	.01528	.00882

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	flask & fermenter	3	-.982	.121

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
flask - fermenter	-.02667	.03512	.02028	-.11391	.06057	-1.315	2	.319

อัตราการผลิต

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	flask	.0707	3	.00451	.00260
	fermenter	.0770	3	.00200	.00115

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	flask & fermenter	3	-.998	.041

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
flask - fermenter	-.00633	.00651	.00376	-.02250	.00983	-1.686	2	.234

4. การศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยวิธี Agar diffusion method

Aspergillus niger

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	bio	4.0000	5	.00000	.00000
	chem	4.2000	5	.27386	.12247

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	bio & chem	5	.	.

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	bio - chem	-.20000	.27386	.12247	-.54004	.14004	-1.633	4	.178

Aspergillus oryzae

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	bio	2.8200	5	.16432	.07348
	chem	3.0000	5	.00000	.00000

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	bio & chem	5	.	.

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	bio - chem	-.18000	.16432	.07348	-.38403	.02403	-2.449	4	.070

Rhisopus oligosporus

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	bio	2.7600	5	.25100	.11225
	chem	3.0000	5	.00000	.00000

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	bio & chem	5	.	.

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	bio - chem	-.24000	.25100	.11225	-.55166	.07166	-2.138	4	.099

Rhisopus oligosporus

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	bio	3.5000	5	.00000	.00000
	chem	3.7000	5	.27386	.12247

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	bio & chem	5	.	.

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	bio - chem	-.20000	.27386	.12247	-.54004	.14004	-1.633	4	.178

Penicillum sp

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	bio	4.0000	5	.00000	.00000
	chem	4.1000	5	.10000	.04472

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	bio & chem	5	.	.

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	bio - chem	-.10000	.10000	.04472	-.22417	.02417	-2.236	4	.089

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นาย สุรนารถ อร่ามเรือง

วัน/เดือน/ปี เกิด 30 กันยายน 2524

วุฒิการศึกษา จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ที่อยู่ 89/221 ซอยโอพาร2 ถนนนวมินทร์ แขวงคลองกุ่ม เขตบึงกุ่ม กทม.10240

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้