การคัดเลือกปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422

PARAMETRIC SCREENING AND OPTIMIZATION BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR PROPIONIC ACID PRODUCTION FROM *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422

จิรนันท์ โพธิสาร

JIRANAN POTISARN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2557

KMITL-2014-SC-M-020-035

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PARAMETRIC SCREENING AND OPTIMIZATION BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR PROPIONIC ACID PRODUCTION FROM *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422

JIRANAN POTISARN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT

FOR THE DEGREE MASTER OF SCIENCE

IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2014

KMITL-2014-SC-M-020-035

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CORYRIGHT 2014

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422

Parametric Screening and Optimization by Response Surface Methodology for Propionic Acid Production from *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422

นักศึกษา นางสาวจิรนันท์ โพธิสาร
รหัสประจำตัว 53651503
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.สุขใจ ชูจันทร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมชาย	ไกรรักษ์	
ดร.วรภัทร	สงวนไชยไผ่วงศ์	วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
รศ.ดร.พรรณี	ฐิตาภิชิต	
รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2557 เวลา 10.00-12.00 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 ชั้น 4 อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่.....27.....**เดือน**.....มิถุนายน.....**พ.ศ**.....57.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422
นักศึกษา	นางสาวจิรนันท์ โพธิสาร
รหัสประจำตัว	53651503
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2557
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ คือ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดย ใช้ยีสต์ออโตไลเสทเป็นแหล่งไนโตรเจนทางเลือกโดยเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 โดยทำการคัดเลือก 6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ซึ่งประกอบด้วย ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล (total sugar concentration in molasses, *X1*) ยีสต์ออโตไลเสท (yeast autolysate, *X2*) สารสกัดยีสต์ (yeast extract, *X3*) ทริปติกซอยบรอท (tryptic soy broth; TSB, *X4*) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4, *X5*) และโพแทสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4, *X6*) โดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยโปรแกรม Plackett-Burmans Design (PBD) จากผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล ยีสต์ออโตไลเสทและสารสกัดยีสต์ มีนัยสำคัญต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก (*P* เท่ากับ 0.0011, 0.0430, และ 0.0259 ตามลำดับ) ในขณะที่ ทริปติกซอยบรอท ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจน-ฟอสเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไม่มีนัยสำคัญต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก (*P* เท่ากับ 0.2206, 0.8700 และ 0.6829 ตามลำดับ) ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PBD จะถูกนำไปศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยการใช้โปรแกรมการออกแบบการทดลองพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) ด้วยการออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล เท่ากับ 40.87 กรัมต่อลิตร ยีสต์ออโตไลเสท เท่ากับ 4.36 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ เท่ากับ 6.90 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักเป็นเวลา 144 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตโพรพิโอนิกสูงสุดได้ เท่ากับ 27.46 กรัมต่อลิตร จากนั้นได้ศึกษายี่ห้อของสารสกัดยีสต์ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ซึ่งหมักด้วยสภาวะที่ได้จาก RSM พบว่าสารสกัดยีสต์ยี่ห้อ HIMAX IG20 (Thailand) มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตกรดโพรพิโอนิกมีประสิทธิภาพสูงเทียบเท่าสารสกัดยีสต์ทางการค้ายี่ห้อ Himedia (India) จากนั้นได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าที่เวลา 216 ชั่วโมง เซลล์ตรึงให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 25.65±0.72 กรัมต่อลิตร และเซลล์อิสระให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 21.55±0.58 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ พบว่าที่เวลา 192 ชั่วโมง เซลล์ตรึงให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 27.91±0.41 กรัมต่อลิตร และเซลล์อิสระให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 26.90±0.66 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผลของการศึกษานี้น่าจะเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกให้มีต้นทุนต่ำลงและใช้เป็นต้นแบบในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ในระดับอุตสาหกรรม

คำสำคัญ: กรดโพรพิโอนิก, *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422, Plackett-Burmans Design (PBD), Response Surface Methodology (RSM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Parametric Screening and Optimization by Response Surface Methodology for Propionic Acid Production from *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422
Student	Jiranan Potisarn
Student ID	53651503
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2014
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Sukjai Choojun

ABSTRACT

The aim of this study is optimization of propionic acid production by using yeast autolysate as an alternative nitrogen source by *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422. The effects of six variables total sugar concentration in molasses (*X1*), yeast autolysate (*X*2), yeast extract (*X*3), tryptic soy broth (*X*4), K_2HPO_4 (*X*5) and KH_2PO_4 (*X*6) were selected by using statistical methods via Plackett-Burmans Design (PBD). The values of 3 variables, total sugar concentration in molasses (*X1*), yeast autolysate (*X*2), and yeast extract (*X*3) with the *P*-values of 0.0011, 0.0430 and 0.0259, respectively, had significantly different effects on the propionic acid production, whereas tryptic soy broth (*X*4), K_2HPO_4 (*X*5) and KH_2PO_4 (*X*6) did not significant. From the analysis by using PBD, the significant factors were optimized by Response Surface Methodology (RSM) through Central Composite Design (CCD). The Maximum propionic acid concentration of 27.46 g/l was observed at static condition, 30 °C for 144 h using the following medium composition (g/l): total sugar concentration in molasses, 40.87; yeast autolysate, 4.36; and yeast extract, 6.90. Among the various yeast extract brands examined for propionic acid production, yeast extract from HIMAX IG20 (Thailand) was found to be potential low cost nitrogen source for enhancing propionic acid yield. The propionic acid production in 250 ml flask was compared. The production of propionic acid by immobilized cells with pectin crude extract from Krung Kha Mao leaves (*Cissampelos pareira* L.) (25.65±0.72 g/l) was significantly different from free cells (21.55±0.58 g/l) at 216 h under the optimized condition. The scaling up of propionic acid production in 5-liter fermenter was compared. The production of propionic acid by immobilized cells (27.91±0.41 g/l) was not significantly different from free cells (26.90±0.66 g/l) at 192 h

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

under the optimized condition. From the results, the optimized conditions could lead to the development of low cost process and used as a model for propionic acid production in the large scale.

Keywords: Propionic acid, *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422, Plackett-Burmans Design (PBD), Response Surface Methodology (RSM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ. สุขใจ ชูจันทร์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่ได้เสียสละเวลาเพื่อให้ความรู้ คำแนะนำ แนวทางในการดำเนินงานค้นคว้าวิจัย รวมถึงแนวทางในการแก้ไขปัญหาระหว่างการดำเนินงาน อีกทั้งได้กรุณาตรวจทางแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์, รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต และดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการดำเนินงานค้นคว้าวิจัย และสละเวลาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณบริษัท Thai Food International. CO. LTD (ประเทศไทย) ในการอนุเคราะห์สารสกัดยีสต์ CW-V, สารสกัดยีสต์ 21 VP และ สารสกัดยีสต์ HIMAX IG20 ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนทั้งด้านทุนทรัพย์และเป็นกำลังใจให้เสมอมา ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณนางสาวดวงกมล เพชรทิพย์, นางมาวิณี ดลราษี, นายเทอดศักดิ์ ขจรบุญ, นางสาวฟาริดา พรหมมา, นางสาวลลิตวดี เกษร, นางสาวแพรวภิญญา ฉายรักษา, นายมหัทธน ทวีฤกษ์ขวัญ, นายอภินันท์ จัตตุพันธ์ และเพื่อนๆ น้องๆ ที่ได้ช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ขอขอบคุณนายอัฐพร บุญเจริญ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในการวางแผนการทดลอง การวิเคราะห์ผลการทดลอง และคอยช่วยเหลือเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่อง ผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด สำหรับคุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

จิรนันท์ โพธิสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... VI

สารบัญตาราง..... X

สารบัญรูป..... XIV

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ที่มาและความสำคัญ..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 2

1.3 ขอบเขตงานวิจัย..... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก..... 4

2.2 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก..... 4

2.3 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 6

2.3.1 การผลิตกรดโพรพิโอนิกทางเคมี..... 7

2.3.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพ..... 8

2.4 จุลินทรีย์ผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 11

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 17

2.5.1 คาร์บอน..... 17

2.5.2 ไนโตรเจน..... 17

2.5.3 โคแฟกเตอร์..... 18

2.5.4 พีเอช..... 18

2.5.5 อุณหภูมิ..... 18

2.5.6 การให้อากาศ..... 18

2.5.7 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)..... 19

2.6 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์..... 25

2.7 กรุงเขมา..... 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.7.1 ลักษณะทั่วไปของกรุงเขมา	27
2.8 ยีสต์ออโตไลเสท	28
2.8.1 วิธีการผลิต	28
2.8.2 องค์ประกอบทางเคมี	31
2.9 การออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรมสถิติ	33
2.9.1 การออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burmans Design	34
2.9.2 Response Surface Methodology	35
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	**40**
3.1 วัสดุอุปกรณ์	40
3.2 เครื่องมือ	40
3.3 สารเคมี	41
3.4 เชื้อจุลินทรีย์และการเก็บรักษา	42
3.5 วัตถุดิบ	43
3.6 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น	43
3.7 การสกัดเพกทินจากใบกรุงเขมา	43
3.7.1 การเตรียมตัวอย่างใบกรุงเขมา	43
3.7.2 การสกัดเพกทินจากใบกรุงเขมา	44
3.8 การตรึงเซลล์ด้วยเพกทินจากใบกรุงเขมา	44
3.9 การศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้เชื้อ *Pronibacterium acidipropionici* TISTR 422	45
3.9.1 การคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design	45
3.9.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)	48
3.10 การตรวจสอบยืนยันผล (Validation)	50
3.11 การศึกษายี่ห้อของสารสกัดยีสต์ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

3.12 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร..... 51

3.13 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 51

3.14 วิธีวิเคราะห์..... 52

3.14.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสท..... 52

3.14.2 การวิเคราะห์น้ำหมัก..... 52

3.15 การวิเคราะห์ทางสถิติ..... 52

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 53

4.1 การศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422..... 53

4.1.1 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design..... 53

4.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)..... 63

4.3 การตรวจสอบยืนยันผล (Validation)..... 78

4.4 การศึกษายี่ห้อของสารสกัดยีสต์ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 78

4.5 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร..... 81

4.5.1 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ..... 81

4.5.2 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา..... 82

4.6 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 86

4.6.1 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ..... 86

4.6.2 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา..... 88

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 92

บรรณานุกรม..... 95

ภาคผนวก ก..... 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
ภาคผนวก ข	108
ภาคผนวก ค	115
ภาคผนวก ง	138
ประวัติผู้เขียน	159

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกรดโพรพิโอนิก..... 5

2.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 11

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 13

2.4 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยจุลินทรีย์ กระบวนการหมัก แหล่งคาร์บอนและผลผลิต..... 15

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อกรดโพรพิโอนิก..... 20

2.6 ผลการศึกษาการประยุกต์ใช้วัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์..... 26

2.7 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสท..... 31

2.8 ปริมาณของวิตามินในยีสต์ออโตไลเสท..... 31

2.9 ปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในยีสต์ออโตไลเสท..... 32

2.10 หลักการเลือกใช้การออกแบบการทดลองแต่ละชนิด..... 33

2.11 การออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burmans Design..... 35

2.12 การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design ของตัวแปรเชิงปริมาณ.. 39

3.1 ระดับของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burmans Design..... 46

3.2 แผนการทดลองแบบ Plackett-Burmans Design ทั้งหมด 15 การทดลองประกอบด้วยรหัสและค่าความเข้มข้นของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองทั้ง 6 ปัจจัย ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 47

3.3 ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการออกแบบด้วยโปรแกรม Response Surface Methodology..... 49

3.4 แผนการทดลองแบบ Central Composite Design ทั้งหมด 20 การทดลอง ประกอบด้วย รหัสและค่าความเข้มข้นของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองทั้ง 3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 49

4.1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการวางแผนการทดลองแบบ PBD ของการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 ที่เวลา 144 ชั่วโมง..... 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.2 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก กรดแอซีติก และน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 จากการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burmans Design จำนวน 15 การทดลอง มีปัจจัยศึกษา 6 ปัจจัย ทำการหมักเป็นเวลา 144 ชั่วโมง..... 58

4.3 ปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในยีสต์ออโตไลเสทและสารสกัดยีสต์..... 62

4.4 ผลการผลิตกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 ที่ได้ออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design จำนวน 20 การทดลอง ที่เวลา 144 ชั่วโมง..... 65

4.5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองโครงสร้างที่ใช้ในการทำนายความสัมพันธ์ของตัวแปรกับค่าผลการทดลองที่ติดตามเพื่อหาพื้นที่การตอบสนอง..... 67

4.6 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design..... 70

4.7 ค่าที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาและสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทำนายและค่าที่ได้จากการทดลองของปริมาณกรดโพรพิโอนิก โดยการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design..... 77

4.8 ยี่ห้อของสารสกัดยีสต์ที่มีผลต่อกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกที่เวลา 144 ชั่วโมง..... 80

4.9 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการประเมินทางเศรษฐศาสตร์..... 80

4.10 ค่า *P*-value ของการเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยวิธี *t*-test ที่เวลา 216 ชั่วโมง..... 85

4.11 ค่า *P*-value ของการเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ วิธี *t*-test ที่เวลา 192 ชั่วโมง..... 90

ข-1 การเจือจางสารละลายกลูโคสด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร..... 110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ค-1 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร) โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design..... 116

ค-2 ปริมาณกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร) โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design..... 118

ค-3 ปริมาณน้ำทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design..... 120

ค-4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design.. 122

ค-5 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร) ด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)..... 124

ค-6 ปริมาณกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร) ด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)..... 125

ค-7 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง(Response Surface Methodology)..... 126

ค-8 ค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)..... 127

ค-9 อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติกด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)..... 128

ค-10 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมดโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบอิสระในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร..... 129

ค-11 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกอัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก และผลผลิตกรดโพรพโอนิกโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบอิสระในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร..... 129

ค-12 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร..... 130

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ค-13 ค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติกและผลผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทิน ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร..... 131

ค-14 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบอิสระในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร..... 132

ค-15 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก และผลผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบอิสระในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร..... 133

ค-16 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์อิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 135

ค-17 ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก และผลผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบอิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 135

ค-18 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทิน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 136

ค-19 อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติกและผลผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทิน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 137

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 สูตรโครงสร้างของกรดโพรพิโอนิก..... 4
2.2 สูตรโครงสร้างของเกลือโพรพิโอเนต..... 6
2.3 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลสแอซีเทตโพรพิโอเนต..... 6
2.4 วิถีกรดไดคาร์บอกซิลิกหรือซักซิเนต..... 9
2.5 วิถีอะคริลิก (acrylic pathway)..... 10
2.6 แบคทีเรียโพรพิโอนิกสายพันธุ์ต่างๆ..... 12
2.7 กรุงเขมา..... 27
2.8 กราฟสามมิติของพื้นผิวตอบสนอง..... 37
2.10 จุดของการออกแบบ 9 การทดลองสำหรับ 2 ปัจจัย 38
4.1 แผนภูมิ Perato ของการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design..... 57
4.2 Half-normal plot ของการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design ที่มีผลกระทบต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 57
4.3 โครงร่างระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสท..... 71
4.4 พื้นผิวตอบสนองปริมาณกรดโพรพิโอนิกระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสท..... 72
4.5 โครงร่างระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและสารสกัดยีสต์... 73
4.6 พื้นผิวตอบสนองปริมาณกรดโพรพิโอนิกระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและสารสกัดยีสต์..... 73
4.7 โครงร่างระหว่างยีสต์ออโตไลเสทและสารสกัดยีสต์..... 74
4.8 พื้นผิวตอบสนองปริมาณกรดโพรพิโอนิกระหว่างยีสต์ออโตไลเสทและสารสกัดยีสต์..... 74
4.9 การกระจายแบบปกติของส่วนตกค้างที่มีผลต่อรูปแบบการผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 76
4.10 การกระจายของส่วนตกค้างที่ได้จาการทำนายที่มีผลต่อรูปแบบการผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 76
4.11 การกระจายของส่วนตกค้างกับค่าตอบสนองในแต่ละระดับของปัจจัยที่มีผลต่อรูปแบบการผลิตกรดโพรพิโอนิก..... 77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.12 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการหมักจากเซลล์อิสระของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร 82

4.13 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการหมักจากเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร 83

4.14 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* แบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร 85

4.15 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการหมักจากเซลล์อิสระของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 87

4.16 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่างในการหมักจากเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 89

4.17 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 แบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร 90

ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 111

ข-2 แสดงกราฟมาตรฐานกรดโพรพิโอนิก 112

ข-3 แสดงกราฟมาตรฐานกรดแอซีติก 113

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) มีสูตรโมเลกุล คือ CH_3CH_2COOH เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราและแบคทีเรียบางชนิด โดยไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภค จึงนิยมใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และเป็นวัตถุกันเสียทางชีวภาพ (biopreservatives) ในอาหารคนและอาหารสัตว์ (Wang และ Yang, 2013; Kośmider, และคณะ, 2010) นอกจากนี้กรดโพรพิโอนิกยังถูกนำใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตพลาสติก เป็นส่วนผสมในยาควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจ ยารักษาข้ออักเสบและยาปฏิชีวนะ เป็นส่วนผสมในยาปราบศัตรูพืช เป็นตัวทำละลายที่สำคัญ และเป็นส่วนผสมในการผลิตน้ำหอม (Ruhal และ Choudhury, 2012; Dishisha และคณะ, 2012; Zhu และคณะ, 2010; Himmi, และคณะ, 2000)

ปัจจุบันกรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ (Wang และ Yang, 2013; Feng และคณะ, 2011) โดยทางการค้ามีการสังเคราะห์กรดโพรพิโอนิกด้วยกระบวนการทางเคมี ซึ่งทำได้รวดเร็วและได้ผลผลิตปริมาณมาก แต่เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้ คือ ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมนั้นมีการปรับราคาสูงขึ้น มีความเป็นพิษ และยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Zhu และคณะ, 2012; Feng และคณะ, 2010) ดังนั้นการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยการใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล Propionibacteria จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญ โดยแบคทีเรียในสกุลดังกล่าวนี้ สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกจากสารตั้งต้นราคาถูก ประเภทวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร และผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยกระบวนการทางชีวภาพนั้นยังมีข้อจำกัด เช่น กระบวนการหมักที่ใช้เวลานาน ผลผลิตที่ได้มีปริมาณน้อย กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ยังมีค่าใช้จ่ายสูงและทำได้ยาก (Zhang, และ Yang, 2009a, Zhang, และ Yang, 2009b; Coral, และคณะ, 2008) นอกจากนั้นแหล่งไนโตรเจน เป็นอีกปัจจัยสำคัญหนึ่งที่ส่งผลต่อต้นทุนการผลิตกรดโพรพิโอนิก เมื่อพิจารณาถึงราคาของต้นทุนการผลิตที่มีราคาสูง ทำให้มีความพยายามที่จะหาวัตถุดิบราคาถูก เพื่อมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนในสูตรอาหาร ดังนั้นในหลายงานวิจัยจึงได้มีการเสนอวิธีการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพร่วมกับการใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก เพื่อให้ได้ผลผลิตปริมาณสูงขึ้นและมีราคาต้นทุนต่ำลง

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(*C. pareira* L.)โดยใช้ยีสต์ออโตไลเสทเป็นแหล่งไนโตรเจนทางเลือก และมีการประยุกต์ใช้โปรแกรมทางสถิติในการออกแบบการทดลองแบบ PBD เพื่อคัดกรองปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกในขั้นต้น ใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) โดยการออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) ในการหาสภาวะและองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสม เพื่อขยายขนาดการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ผลของการศึกษานี้น่าจะเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการทางชีวภาพให้มีราคาต้นทุนต่ำลง ผลผลิตที่ได้มีปริมาณสูงขึ้น เพื่อนำไปสู่การพัฒนา และใช้เป็นต้นแบบในการผลิตกรดโพรพิโอนิกให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาและคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้ยีสต์ออโตไลเสทเป็นแหล่งไนโตรเจนทางเลือก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 โดยใช้แผนการทดลองแบบ PBD

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) โดยใช้แผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (CCD)

1.2.3 ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (*C. pareira* L.) ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 คัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้ยีสต์ออโตไลเสทเป็นแหล่งไนโตรเจนทางเลือก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ในระดับฟลาสก์

1.3.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 โดยออกแบบการทดลองในกระบวนการทางสถิติ ในระดับฟลาสก์

1.3.3 การศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (*C. pareira* L.) เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.4 สามารถนำยีสต์ออโตไลเสทซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนทางเลือกมาใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้

1.4.2 สามารถประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (*C. pareira* L.) มาใช้ในการตรึงเซลล์เชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของใบกรุงเขมาและลดการใช้เพกทินนำเข้าจากต่างประเทศ สำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก

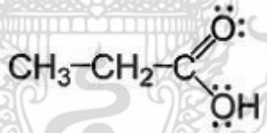
1.4.3 เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก เพื่อนำไปสู่ระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วรรณกรรม หรือ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) มีสูตรโมเลกุล คือ $C_3H_6O_2$ ชื่อเคมี IUPAC คือ propanoic acid เป็นกรดคาร์บอกซิลิกที่สำคัญที่ได้จากวิถีกรดไดคาร์บอกซิลิก (dicarboxylic acid pathway) หรือวิถีซักซิเนต (succinate pathway) กรดโพรพิโอนิกถูกพบเป็นครั้งแรกใน ค.ศ. 1844 โดย Johann Gottlieb ซึ่งพบในผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่มีการสลายตัว (degradation) 2-3 ปีต่อมามีนักเคมีจำนวนมากได้ผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยวิธีการต่างๆ โดยไม่ทราบว่ากำลังผลิตสารชนิดเดียวกัน ใน ค.ศ. 847 นักเคมีชาวฝรั่งเศสชื่อ Jean-Baptiste Dumas ได้ตีพิมพ์ว่ากรดเหล่านั้นเป็นสารประกอบชนิดเดียวกัน เรียกว่า กรดโพรพิโอนิก ซึ่งมาจากคำภาษากรีกว่า Protos แปลว่า Frist และ Pion แปลว่า Fat เพราะว่ากรดโพรพิโอนิกเป็นกรดคาร์บอกซิลิกที่มีขนาดเล็กที่สุด ซึ่งแสดงคุณสมบัติของกรดไขมัน เช่น เมื่อเติมเกลือโพรพิโอเนตละลายในน้ำจะเกิดชั้นไขมันแยกจากน้ำ ในกรณีของเกลือโพแทสเซียมจะให้ลักษณะคล้ายสบู่ (สุขใจ, 2554) กรดโพรพิโอนิกมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1 และมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีดังตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของกรดโพรพิโอนิก

ที่มา: Haque และคณะ (2009)

2.2 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก (สุขใจ, 2554)

กรดโพรพิโอนิกถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อวัตถุประสงค์หลัก คือ ยับยั้งการเจริญของเชื้อราในขนมปัง และเนยแข็ง ใช้เป็นวัตถุกันเสียสำหรับเมล็ดพืช หญ้าหมัก และยาสูบในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาและการขนส่ง นิยมใช้ในรูปของเกลือมากกว่ากรด โดยจะอยู่ในรูปของเกลือแคลเซียม โซเดียม และโพแทสเซียม (รูปที่ 2.2) เมื่อผสมสารละลายของกรดโพรพิโอนิกร่วมกับกรดแอซีติกและกรดแลกติก จะสามารถถูกใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytognes* บนอาหารได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกรดโพรพิโอนิก

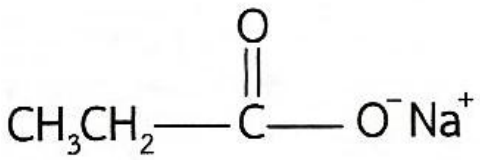
คุณสมบัติ	**ค่าพารามิเตอร์**
มวลโมเลกุล	74.08 กรัมต่อลิตร
ลักษณะที่ปรากฏ	ของเหลวไม่มีสี
ความหนาแน่น	0.99 กรัมต่อลูกบาสก์เซนติเมตร
จุดหลอมเหลว	-21 องศาเซลเซียส (252 เคลวิน)
จุดเดือด	141 องศาเซลเซียส (414 เคลวิน)
ความสามารถละลายในน้ำ	สามารถละลายผสมกับน้ำได้
ค่าความเป็นกรด	4.88
ค่าความหนืด	10 มิลลิปาสกาล.วินาที
จุดไฟติด	55 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิการเผาไหม้	475 องศาเซลเซียส

ที่มา: ดัดแปลงจาก สุขใจ (2554); Haque และคณะ (2009)

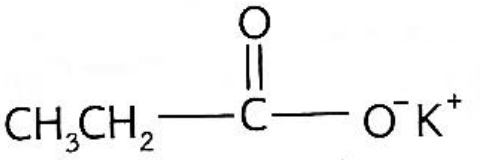
สถาบัน FDA ของสหรัฐอเมริกาได้พิจารณาแล้วว่า เกลือโพรพิโอเนตที่อยู่ในรูปของเกลือโซเดียม แคลเซียม และโพแทสเซียม มีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe; GRAS) และสามารถใช้เป็นสิ่งเจือปนในอาหารได้นอกจากนั้นยังใช้กรดโพรพิโอนิกในการผลิตพลาสติก เช่น เซลลูโลสแอซีเทตโพรพิโอเนต (Cellulose Acetate Propionate; CAP) (รูปที่ 2.3) โดยใช้โพรพิโอนิกแอนไฮไดรด์แทนบิวทิริกแอนไฮไดรด์ ซึ่งมีความเสถียรสูง ส่วนใหญ่ใช้ทำวัสดุเคลือบผิว ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เส้นใย (fiber) และผลิตฟิล์มห่อบรรจุภัณฑ์ ส่วน Cellulose Propionate (CP) เป็นเทอร์มอพลาสติกเรซินชนิดหนึ่ง ผลิตจากเซลลูโลสและกรดโพรพิโอนิกที่ มีคุณสมบัติคล้ายกับ CAP เอสเทอร์ของโพรพิโอนิกและอนุพันธ์อื่นๆ ใช้เป็นยารักษาโรคข้ออักเสบ (antiarthritis) และยาปฏิชีวนะ(antibiotic) ใช้เตรียมน้ำหอมและสารปรุงแต่งกลิ่นรส เช่น ซิโทรเนลลีนโพรพิโอเนต (citronellyl propionate) และเจอรานิลโพรพิโอเนต (geranyl propionate) เป็น plasticizers เช่น ฟีนิลโพรพิโอเนต (phenyl propionate) และกลีเซอรอลไทรโพรพิโอเนต (glycerol tropropionate) และใช้เป็นตัวทำละลาย (solvent) ที่สำคัญ มีรายงานการวิจัยของ Belz และคณะ (2012) พบว่าการใช้แคลเซียมโพรพิโอเนตปริมาณ ร้อยละ 0.3 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Penicillium expansum*, *Fusarium cumorum* และ *Aspergillus niger* ได้เป็นเวลา 10-12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. **ข.**



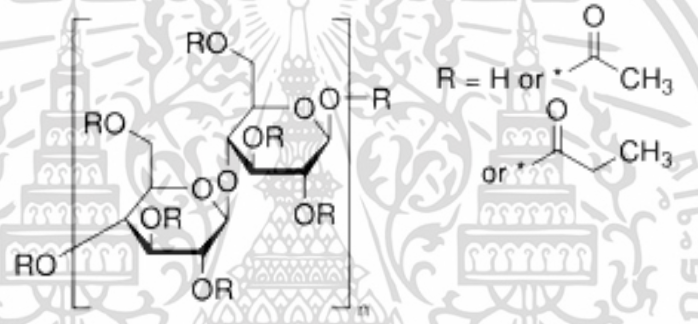
โซเดียมโพรพิโอเนต



โพแทสเซียมโพรพิโอเนต

รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของเกลือโพรพิโอเนต; ก. โซเดียมโพรพิโอเนต และ ข. โพแทสเซียมโพร-พิโอเนต

ที่มา: สุขใจ (2554)



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลสแอซีเทตโพรพิโอเนต

ที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma_aldrich/structure3/168/mfcd00146341.eps/_jcr_content/renditions/medium.png (วันที่สืบค้น 15 ธันวาคม 2556)

2.3 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก

การผลิตกรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งโดยวิธีการทางเคมีและวิธีการทางชีวภาพ โดยในปัจจุบัน การผลิตกรดโพรพิโอนิกในทางการค้านิยมผลิตโดยใช้กระบวนการทางเคมี เนื่องจากให้ผลผลิตสูงและใช้ระยะเวลาสั้น แต่เนื่องจากราคาของผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมซึ่งเป็นสารตั้งต้นในปัจจุบันที่ปรับตัวสูงขึ้น รวมทั้งความต้องการของผู้บริโภคที่ต้องการผลิตภัณฑ์ทางเคมีลดลง จึงทำให้เกิดความสนใจในการผลิตกรดโพรพิโอนิกและสารต่างๆ จากวัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ใหม่ได้ รวมทั้งวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและของเสียจากอุตสาหกรรม และเป็นกระบวนการผลิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นกระบวนการทางชีวภาพจึงเข้ามามีบทบาทในการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากขึ้น ซึ่งกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ 2 วิธี ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 การผลิตกรดโพรพิโอนิกทางเคมี (สุขใจ, 2554)

การผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับอุตสาหกรรมนิยมผลิตโดยกระบวนการทางเคมี ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

1. การเกิดปฏิกิริยาออกโซ หรือ ไฮโดรฟอร์มิลเลชัน (oxo หรือ hydroformylation) ของเอทิลีนทำปฏิกิริยากับคาร์บอนมอนอกไซด์และไฮโดรเจน โดยมี dicobalt octacarbonyl ($Co_2(CO_8)$) เป็นสารเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 150 องศาเซลเซียส และความดัน 250-300 บาร์ ได้ผลผลิตเป็นโพรพิโอนัลดีไฮด์ (propionaldehyde) เรียกว่า Reppe process ดังสมการ

$$CH_2{=}CH_2 + CO + H_2 \longrightarrow CH_3CH_2CHO$$

เอทิลีน คาร์บอนมอนอกไซด์ โพรพิโอนัลดีไฮด์

2. ต่อมาเกิดปฏิกิริยา aerobic oxidation ของโพรพิโอนัลดีไฮด์ โดยมีโคบอลต์หรือแมงกานีสไอออนเป็นสารเร่งปฏิกิริยาซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความดัน 6-7 บาร์ ดังสมการ

$$CH_3CH_2CHO + \tfrac{1}{2}\,O_2 \longrightarrow CH_3CH_2COOH$$

กรดโพรพิโอนิก

หรือการสังเคราะห์กรดโพรพิโอนิกอาจเกิดจากปฏิกิริยาคาร์บอนิเลชันของเอทิลีน เรียกว่า Koch reaction โดยทำปฏิกิริยากับคาร์บอนมอนอกไซด์ และน้ำ มีนิกเกิลคาร์บอนิล (nickel carbonyl) เป็นสารเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส ความดัน 200-250 บาร์ ดังสมการ

$$CH_2{=}CH_2 + CO + H_2O \longrightarrow CH_3CH_2COOH$$

เอทิลีน กรดโพรพิโอนิก

ในกรณีที่ต้องการใช้ความดันต่ำสำหรับปฏิกิริยาคาร์บอนิเลชันของเอทิลีนสามารถทำได้โดยใช้นิกเกิล-โมลิบดีนัม คาร์บอนิล (nickel-molybdenum carbonyl) เป็นสารเร่งปฏิกิริยาร่วมกับไอโอไดรด์ และกรดฟอสฟอริก ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้ความดันที่ 10-30 บาร์

การผลิตกรดแอซีติกโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ naphtha จะให้กรดโพรพิโอนิกเป็นผลิตผลพลอยได้ ในประเทศสหราชอาณาจักร โรงงานจะเก็บผลิตผลพลอยได้นี้เพื่อเพิ่มมูลค่าโดยการสังเคราะห์กรดโพรพิโอนิกอาศัยปฏิกิริยาโฮโมโลเคชั่น (homologation) ของกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอซีติกกับคาร์บอนมอนอกไซด์ และไฮโดรเจน ที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส ความดัน 270 บาร์ จะได้กรดบิวทิริกและกรดวาเลอริก (valeric acid) เป็นผลผลิตรอง โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะใช้รูทิเนียม (ruthenium) หรือโรเดียม (rhodium) ร่วมกับลิแกนด์ (ligands) เช่น แอซีทัลแอซีโทเนต (acetylacetonate) กับไอโอไดรด์เป็นสารเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ

$$\underset{\text{กรดแอซีติก}}{CH_3COOH} + CO + 2H_2 \longrightarrow \underset{\text{กรดโพรพิโอนิก}}{C_2H_2COOH} + H_2O$$

2.3.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพ

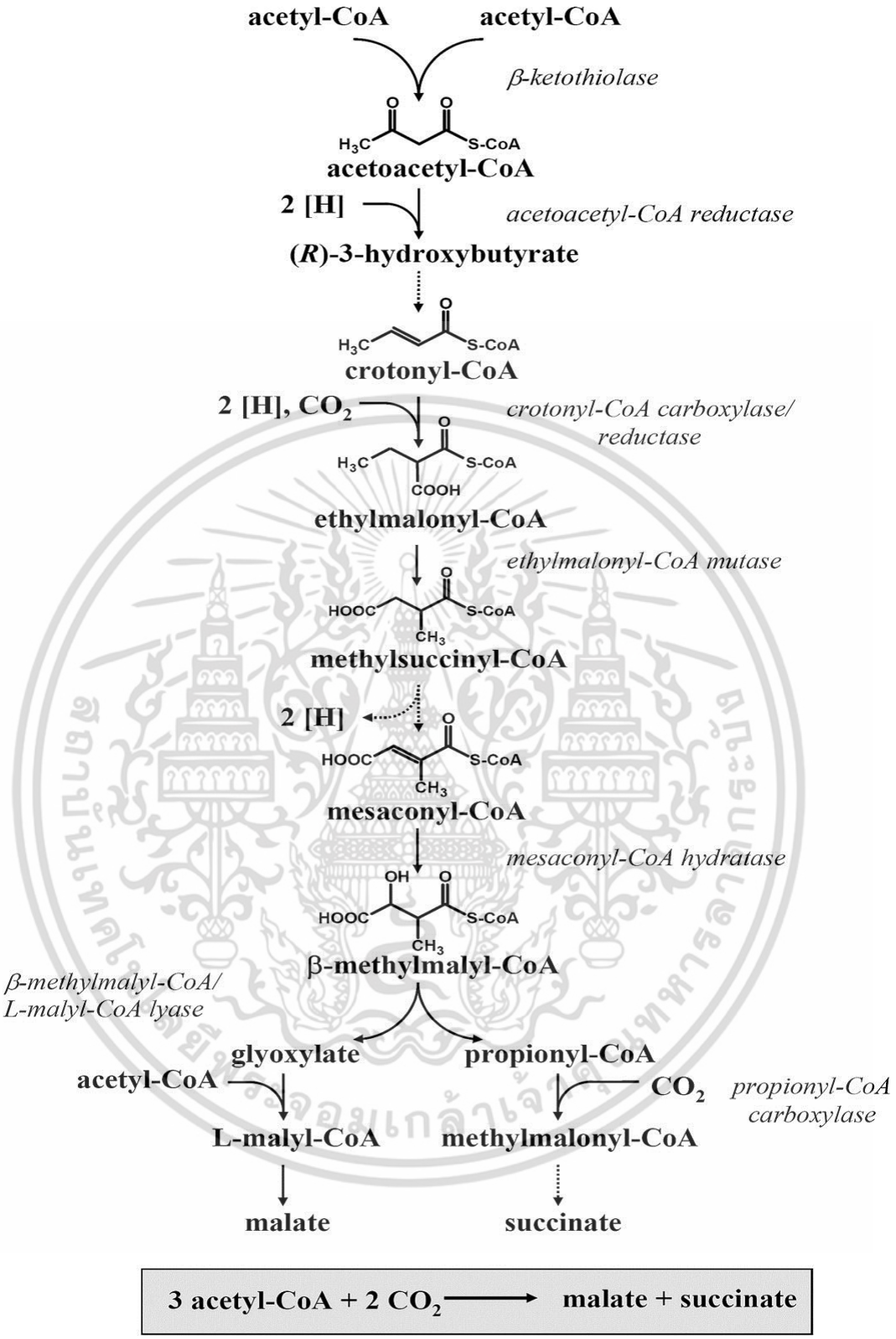
การผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิก ถึงแม้ว่ากระบวนการผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพจะมีความน่าสนใจ แต่เนื่องจากอัตราการผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่ค่อนข้างต่ำ ทำให้การผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีทางชีวภาพยังไม่สามารถแข่งขันกับการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการทางเคมีได้ (Liu และคณะ, 2011; Suwannakham และ Yang, 2005) กระบวนการหมักกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อจุลินทรีย์ให้ผลดังสมการของ Fitz (Fitz equation) ดังนี้ (ก) Benjelloun, และคณะ, 2005; (ข) Boyaval และ Corre, 1995

(ก) $\underset{\text{แลกเทต}}{3\ \text{Lactate}} \longrightarrow \underset{\text{โพรพิโอเนต}}{2\ \text{propionate}} + \underset{\text{แอซีเทต}}{1\ \text{acetate}} + \underset{\text{คาร์บอนไดออกไซด์}}{1\ CO_2} + \underset{\text{น้ำ}}{1\ H_2O}$

(ข) $\underset{\text{กลูโคส}}{1.5\ \text{glucose}} \longrightarrow \underset{\text{กรดโพรพิโอนิก}}{2\ \text{propionic acid}} + \underset{\text{กรดแอซีติก}}{1\ \text{acetic acid}} + \underset{\text{คาร์บอนไดออกไซด์}}{1\ CO_2} + \underset{\text{น้ำ}}{1\ H_2O}$

ผลผลิตสูงสุดตามทฤษฎีจะได้กรดโพรพิโอนิกร้อยละ 54.8 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และได้ปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 77 จากปฏิกิริยาดังสมการการเกิดกรดโพรพิโอนิก จะเกิดกรดแอซีติกเป็นผลิตผลพลอยได้เพื่อรักษาไฮโดรเจนและสมดุลของรีดอกซ์ วิถีที่จุลินทรีย์ส่วนมากใช้ในการเปลี่ยนแปลงเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ วิถีกรดไดคาร์บอกซิลิก หรือวิถีซักซิเนต (รูปที่ 2.4) ส่วนวิถีอะคริลิก (acrylic pathway) (รูปที่ 2.5) มีความจำกัดเฉพาะแบคทีเรีย 2-3 ชนิดเท่านั้น คือ *Clostridium propionicum*, *Megasphaera elsdenii* และ *Bacteroides ruminicola* (สุขใจ, 2554)

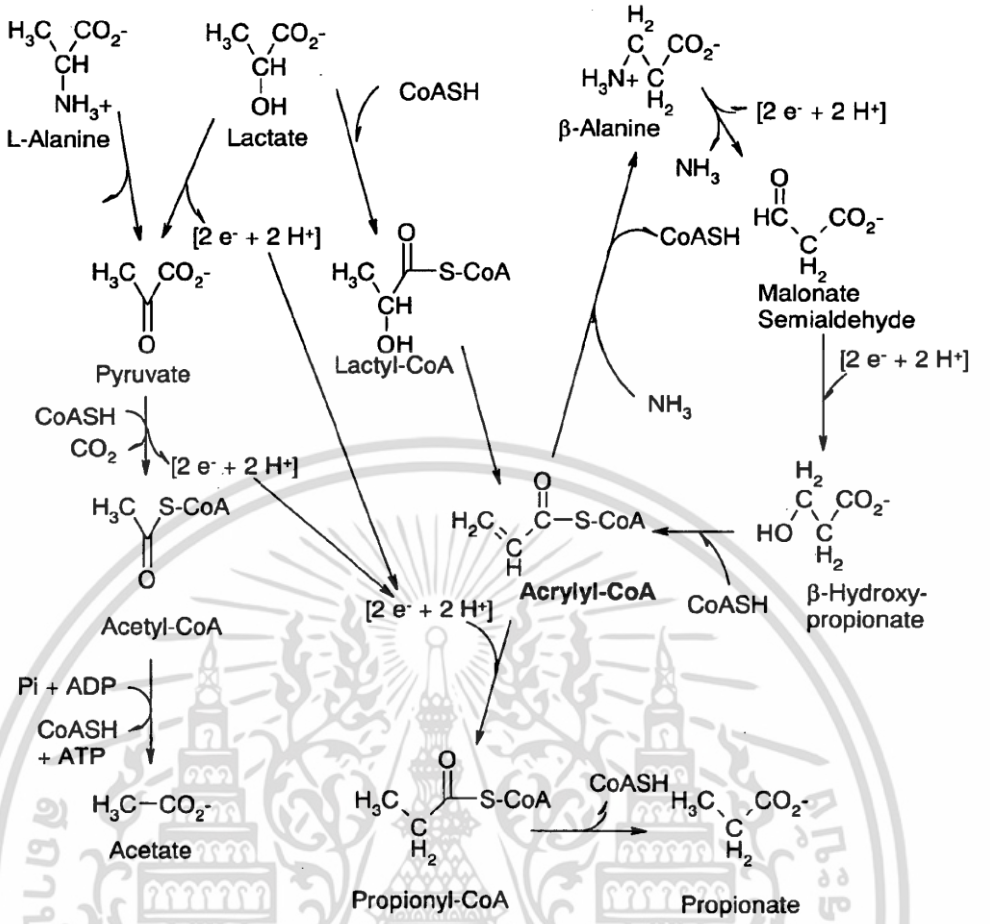
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 วิถีกรดไดคาร์บอกซิลิกหรือซักซิเนต

ที่มา: http://www.pnas.org/content/104/25/10631/F4.large.jpg (วันที่สืบค้น 15 ธันวาคม 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 วิถีอะคริลิก (acrylic pathway)

ที่มา: Dalal และคณะ (1980)

ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยกระบวนการทางชีวภาพ เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงและใช้ต้นทุนต่ำ เช่น การใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกในการผลิตกรดโพรพิโอนิก การใช้วัสดุห่อหุ้มเซลล์เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ รวมไปถึงการพัฒนากระบวนการหมักที่เกิดขึ้นพร้อมกับการแยกผลิตภัณฑ์ออกมาจำนวนมาก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 จุลินทรีย์ผลิตกรดโพรพิโอนิก

จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ แบคทีเรียที่อยู่ในสกุล Propionibacterium เรียกว่า แบคทีเรียกรดโพรพิโอนิก (propionic acid bacteria) ดังตารางที่ 2.2 พบครั้งแรกในเนยสวิส (Swiss cheese) ผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการหมักจะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะทำให้เกิดลักษณะรูพรุนในเนยแข็ง (Coral และคณะ, 2008; Lind, 2010)

แบคทีเรียในสกุล Propionibacterium มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลากหลายชนิดเป็นสารตั้งต้น แต่แบคทีเรียในสกุลอื่นๆ เช่น *Veillonella parvula* สามารถใช้ได้เพียงแลกเตต ไพรูเวต และซักซิเนต โดยไม่สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นสารตั้งต้นในการหมักได้ จึงทำให้แบคทีเรียสกุล Propionibacterium ถูกนำมาใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด และได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย GRAS (generally recognized as safe) โดยหน่วยงานอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Suwannakham, 2005; Xu และคณะ, 2011)

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

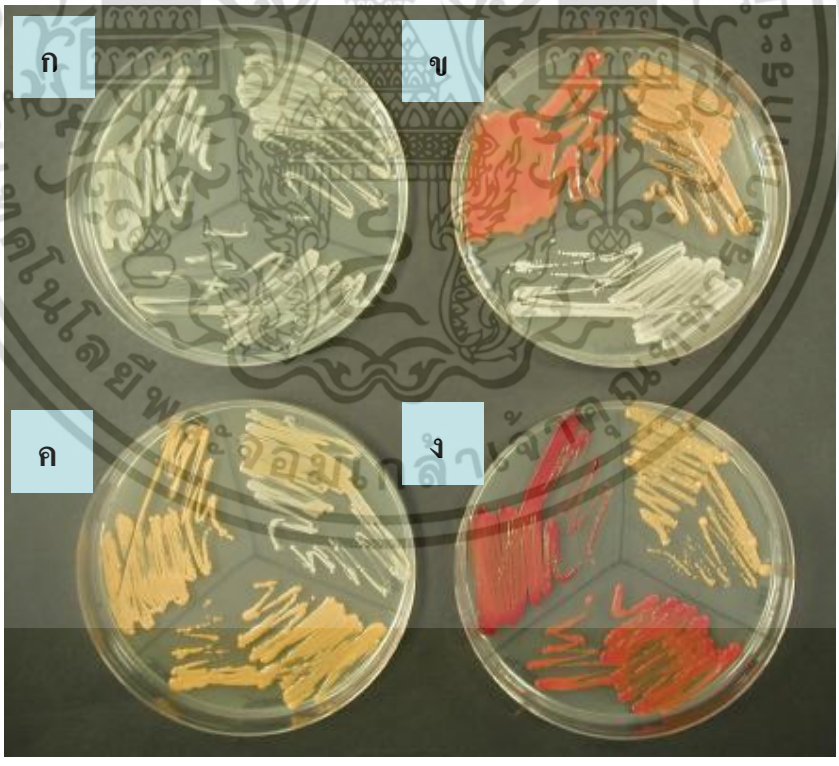
จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Propionibacterium acidipropionici NRRLB 3569	Kagliwal และคณะ (2013)
Propionibacterium acidipropionici DSM 4900	Dishisha และคณะ (2013)
Propionibacterium acidipropionici ATCC 4875	Liu และคณะ (2012); Zhang และ Yang (2009); Suwannakham และ Yang (2005); Gupta และ Srivastava (2001)
Propionibacterium acidipropionici TISTR 422	Choojun และ Yoonprayong (2012)
Propionibacterium freudenreichii CICC 10019	Wang และคณะ (2012)
Propionibacterium acidipropionici CGMCC 1.2230	Zhu และคณะ (2012); Zhu และคณะ (2010)
Propionibacterium acidipropionici CGMCC 1.2225	Liu และคณะ (2011)
Propionibacterium frudenreichii CCTCCM 207015	Feng และคณะ (2011); Feng (2010)
Propionibacterium acidipropionici ATCC 4965	Coral และคณะ (2008)
Propionibacterium frudenreichii ssp. *shermanii*	Kosmider และคณะ (2010)
Propionibacterium acidipropionici ATCC 25562	Bories และคณะ (2004); Himmi และคณะ (2000)

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียกรดโพรพิโอนิก คือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีการสร้างแฟลกเจลลา สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ รูปร่างกลม ท่อนยาว หรือท่อนไม้กระบอง การเรียงตัวของเซลล์อาจอยู่เป็นเซลล์คู่ หรือเดี่ยว ลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างทางสัณฐานวิทยา (morphology) และขนาดจะแตกต่างกันอย่างชัดเจน ขึ้นอยู่กับระยะของการเจริญเติบโตและสภาพแวดล้อม มีการเจริญแบบแฟกคัลเททีฟแอนแอโรบ (facultative anaerobe) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส สามารถหมักกรดโพรพิโอนิก กรดซักซินิก กรดแอซีติก และคาร์บอนไดออกไซด์ มีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน เจริญเติบโตช้า (Coral และคณะ, 2008; Lind, 2010) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีความสำคัญด้านอุตสาหกรรม หรือกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นม มีอยู่ 6 สายพันธุ์ คือ *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. theonii*, *P. coccoides*, *P. cyclohexanicum*, *P. acidipropionici* ดังแสดงในรูปที่ 2.6

สำหรับเชื้อ *P. acidipropionici* มีความสามารถในการผลิตกรด เชื้อในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากทางด้านอุตสาหกรรมต่างๆ และใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็ง อุตสาหกรรมการผลิตวิตามินบี 12 การผลิตกรดโพรพิโอนิก สารประกอบพวก เททระไพโรล (tatrapyrol) อุตสาหกรรมการทำขนมปังใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมักหญ้าสำหรับใช้เลี้ยงสัตว์ และใช้ในการเตรียมยาบางชนิด ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่เจริญอยู่บนผิวหนังของมนุษย์หรือทำให้เกิดสิว กลุ่มนี้ไม่ค่อยมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมคือ *P. acnes* เชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการการพัฒนากระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก ดังตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.6 แบคทีเรียโพรพิโอนิกสายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ ก) *P. freudenreichii*, ข) *P. acidipropionici*, ค) *P. jensenii* และ ง) *P. thoenii*

ที่มา: Lind (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก

จุลินทรีย์	คุณสมบัติ
P. acidipropionici ATCC 25562 *P. acidipropionici* ATCC 4875 *P. acidipropionici* P9 *P. acidipropionici* P68 *P. acidipropionici* P200910	เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกสูง เจริญได้ภายใต้สภาวะมีออกซิเจน โคโลนีมีสีเบจ (beige) ถึงสีส้ม
P. freudenreichii subsp. *freudenreichii*	ทนอุณหภูมิสูง ใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสวิสชีส (swiss cheese) โคโลนีมักมีสีขาวหรือสีเบจ (beige)
P. freudenreichii subsp. *shermanii*	ทนอุณหภูมิสูง ใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสวิสชีส (swiss cheese) โคโลนีมักมีสีขาวหรือสีเบจ (beige)
P. shermanii CDB10014 *P. shermanii* IF012426 *P. shermanii* TL162 *P. shermanii* P93 *P. shermanii* ATCC6207^{T}	เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก
P. thoenii P20 *P. thoenii* P38 *P. thoenii* P54	เป็นสายพันธุ์ที่ทนกรด (acid tolerant strain) มีการเจริญเติบโตช้ามากที่สุด โคโลนีมีสีเหลือง ส้ม แดง หรือน้ำตาล
P. jensenii P114 *P. jensenii* P117	เป็นสายพันธุ์ที่ทนกรด (acid tolerant strain) มีทั้งกลุ่มที่เจริญได้ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน โคโลนีมีสีครีมถึงสีเหลือง
P. cyclohexanicum TA-12^{T} *P. cyclohexanicum* IAM *P. cyclohexanicum* 14535^{T}	เป็นสายพันธุ์ที่ทนกรด (acid tolerant strain) ผลิตกรดแลกติก โคโลนีมีสีขาวหรือสีครีม
Clostridium propionicum ATCC 25522	เจริญในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น (obligate anaerobe) ผลิตโพรพิโอเนตผ่านวิถีอะคริเลต (acrylate pathway)

ที่มา: Rogers และคณะ (2006); Lind (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีทางชีวภาพผ่านวิธีการหมักโดยใช้แบคทีเรียโพรพิโอนิก แม้ว่ามีความน่าสนใจ แต่ความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ ผลได้ และอัตราการผลิตของกรดโพรพิโอนิกมีค่าค่อนข้างต่ำ (Liu และคณะ, 2011) โดยอุปสรรคหรือข้อจำกัดที่สำคัญในการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการทางชีวภาพ คือ แบคทีเรียมีอัตราการเจริญเติบโตช้า (Rogers และคณะ, 2006) กระบวนการหมักใช้เวลานานประมาณ 7-12 วัน (Rehm และ Reed, 1981) กระบวนการหมักจะถูกยับยั้งการผลิตโดยผลิตภัณฑ์กรดที่เกิดขึ้น แม้ว่าจะมีความเข้มข้นที่ต่ำมากก็ตาม (ประมาณ 10 กรัมต่อลิตร) ด้วยเหตุนี้ทำให้เกิดการจำกัดปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่จะสามารถผลิตได้ (Coral และคณะ, 2008; Xu และคณะ, 2011) นอกจากนั้นกระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์มีค่าใช้จ่ายสูงและมีความยุ่งยากซับซ้อน (Suwannakhan, 2005) ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยกระบวนการทางชีวภาพ เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงและใช้ต้นทุนต่ำ ตัวอย่างของกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยกระบวนการทางชีวภาพ แสดงดังตารางที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยจุลินทรีย์ กระบวนการหมัก แหล่งคาร์บอน และผลผลิต

จุลินทรีย์	กระบวนการหมัก	แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัม)	เอกสารอ้างอิง
P. acidipropionici	Batch adsorption on PEI-Luffa	กลีเซอรอล	20	0.29	0.74	Dishisha และคณะ
DSM4900	Batch adsorption on PEI-Poraver	(40 g/l)	15	1.40	0.86	(2012)
P. acidipropionici CGMCC	FBB (Batch)	ชานอ้อย	12.9	0.88	0.29	Zhu และคณะ (2012)
1.2230	FBB (Fed-batch)		58.8	0.38	0.37	
P. acidipropionici ATCC	Fed-batch	Xylose	53.2	0.23	-	Liu และคณะ (2012)
4875		Corncob molasses	71.8	0.28	-	
P. acidipropionici	FBB	Jeruralem artichoke	68.5	1.55	0.434	Liang และคณะ
	Fed-batch free cell	hydrolysate	40.6	0.19	0.379	(2012)
	repeat (FBB)		26.2	3.69	0.483	
P. acidipropionici CGMCC	Batch	กลีเซอรอล	21.9±0.72	0.152	0.572±0.018	Liu และคณะ (2011)
1.2225 (ATCC 4965)	Fed-batch	ต่อกลูโคส (4/1)	29.2±0.70	0.152	0.544±0.012	
P. acidipropionici ATCC	Free cell adapted culture	กลีเซอรอล	26.0±0.6	0.10±0.03	0.54±0.02	Zhang และ Yang
4875 (*ack* gene)	FBB adapted culture		23.0±1.3	0.25±0.03	0.54±0.02	(2009b)

หมายเหตุ: FBB = Fibrous-bed bioreactor; Extractive ferm = Extractive fermentation; CSTR = Continuously stirred tank reactor

ตารางที่ 2.4 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยจุลินทรีย์ กระบวนการหมัก แหล่งคาร์บอน และผลผลิต (ต่อ)

จุลินทรีย์	กระบวนการหมัก	แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัม)	เอกสารอ้างอิง
P. acidipropionici ATCC 4875 (mutant strain)	FBB (mutant strain)	กลูโคส	71.8±0.8	-	0.65±0.02	Suwannakham และ Yang (2005)
	FBB Free cell (mutant strain)		51.5±0.9	-	0.47±0.01	
	FBB Free cell (wild type)		52.2±1.1	-	0.41±0.02	
P. acidipropionici ATCC 25562	Entrapment in Ca^{+} alginate beads	กลีเซอรอล	12	0.80	0.75	Bories และคณะ (2004)
P. acidipropionici ATCC 4875	Batch	Cheese whey	15.7	0.312	-	Gupta และ Srivastava (2001)
	Continuous		14.5	0.715	-	
	Continuous with cell retention		19.7	0.980	-	
P. acidipropionici ATCC 25562	Batch	กลีเซอรอล	12	0.42	0.79	Himmi และคณะ (2000)
P. acidipropionici DSM 8250	CSTR+UF cell recycle	ซูโครส	16.2	8.0	0.4	Quesdada-Chanto และคณะ (1994)
		กากน้ำตาล	17.7	4.4	0.5	

หมายเหตุ: FBB = Fibrous-bed bioreactor; Extractive ferm = Extractive fermentation; CSTR = Continuously stirred tank reactor

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

2.5.1 คาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยวัตถุดิบที่แบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ไซโลส มอลโทส ซูโครส หางนม แล็กโทส (Kumar และ Babu, 2006) กลีเซอรอล (Himmi และคณะ, 2000; Liu และคณะ, 2011) กากน้ำตาล (Obaya และคณะ 2004; Coral และคณะ, 2008; Feng และคณะ, 2011) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบอินทรีย์หรือกลูโคส มอลโทส แลกโทส ซูโครส และแป้ง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบคาร์โบไฮเดรต (Prescott และ Dunn, 1959) การเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติกของแบคทีเรีย *P. acidipropionici* แสดงดังสมการ 2.1 และ *P. acidipropionici* ยังสามารถเปลี่ยนกรดแลกติกไปเป็นกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติก ดังสมการที่ 2.2 (Tyree และคณะ, 1991)

$$1.5\ C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O \qquad 2.1$$

$$3\ CH_3CHOHCOOH \longrightarrow 2\ CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O \qquad 2.2$$

มีรายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันจะส่งผลให้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่ได้แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแลกเตต กลีเซอรอล และกากน้ำตาล พบว่าแลกเตตเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกสูงสุด สำหรับกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเมื่อต้องการที่จะผลิตกรดโพรพิโอนิกที่บริสุทธิ์ โดยที่ไม่มีกรดแอซีติกเป็นผลพลอยได้ ส่วนกากน้ำตาลจะให้ผลได้ของมวลชีวภาพสูงสุด ซึ่งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกบนแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาล เช่น กลูโคส แล็กโทส และกาแล็กโทส จะให้ผลได้ของพลังงานมากกว่าแลกเตตและเป็นผลให้มีอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติกที่สูงกว่า (Lind, 2010)

2.5.2 ไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นอีกปัจจัยที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโพรพิโอนิก เนื่องจากใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน พิวรีน ไพริมิดีน คาร์ไฮเดรตบางชนิด ลิพิด เอนไซม์ โคแฟกเตอร์ และสารชนิดอื่นๆ แหล่งไนโตรเจนได้แก่ เกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และแอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) และสารประกอบอินทรีย์ เช่น ซอยเพปโตน (soy peptone) สารสกัดยีสต์ และน้ำแช่ข้าวโพด เป็นต้น โดยสารสกัดยีสต์คือแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุด มีรายงานการวิจัยของ Kagliwal และคณะ (2013) ศึกษาการกระบวนการหมักกรดโพรพิโอนิกจากแป้งสาลีและแหล่งไนโตรเจนต่างๆ คือ ยีสต์สกัด ซอยเพปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าการหมักข้าวสาลีที่ผ่านย่อย ซึ่งเทียบเท่ากับการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แป้งเป็นน้ำตาลถึง 90 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารสกัดยีสต์ 15 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเป็น 48.61 กรัมของกรดโพรพิโอนิก

2.5.3 โคแฟคเตอร์

โดยทั่วไปการทำงานของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องอาศัยโคแฟกเตอร์เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาการสร้างกรดโพรพิโอนิก โคแฟคเตอร์ที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในอาหารส่วนใหญ่ คือ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โคบอลต์คลอไรด์ (CO_2Cl_2) แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) มีรายงานการวิจัยของ Coelho และคณะ (2011) ได้รายงานการใช้ K_2HPO_4 ซึ่งเป็นโพแทสเซียมไอออนและฟอสเฟตสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และยังเป็นบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.5.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีในค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในจุลินทรีย์มีผลให้การเจริญเติบโตและการสร้างกรดโพรพิโอนิกในเซลล์จุลินทรีย์จึงแตกต่างกัน ค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกอยู่ระหว่าง 6.5-7.5 (Tittster, 1940; Champagns และคณะ, 1989; Crespo และคณะ, 1990; Yang และคณะ, 1994) แต่เจริญได้ดีที่สุดในช่วง 7.0 (Prescott และ Dunn, 1959) สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4.0 เชื้อแบคทีเรีย *P. acidipropionici* จะไม่สามารถเจริญได้ และถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 7.0 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะลดลงอย่างรวดเร็ว

2.5.5 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสร้างกรดโพรพิโอนิก โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียในสกุล Propionibacteria มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตประมาณ 30 องศาเซลเซียส (Lind, 2010) แต่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิช่วง 15-40 องศาเซลเซียส ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และภาวะในการเจริญอื่นๆ

2.5.6 การให้อากาศ

องค์ประกอบของการให้อากาศมีผลต่อการสังเคราะห์สารแมแทบอไลท์ เมื่อนำเชื้อ *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่าสภาวะที่มีออกซิเจนจะมีการผลิตกรดแอซีติกและคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มสูงขึ้น แต่มีการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่ำลง (Lind, 2010) ในงานวิจัยของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rogers และคณะ (2006) มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกกับออกซิเจน เกี่ยวกับอัตราการเจริญเติบโตและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก พบว่า *P. shermanii* สายพันธุ์ CDB 10014 เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน 24 มิลลิโมลของออกซิเจนลิตรต่อชั่วโมง ระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารที่มีกลูโคส และอัตราการเจริญของเซลล์ลดลงจากสภาวะที่มีออกซิเจนประมาณ 1 ใน 3 เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ในขณะที่ผลได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังนั้นการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกจึงถือว่ามีความไวต่อออกซิเจน แต่การเจริญเติบโตของเชื้อ *P. shermanii* และ *P. acidipropionici* ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการผลิตกรดโพรพิโอนิกและมีการสร้างกรดแอซีติกและกรดแลกติกเพิ่มขึ้น และงานวิจัยของ Filya และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาการใช้เชื้อ *P. acidipropionici* เพียงชนิดเดียวหรือผสมร่วมกับ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งจะมีผลต่อกระบวนการหมักและสภาวะการให้อากาศ พบว่าการใช้เชื้อ *P. acidipropionici* เพียงชนิดเดียวจะมีการสร้างกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติกในระดับที่สูงกว่าการใช้เชื้อ *L. plantarum* เพียงชนิดเดียว และเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* กับ *L. plantarum* ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการยับยั้งกิจกรรมของยีสต์ที่มีต่อข้าวสาลี ข้างฟ่าง และข้าวโพดในอาหารสัตว์

2.5.7 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

แคลเซียมคาร์บอเนตมีบทบาทในการปรับให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ให้ลดต่ำลงมาก ซึ่งทำให้มีการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สมบูรณ์มากขึ้น รายงายวิจัยของ Choojun และ Yoonprayong (2012) ศึกษาการปรับปรุงการผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อยับยั้งเชื้อราโดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตโดยใช้หางนมเป็นซับสเตรทการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเซลล์ตรึงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งใช้แคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 1 และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 5 นอร์มอล เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ให้กรดโพรพิโอนิกสูงสุด งานวิจัยของ สุรนารถ (2550) ศึกษาผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์-บอเนตที่เหมาะสมในการผลิตกรด โพรพิโอนิกจากหางนม ในการหมักแบบกะโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 20.66 กรัมต่อลิตร สูงกว่าอาหารที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งให้ผลผลิต 11.30 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากอาหารที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1, 1.5, 2 และ 2.5 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ดังกล่าวเหล่านี้สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อกรดโพรพิโอนิก

จุลินทรีย์	กระบวนการผลิต	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัม)	เอกสารอ้างอิง
P. acidipropionici NRRL B 3569	Batch	Whole wheat flour	สารสกัดยีสต์ (15 g/l)	6.0	37	48.61	-	-	Kagliwal และคณะ (2013)
P. freudenreichii subsp. *shermanii*	FBB	กลูโคส กลีเซอรอล กลูโคสและกลีเซอรอล	น้ำแช่ข้าวโพด	6.5	32	-	0.19 0.11 0.18-0.23	0.39 0.69 0.54-0.65	Wang และ Yang (2013)
P. acidipropionici DSMZ 8250, *V. criteci* DSM 20734, *L. zeae* DSMZ 20178	Fed-batch batch	Flour hydrolysate	-	-	-	30 17-20	0.33 -	- -	Sabra และคณะ (2013)
P. acidipropionici DSM 4900	Batch	กลีเซอรอล (85 g/l)	น้ำมันฝรั่ง	6.5	32	43.8	0.88	84 (mol%)	Dishisha และคณะ (2013)
V. criteci DSM 20734 *L. zeae* DSMZ 20178	CSTR	กลูโคส	สารสกัดยีสต์และเปปโตน	6.0	37	28	0.61	-	Dietz และคณะ (2013)
P. acidipropionici DSM 4900	Batch (PEI-Luffa) Batch (PEI-Poraver)	กลีเซอรอล (40 g/l)	-	6.5	32	20 15	0.29 1.40	0.74 0.86	Dishisha และคณะ (2012)

ตารางที่ 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อกรดโพรพิโอนิก (ต่อ)

จุลินทรีย์	กระบวนการผลิต	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัม)	เอกสารอ้างอิง
P. acidipropionici TISTR 422 (Ca^{+}alginate immobilization)	Batch (2 รอบ)	เวย์	สารสกัดยีสต์	6.5	30	29.24	-	-	Choojun และ Yoonprayong (2012)
P. acidipropionici ATCC 4875	Fed-batch	เฮมิเซลลูโลส Corncob molasses	สารสกัดยีสต์	6.0	30	53.2 71.8	0.23 0.28	- -	Liu และคณะ (2012)
P. acidipropionici CGMCC 1.2230	Batch FBB (Fed-batch)	ชานอ้อย	-	7.0	30	12.9 58.8	0.88 0.38	0.29 0.37	Zhu และคณะ (2012)
P. freudenreichii	PFB	กากน้ำตาล กากน้ำตาล	สารสกัดยีสต์ Waste cells	-	35	91.89±4.59 79.81±3.99	- -	- -	Feng และคณะ (2011)
P. freudenreichii CCTCC M207015	FBB (batch) FBB (fed-batch)	ไม่ย่อยกากน้ำตาล ย่อยกากน้ำตาล	-	-	-	41.22 91.9	0.34 0.36	0.41 0.46	Xu และคณะ (2011)
P. acidipropionici CGMCC 1.2225	Batch Fed-batch	กลีเซอรอลและกลูโคส (4:1)	สารสกัดยีสต์	6.5	30	21.9±0.72 29.2±0.70	0.152 0.152	0.572±0.018 0.544±0.012	Liu และคณะ (2011)

ตารางที่ 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อกรดโพรพิโอนิก (ต่อ)

จุลินทรีย์	กระบวนการผลิต	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัม)	เอกสารอ้างอิง
P. freudenreichii ssp. *shermanii*	Batch	แล็กโทส, แล็กโทสและกลีเซอรอล, แล็กโทสและกลีเซอรอลหยาบ	-	-	-	22.57 24.47 24.80	- - -	- - -	Kośmider และคณะ (2010)
P. freudenreichii CCTCC M207015	MFB (batch) MFB (Fed-batch)	กลูโคส (80 g/l)	สารสกัดยีสต์และเปปโตน	-	-	32.65±0.77 36.61±0.57	0.19±0.0014 0.23±0.0023	- -	Feng และคณะ (2010)
P. freudenreichii CCTCC M207015	Batch pH-shift Fed-batch	กลูโคส	-	6.0	35	14.58 19.21 25.23	0.122 0.178 0.150	- - -	Feng และคณะ (2010)
P. freudenreichii CCTCC M207015	Batch	กลีเซอรอล	สารสกัดยีสต์	7.0	30	44.62±1.12	0.20±0.075	-	Zhu และคณะ (2010)
P. acidipropionici ATCC 4875 (mutant)	Batch FBB (Fed-batch)	กลูโคส	สารสกัดยีสต์	6.5	32	15.6 97	0.22 0.07	0.37 0.57	Zhang และ Yang (2009a)

ตารางที่ 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อกรดโพรพิโอนิก (ต่อ)

จุลินทรีย์	กระบวนการผลิต	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัม)	เอกสารอ้างอิง
P. acidipropionici ATCC 4875 (mutant)	FBB	กลีเซอรอล	สารสกัดยีสต์	7.0	32	23.0±1.3	0.25±0.03	0.59±0.02	Zhang และ Yang (2009b)
P. acidipropionici ATCC 4965	Batch (133h)	กากน้ำตาล กลีเซอรอล แลกเทต	สารสกัดยีสต์	6.8–7.0	30	8.23±0.12 6.77±0.11 15.06±0.56	- - -	- - -	Coral และคณะ (2008)
P. acidipropionici ATCC 4965	Batch (133h)	กากน้ำตาล กลีเซอรอล แลกเทต	สารสกัดยีสต์	6.8–7.0	36	6.92±0.12 4.87±0.32 13.32±0.56	- - -	- - -	Coral และคณะ (2008)
P. acidipropionici ATCC 4875 (mutant)	FBB Fed-batch (wild type) Fed-batch (mutant)	กลูโคส	-	6.5	32	71.8±0.8 52.2±1.1 51.5±0.9	- - -	0.65±0.02 0.42±0.02 0.47±0.01	Suwannakkham และ Yang (2005)
P. acidipropionici ATCC 4875	Flask	Chees whey permeate	สารสกัดยีสต์	5.0-7.0	30	3.3	0.458	-	Morales และคณะ (2006)

ตารางที่ 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อกรดโพรพิโอนิก (ต่อ)

จุลินทรีย์	กระบวนการผลิต	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัม)	เอกสารอ้างอิง
P. acidipropionici ATCC 4875 (mutant)	FBB	กลูโคส	สารสกัดยีสต์	6.5	32	71.8±0.8	-	0.65±0.02	Suwannakham และ Yang (2005)
	FBB (wild type)					52.2±1.1	-	0.42±0.02	
	FBB (mutant)					51.5±0.9	-	0.47±0.01	
P. acidipropionici ATCC 4875	Batch	แล็กโทส	-	6.5	30	22	0.25	0.44	Goswami และ Srivastava (2001)
	CFCR 5µm					18.5	0.9	0.40	
P. acidipropionici ATCC 4875	Continuous with cell retention	Cheese whey	สารสกัดยีสต์	6.0	30	19.7	0.98	-	Gupta และ Srivastava (2001)
P. acidipropionici ATCC 4875	Fed-batch	แล็กโทส	-	6.0	30	37	0.4	-	Goswami และ Srivastava (2000)

หมายเหตุ: CFCR = continuous fermentation in situ cell retention bioreactor, FBB = fibrous-bed bioreactor, CSTR = continuously stirred tank reactor; MFB = Multi-point fibrous-bed bioreactor

2.6 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง หมายถึง จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตให้อยู่ในบริเวณที่ทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพักตัว (resting cells) หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (death cells) (อรทัย, 2553; Chibata และคณะ, 1978) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ (free cell) เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีข้อดี คือ สามารถใช้ซ้ำในระบบกะ หรือระบบต่อเนื่องได้ง่ายกว่า มีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆได้น้อยลง การแยกผลผลิตทำได้ง่ายกว่า เซลล์ที่ถูกตรึงส่วนใหญ่เป็นเซลล์ในระยะพักตัวจึงต้องการพลังงานน้อย เพียงเพื่อรักษาสภาพความอยู่รอด ทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ (Mohammadi และคณะ, 2008)

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงสามารถนำมาใช้ในการผลิตสารอินทรีย์ เช่น การผลิตกรดอะมิโน กรดอินทรีย์ กรดนิวคลีอิก สารปฏิชีวนะ ฮอร์โมน และน้ำตาล เป็นต้น ในการวิเคราะห์ทางคลินิกและทางเคมี เช่น ตัวรับรู้ชีวภาพ (microbial sensor) สำหรับโครงสร้างทางเคมีของการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradable polymer) และการศึกษากลไกปฏิกิริยาของเอนไซม์ ยังมีการใช้เซลล์ตรึงในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตเนยแข็ง และการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น มีรายงานการศึกษาการประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 2.6

นอกจากนี้ยังสามารถนำเพกทินมาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ รายงานการศึกษาของ Panesar และคณะ (2007) พบว่าใช้เพกทินในการตรึงเซลล์ *L. casei* สำหรับการผลิตกรดแลคติกจากหางนม รายงานการศึกษาของ Kurita และคณะ (2008) ศึกษาลักษณะของเพกทินที่สกัดจากเปลือกมะนาว (citrus peel) ในส่วนที่มีกรดซิตริก โดยทำการศึกษาความแตกต่างของพีเอชและอุณหภูมิ พบว่าที่พีเอชเป็นกลางจะให้ความเหนียวแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะเดียวกันอุณหภูมิมากขึ้นจะให้ความเหนียวลดลง แต่ยังคงมีความเหนียวมากกว่าเมื่อเทียบกับเพกทินที่ไม่ผ่านการย่อย ดังนั้น ในงานวิจัยในครั้งนี้จึงได้ประยุกต์ใช้เพกทินที่สกัดจากใบกรุงเขมาและนำมาตรึงเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้ผลิตกรดโพรพิโอนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 ผลการศึกษาการประยุกต์ใช้วัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

จุลินทรีย์	วัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์	ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	เอกสารอ้างอิง
P. acidipropionici DSM 4900	PEI-Luffa	20	Dishish และคณะ (2013)
	PEI-Poraver	15	
P. acidipropionici CGMCC1.2230	FBB (batch)	12.9	Zhu และคณะ (2012)
	FBB (fed-batch)	58.8	
P. acidipropionici TISTR 422	แคลเซียมแอลจิเนต (Batch 2 รอบ)	29.24	Choojun และ Yoonprayong (2012)
P. acidipropionici	Fibrous-bed bioreactor (FBB)	68.50	Liang และคณะ (2012)
P. freudenreichii CCTCC M207015	PFB, ยีสต์สกัด	91.89±4.59	Feng และคณะ (2011)
	PFB, เซลล์แบคทีเรีย	79.81±3.99	
P. freudenreichii CCTCC M207015	MFB (batch)	32.65±0.77	Feng และคณะ (2010)
	MFB (fed-batch)	36.61±0.57	
P. acidipropionici ATCC 4875 (mutant)	FBB (fed-batch)	97	Zhang และ Yang (2009a)
P. acidipropionici ATCC 4875 (mutant)	FBB	23.0±0.13	Zhang และ Yang (2009b)
P. acidipropionici ATCC 255562	แคลเซียมแอลจิเนต	12	Boies และคณะ (2004)

หมายเหตุ: FBB = Fibrous-bed bioreactor; PFB = Plant fibrous-bed bioreactor; MFB = Multi-point fibrous-bed bioreactor

2.7 กรุงเขมา (อรทัย, 2553)

2.7.1 ลักษณะทั่วไปของกรุงเขมา

กรุงเขมา *(Cissampelos pareira* L.) ดังรูปที่ 2.7 มีชื่อเรียกในท้องถิ่นอื่น เช่น ขงเขมาพระพาย กรุงบาดาลใบก้นบิด (ภาคกลาง), สีฟัน (เพชรบุรี), เครือหมาน้อย (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ), เปล้าเลือด (แม่ฮ่องสอน), อะกามินเยาะ (มลายู-นราธิวาส) กรุงเขมาเป็นไม้เถาที่เลื้อยไปตามต้นไม้อื่น ไม่มีมือเกาะ มีคุณสมบัติพิเศษ คือ เมื่อนำมาขยี้กับน้ำแล้วทิ้งไว้ประประมาณ 15 นาที เกิดลักษณะเป็นเจลหรือวุ้น เนื่องจากมีเพกทินเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก การกระจายพันธุ์ในประเทศไทยพบว่าสามารถพบอยู่ทั่วไปแทบทุกภาคของประเทศโดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้พบว่ามีการกระจายพันธุ์ที่ประเทศอินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย แอฟริกา และอเมริกา สภาพที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ ริมแม่น้ำลำธาร ในป่าผลัดใบ ตั้งแต่พื้นที่ราบระดับน้ำทะเลจนถึงพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,100 เมตร

รูปที่ 2.7 กรุงเขมา

ที่มา: www.thaicattle.com/.../plant/kamoun.jpg (วันที่สืบค้น 15 ธันวาคม 2556)

ในการทดลองในครั้งนี้ได้เลือกงานวิจัยของอรทัย (2553) นำมาศึกษาต่อเนื่องในหัวข้อการตรึงเซลล์ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 4 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของสายยาง 1.52 มิลลิเมตร ให้ผลผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 25.03 และ 21.88 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 และ 108 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวกับการสกัดกรุงเขมาส่วนใหญ่นิยมวิจัยในเรื่องการสกัดเพกทินจากใบกรุงเขมา อย่างเช่นงานวิจัยของจีราภรณ์ (2549) ศึกษาการผลิตเพกทินผงจากกรุงเขมาด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือน้ำกลั่นและกรดซิตริกร้อยละ 7 ใช้อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย 1:40 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพกทินประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ สกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ฟอกสีด้วยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 0.2 ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 จากนั้นอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณเพกทินเท่ากับร้อยละ 21.65 ± 0.18 และ 48.48 ± 0.35 (ต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ พบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่นมีปริมาณกรดกาแลคทูโรนิกสูงสุด (ร้อยละ 76.45± 0.13) มีปริมาณเมทธอกซิล ร้อยละ 8.08 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณเมทธิลเอสเทอร์ต่ำ ในขณะที่ น้ำทิพย์ และยุวภา (2550) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิต่อคุณภาพของ เพกทินที่สกัดได้จากใบกรุงเขมา ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ 2, 4, 6 และ 60, 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณเพกทินมากกว่าที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพบว่าการสกัดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 มีปริมาณเถ้าน้อยที่สุด ส่งผลให้เพกทินที่สกัดได้มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อเวลาการเกิดเจลของเพกทิน การสกัดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 เพกทินจะเกิดเจลได้เร็วและเจลที่ได้มีลักษณะอ่อนนุ่ม แต่การสกัดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 จะเกิดเจลได้ช้าแต่เจลมีความแข็งแรงกว่า ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีของเพกทิน

2.8 ยีสต์ออโตไลเสท

ยีสต์ออโตไลเสทเป็นยีสต์สกัดประเภทหนึ่ง ได้จากการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของยีสต์ (Erten และ Tangular, 2006; Tangular และ Erten, 2008) ซึ่งยีสต์สกัดที่ได้จากการย่อยตัวเองเป็นที่รู้จักกันภายใต้ชื่อ สารสกัดยีสต์ (yeast extract) (Bekatorou และคณะ, 2006) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย เซลล์ที่ย่อยสลาย โปรตีนที่ละลายได้ และผนังเซลล์ ส่วนของผนังเซลล์จะทำให้เวลาใช้งานจะได้สารละลายที่ขุ่น ในกระบวนการผลิตสามารถแยกเอาส่วนของผนังเซลล์ที่ไม่ละลายออกได้ด้วยการกรองหรือปั่นเหวี่ยง ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการแยก เอาหนังเซลล์ออกอาจเรียกว่า ออโตไลซ์ยีสต์ (autolyzed yeast) ซึ่งประกอบด้วยผนังเซลล์ร้อยละ 50 ของปริมาณของแข็งทั้งหมด ส่วนผลิตภัณฑ์ที่แยกเอาผนังเซลล์ออกแล้วเรียกว่า autolyzed yeast extract (ธีรวุฒิ, 2544)

2.8.1 วิธีการผลิต

การผลิตยีสต์ออโตไลเสทสามารถทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปแบ่งได้ 3 วิธี คือ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ (Tangular และ Erten, 2008)

2.8.1.1 วิธีทางกายภาพ เป็นการทำลายเซลล์ยีสต์ด้วยวิธีทางกล โดยใช้เครื่องโฮโมจีไนซ์ที่มีความดันสูงประมาณ 20,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทั้งชนิด French Press, Eaton Press และGualin homogenizer โดยจำนวนครั้งที่ผ่านเครื่องสามารถเลือกเพื่อให้ได้ตามความต้องการที่จะทำให้เซลล์แตก (Jazwinski, 1990) ตัวเครื่องประกอบด้วยปั๊มผลักดัน (positive displacement pump) เป็นตัวขับดันส่วนของเหลวข้นของยีสต์ผ่านช่องเล็กๆ ทำให้เกิดแรงเฉือนและเซลล์เกิดการแตกหรือฉีกขาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารต่างๆภายในเซลล์จะถูกปลดปล่อยออกมา ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีส่วนผสมของโปรตีน กรดนิวคลีอิก และชิ้นส่วนของผนังเซลล์ แต่การใช้วิธีนี้จะมีข้อเสียในเรื่องการแยกชิ้นส่วนของเซลล์ออกจากของเหลว เพราะกรดนิวคลีอิกที่ปล่อยออกมาจะทำให้ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้น (Asenjo และ Andrews, 1990)

2.8.1.2 วิธีทางเคมี เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตยีสต์สกัดทางการค้า แบ่งได้ดังนี้

ก. พลาสโมไลซิส (plasmolysis) เป็นการสกัดส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายอินทรีย์หรือเกลือ เช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform) โทลูอีน (toluene) อีเทอร์ (ether) แอลกอฮอล์ (alcohol) เกลือแกง น้ำตาล และอะซีเตทเอสเทอร์ (acetate esters) (เช่น เอทิลอะซีเตท (ethyl acetate) และเอมิลอะซีเตท (amylacetate)) ที่ความเข้มข้นสูงโดยไม่มีการทำงานของเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง (Kelly, 1983; Sugimoto, 1974) ซึ่งในภาวะที่สารเหล่านี้มีความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อแรงดันออสโมติกของเซลล์ยีสต์ ทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลของน้ำในเซลล์ ทำให้ยีสต์ตายและเกิดการย่อยตัวเองของยีสต์ (Reed และ Nagodawithana, 1991) การผลิตยีสต์สกัดด้วยวิธีพลาสโมไลซิสนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ เรียกว่า ยีสต์พลาสโมไลเสท (yeast plasmolysate) แต่ยีสต์สกัดที่ได้จากการพลาสโมไลซ์ด้วยเกลือจะมีปริมาณเกลือสูง ทำให้เกิดข้อจำกัดเกี่ยวกับปริมาณการใช้ในสูตรอาหาร

การพลาสโมไลซิสเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการทำลายเซลล์ เช่น การใช้เกลือ หรือเอทิลอะซีเตต หรือไอโซโพรพานอลเป็นสารพลาสโมไลซ์ ใช้ระยะเวลาประมาณ 5-8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส (Olsen, 1995) การใช้เกลือเป็นสารพลาสโมไลซ์ (Plastmolyse reagent) ไม่เพียงแต่ช่วยในการละลายยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆได้ แต่ปัจจุบันไม่เป็นที่นิยมเพราะผู้บริโภคมีความต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณของเกลือโซเดียมต่ำ (Nagodawithana, 1995)

ข. การไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เป็นการย่อยเซลล์ยีสต์โดยใช้กรดแก่ร่วมกับการใช้ความร้อน ในการย่อยสารโมเลกุลใหญ่ในเซลล์ยีสต์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิกให้อยู่ในรูปสารโมเลกุลเล็กที่ละลายได้ วิธีการผลิตจะเริ่มจากเตรียมยีสต์เข้มข้นร้อยละ 65-85 เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส (Reed และ Peppler, 1973) ปล่อยให้เกิดการไฮโดรไลซิส ทั้งนี้ระยะเวลาในการไฮโดรไลซิสจะขึ้นกับความเข้มข้นของกรดที่ใช้ โดยทั่วไปการไฮโดรไลซ์จะทำจนกระทั่งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนประมาณร้อยละ 50-60 ก่อนทำให้เป็นกลาง (neutralize) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโซเดียมคาร์บอเนตปรับพีเอชเป็น 5-6 แล้วจึงกรองแยกส่วนสารละลายมาทำให้เข้มข้นจนมีความชื้นสุดท้ายร้อยละ 3-5 ผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจเรียกว่า ยีสต์ไฮโดรไลเสท (yeast hydrolysate) ในการผลิตนี้จะเกิดเกลือในปริมาณที่สูง การใช้กรดซัลฟิวริกในการไฮโดรไลซิสแล้วทำให้เป็นกลางด้วยปูนขาว (lime) และกรองแยกเกลือแคลเซียมซัลเฟตออกด้วยการกรองจะทำให้มีเกลือใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรไลเสทปริมาณต่ำ อย่างไรก็ดีในทางอุตสาหกรรมจะใช้กรดไฮโดรคลอริกในการทำไฮโดร-ไลเสทแม้ว่าการผลิตยีสต์สกัดโดยวิธีนี้จะให้ปริมาณการผลิตสูง แต่จะมีข้อจำกัดในเรื่องของอุปกรณ์ที่ใช้ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับกรด และกรดที่ใช้อาจทำลายกรดอะมิโนและวิตามินที่มีอยู่ด้วย ยีสต์ไฮโดรไลเสทที่ได้จะมีสมบัติเหมือนโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชแต่มีราคาถูกกว่า จึงไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร นอกจากนี้อาจเกิดสารประกอบ 3-chloropropanediol ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งขึ้นได้ และมีเกลือโซเดียมในปริมาณที่สูง (Nagodawithana, 1995) ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่นิยมนำมาผลิตเป็นยีสต์สกัดเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Reed และ Nagodawithana, 1991)

2.8.1.3 วิธีทางชีวภาพ คือการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ (autolysis) จากการทำงานของเอนไซม์ที่มีในเซลล์ยีสต์เอง เป็นวิธีที่ให้ยีสต์สกัดที่มีคุณภาพและกลิ่นรสที่ใกล้เคียงเนื้อสัตว์ที่สุด กระบวนการนี้เกิดจากการควบคุมอุณหภูมิ พีเอช ระยะเวลา และสารบางชนิดที่เติม ภายใต้ภาวะที่ทำให้เซลล์ยีสต์ตายแต่ไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย (degradative enzyme) ที่มีอยู่ภายในเซลล์ยีสต์ (Hough และ Maddox, 1970; Reed และ Nagodawithana, 1991) เช่นที่ภาวะพีเอช 5.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 ชั่วโมง หรือที่ 45-50 องศาเซลเซียส นาน 24-36 ชั่วโมง (Reed และ Nagodawithana, 1991) หรือจนจนกระทั่งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนประมาณ ร้อยละ 50 อาจทำการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์หลังจากเซลล์ตายภายใต้ภาวะที่กำหนด เอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์จะเป็นอิสระและทำการย่อยสลายสับสเตรท เอนไซม์จะเริ่มย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์ก่อนผนังเซลล์จะบางลงและสูญเสียสมบัติของเยื่อเลือกผ่าน (semi-permeable membrane) จนกระทั่งเซลล์แตก ปลดปล่อยสารต่างๆภายในเซลล์ออกมา เอนไซม์ในการย่อยตัวเองของยีสต์จะมีลำดับการทำงานคือ ขั้นแรกเอนไซม์โปรตีเอส (protease) จะทำการย่อยเนื้อเยื่อโปรตีนและแมนแนน ชั้นนอกและปลดปล่อยโปรตีนออกมาก่อน (Liu และคณะ, 1988) ต่อมาเอนไซม์ในกลุ่มกลูคาเนส (glucanase) จะจับกับสายกลูแคนที่ด้านในผนังเซลล์ ทำการย่อยกลูแคนให้มีขนาดเล็กลงและละลายได้ เมื่อเอนไซม์กลูคาเนสทำงานร่วมกับโปรตีเอสจะย่อยผนังเซลล์ให้บางลงจนเหลือแต่พลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) เมื่อพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) แตกออกของเหลวภายในเซลล์จะถูกปล่อยออกมา ชิ้นส่วนของผนังเซลล์และคาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยจากเอนไซม์ กลูคาเนส และไคตีเนส (chitinase) โปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสได้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน (Hunter และ Asenjo, 1988) นอกจากนี้ยังมีการทำงานของเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) จะย่อยสลาย RNA และ DNA ได้เป็นสารประกอบโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) โมโนนิวคลีโอไทด์ (mononucleotide) และนิวคลีโอไซด์ (Reed และ Nagodawithana, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2 องค์ประกอบทางเคมี (ธีรวุฒิ, 2544)

องค์ประกอบของยีสต์ออโตไลเสท ยีสต์ออโตไลเสทเป็นแหล่งของโปรตีน กรดอะมิโน เพปไทด์ น้ำตาล นิวคลีโอไทด์ และวิตามินบี องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทแสดงอยู่ในตารางที่ 2.6

ปริมาณของวิตามินบีในยีสต์ออโตไลเสทเป็นดังตารางที่ 2.7 โดยจะพบว่ายีสต์ออโตไล-เสทจะมีปริมาณของวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ไนอาซิน และกรดแพนโทธีนิค (pantothenic acid) สูง

ตารางที่ 2.7 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสท

องค์ประกอบทางเคมี	**กรัม ต่อ100 กรัมยีสต์ออโตไลเสท**
โปรตีนหยาบ (crude protein)	67.9
ไขมัน	น้อยกว่า 0.1
คาร์โบไฮเดรต	17.6
เส้นใย (dietary fiber)	4.14
น้ำตาล (total sugar)	4.3
เถ้า	8.37
ความชื้น	4.0
พลังงาน	327 แคลอรี่ต่อ 100 กรัม

ที่มา: Nagodawithana (1995)

ตารางที่ 2.8 ปริมาณของวิตามินในยีสต์ออโตไลเสท

วิตามิน	**ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อ100 กรัม)**
ไทอามีน (Thiamine)	7.36
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	5.61
ไนอาซิน (Niacin)	7.68
กรดแพนโทธีนิค (Pantothenic acid)	21.9
ไบโอติน (Biotin)	0.05
ไพริดอกซิน (Pyridoxine)	2.97
กรดโฟลิค (Folic acid)	2.81
วิตามินบี 12 (Vitamin B_{12})	น้อยกว่า 0.001

ที่มา: ดัดแปลงจาก Nagodawithana (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไปยีสต์จะมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 35-60 ส่วนยีสต์ออโตไลเสทจะมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 50-70 (วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl) คาร์โบไฮเดรตและไขมันส่วนใหญ่จะเสียไปในขั้นตอนการแยกผนังเซลล์และส่วนของเซลล์ของการผลิตยีสต์ออโตไลเสทจะมีปริมาณ RNA ประมาณร้อยละ 5-10 ส่วนปริมาณของกรดอะมิโนในยีสต์ออโตไลเสทเป็นดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.9 ปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในยีสต์ออโตไลเสท

กรดอะมิโน	**กรัมต่อ 100 กรัม**
อะลานีน (Alanine)	4.35
อาร์จินิน (Arginine)	3.20
กรดแอสพาติก (Aspartic acid)	6.41
ซิสเทอีน (Cysteine)	0.68
กรดกลูตามิก (Glutamic acid)	10.66
ไกลซีน (Glycine)	2.83
ฮิสทิดีน (Histidine)	1.37
ไอโซลิวซีน (Isoleucine) *	3.01
ลิวซีน (Leucine) *	4.37
ไลซีน (Lysine)*	4.98
เมทไทโอนีน (Methionine) *	0.93
ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine)*	2.64
โพรลีน (Proline)	2.23
เซอรีน (Serine)	2.85
ทรีโอนีน (Threonine)*	2.96
ทริปโตเฟน (Tryptophan)*	0.64
ไทโรซีน (Tyrosine)	2.29
วาลีน (Valine)*	3.38

*กรดอะมิโนจำเป็น

ที่มา: Thornton (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 การออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรมสถิติ

วิธีการออกแบบการทดลองแบบดั้งเดิมหรือแบบทีละปัจจัย (one factor at a time) ซึ่งวิธีการทดลองแบบนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในอดีต เป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยที่สนใจโดยกำหนดให้ปัจจัยอื่นๆ คงที่ (Cotârlet และ Bahrim, 2012) และเมื่อได้ค่าผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจึงเปลี่ยนระดับของปัจจัยที่ศึกษาและเมื่อให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจึงเปลี่ยนไปศึกษาปัจจัยตัวที่สองและทำอย่างนี้ไปเรื่อยๆ จนครบทุกปัจจัยที่ต้องการศึกษา สำหรับข้อดี คือ ขั้นตอนการทดลองไม่ยุ่งยาก (Kumar และ Satyanarayana, 2007) แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อเสีย คือ ไม่สามารถทราบผลปัจจัยที่มีร่วมกันได้ รวมทั้งใช้เวลานานถ้าหากทำการศึกษาหลายปัจจัย (Saxena และ Singh, 2010) นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากวิธีการดังกล่าวอาจจะให้ผลการทดลองได้ไม่ดีที่สุด

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรมทางสถิติในงานวิจัยของหลายสาขา เช่น เทคโนโลยีชีวภาพ ชีววิทยา จุลชีววิทยา เทคโนโลยีการอาหาร วิศวกรรมศาสตร์ วิศวกรรมเคมี สิ่งแวดล้อม และการแพทย์ (Prvan และ Street, 2002) ซึ่งการทดลองจะมีความครอบคลุม รวมทั้งลดระยะเวลาและทรัพยากรในการทดลอง (Chauhn และคณะ, 2007) สามารถหาความสอดคล้องกับพื้นที่ของการตอบสนองและประเมินความเหมาะสมในสภาวะของการทดลอง (Mabrouk และคณะ, 2012; Saxena และ Singh, 2010) นอกจากนี้ยังทราบผลของปัจจัยที่มีผลร่วมกัน (Wu และคณะ, 2007; Chauhn และคณะ, 2007) ระหว่างปัจจัยได้ด้วยอิทธิพลร่วม คือ ผลของการที่ปัจจัยร่วมที่มีอยู่ในหลายกระบวนการ (ตารางที่ 2.10) วิธีการออกแบบการทดลองที่จะสามารถสร้างพื้นผิวตอบสนองได้ ได้แก่ Factorial Design (FD), Fractional Factorial Design (FFD), Blanced Incomplete Block Design (BIBD), Central Composite Design (CCD), Box-Behnken Design (BBD) และ Plackett-Burman Design (PBD) เป็นต้น

ตารางที่ 2.10 หลักการเลือกใช้การออกแบบการทดลองแต่ละชนิด

ชนิดการออกแบบ (Design Type)	การคัดเลือก (Screening)	การหาค่าที่ดีที่สุด (Optimiztion)	พื้นผิวตอบสนอง (Response surface)	การศึกษาอิทธิพล (Interaction studies)
BBD	No	Yes	Yes	Selected
CCD	No	Yes	Yes	Selected
FD	Yes	Yes	Yes	All
FFD	Yes	No	Yes	Selected
PBD	Yes	No	Yes	Selected

ที่มา: Prvan และ Street (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.1 การออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (PBD)

ในปี ค.ศ. 1946 R.L. Plackett และ J.P. Burman ได้นำเสนอวิธีการออกแบบที่ใช้สำหรับกรณีที่มีปัจจัยจำนวนมากที่จะใช้ในการศึกษา โดยตีพิมพ์วิธีการดังกล่าวในหนังสือชื่อ “The design of optimal multifactorial experiments” หลังจากนั้นวิธีการดังกล่าวนี้ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางใน การออกแบบการทดลองแบบ PBD โดยทั่วไปจะใช้ระหว่างช่วงต้นของการศึกษา (Mabrouk และคณะ, 2012) เพื่อคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ต่อกระบวนการ วิธีการออกแบบการทดลองแบบ PBD โดยประยุกต์ใช้วิธีแฟคทอเรียล 2 ระดับ โดยศึกษาปัจจัยละ 2 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) และระดับสูง (+1) นอกจากนี้จำนวนการทดลองจะมีค่ามากกว่าจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษาอย่างน้อยอยู่ 1 เสมอ หรือ k+1 (Plackett และ Burmn, 1946; Chauhan และคณะ, 2007) โดยกำหนดให้เป็นจำนวน 4 เท่าของเลขอนุกรม เช่น 8, 12, 16…, เป็นต้น และจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษาจะมีตัวแปรดัมมี่อย่างน้อย 2 เสมอ เพื่อสามารถคำนวณค่าความแปรปรวนจากผลการทดลองและค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสมการได้ ดังนั้นเมื่อมีจำนวนปัจจัยเท่ากับ 11 ปัจจัย จะมีจำนวนการทดลองเท่ากับ 12 การทดลอง อย่างไรก็ตามหากจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษามีเพียง 9 ปัจจัย ต้องกำหนดจำนวนการทดลองเท่ากับ 12 การทดลอง เช่นกัน ในแถวแรกของตาราง โดยแถวถัดไปเริ่มต้นด้วยรหัสตัวสุดท้ายของแถวก่อนหน้าและต่อด้วยรหัสในตำแหน่งแรกของแถวก่อนหน้า ทำเช่นนี้ไปจนครบทุกการทดลอง โดยกำหนดรหัสของการทดลองสุดท้ายให้ทุกปัจจัยที่ศึกษาอยู่ในระดับต่ำ ดังตารางที่ 2.11 สำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี PBD คำนวณความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value) โดยวิเคราะห์ด้วย t-test ซึ่ง t-test เป็นค่าสถิติที่ทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) นอกจากนี้การเลือกใช้ค่าสถิติ t ทดสอบเพื่อช่วยให้ผลการวิจัยมีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ ข้อมูลต้องลักษณะเชิงปริมาณและข้อมูลต้องมีการแจกแจงปกติ (สุธเนต, 2553)

หลังจากที่มีการคัดเลือกตัวแปรที่มีความสำคัญต่อกระบวนการ อาจจะทำการหาค่าที่ดีที่สุดของปัจจัยเหล่านั้นได้ด้วยการออกแบบวิธีการของพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) โดยเลือกการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.11 การออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design

ปัจจัย										
A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**
+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1
+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1
-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

ที่มา: ดัดแปลงจาก Prvan และคณะ (2002)

2.9.2 Response Surface Methodology (RSM)

วิธีการและการออกแบบพื้นผิวตอบสนองหรือที่เรียกว่า Response Surface Methodology; RSM (Maneeboon และคณะ, 2010; Saxena และ Singh, 2010) เป็นการรวบรวมเทคนิคทางด้านคณิตศาสตร์และสถิติ ซึ่งจะเอื้อต่อการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ และทำการวิเคราะห์ปัญหาโดยที่ผลตอบสนองนั้นจะขึ้นอยู่กับหลายตัวแปรที่ทำการศึกษา และมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาค่าที่ดีที่สุด (maximum) หรือการตอบสนองต่ำสุด (minimum) ของผลตอบสนอง (response) วิธี RSM คิดค้นโดย Box ในปี ค.ศ. 1948 โดยอาศัยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี full factorial ที่อาศัยค่ากลางของข้อมูลจากระดับปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าตอบสนองสูงที่สุด โดยนิยมออกแบบการทดลองเป็น 2 วิธี คือ Central Composite Design, CCD และ Box-Behnken Design, BBD โดยใช้การกระจายของระดับของข้อมูลออกจากศูนย์กลาง เพื่อศึกษาระดับของปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าตอบสนองสูงที่สุด โดยการออกแบบการทดลองแบบ BBD จะเน้นที่จุดรอบๆค่ากลาง โดยไม่รวมค่าการกระจายในระดับแกน (axial point) และค่าที่มุม (factorial point) ทำให้ค่าคงที่ได้ แต่ไม่ครอบคลุมปลายสุดของระดับปัจจัย ดังนั้นการออกแบบการทดลองแบบ CCD จึงได้รับความนิยมมากกว่า (Draper, 2006) เนื่องจากสามารถสร้างสมการของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวแปรตอบสนองโดยใช้วิธีการวิเคราะห์การถดถอย (regression) เพื่อหาค่าความเหมาะสมของระดับในแต่ละปัจจัยที่สนใจศึกษาเมื่อพิจารณาสมการที่ 2.3 (ไพโรจน์, 2555)

$$Y = f(X_1, X_2, \ldots, X_n) + \varepsilon \quad (2.3)$$

โดยกำหนดให้

Y = ค่อตอบสนองที่สังเกตได้ (dependent varible)

f = ฟังก์ชั่นของการตอบสนองของ $X_1, X_2, \ldots, X_n$ ซึ่งเป็นตัวแปรเชิงปริมาณ (independent varible)

ε = เทอมของความคลาดเคลื่อน

ถ้ากำหนดว่า $E(Y) = f(X_1, X_2) = \eta$ ดังนั้น สามารถเขียนสมการของพื้นผิวตอบสนองได้ตามสมการที่ 2.4 คือ

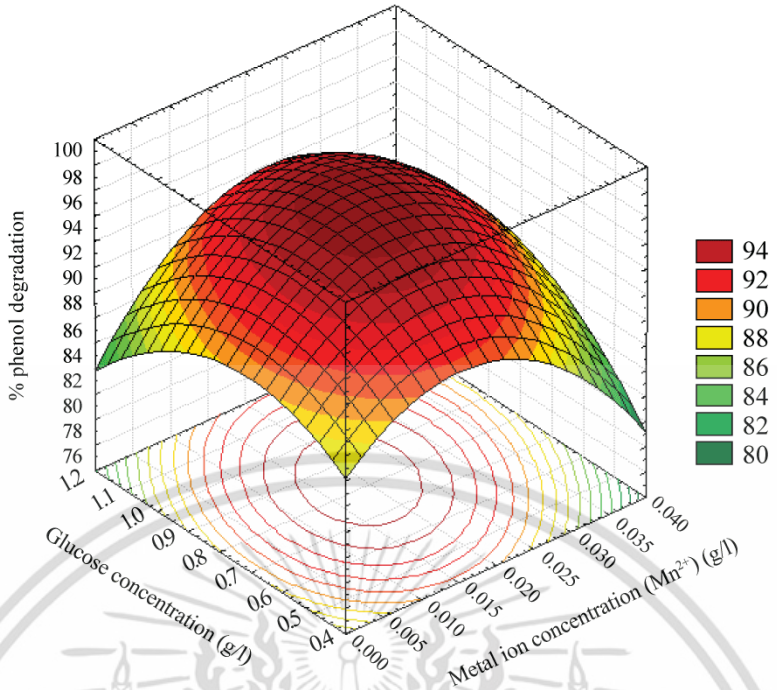
$$\eta = f(X_1, X_2) \quad (2.4)$$

ซึ่งจะเรียกว่าพื้นผิวตอบสนอง (response surface) โดยส่วนใหญ่จะแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวในรูปของกราฟฟิก โดยที่ η จะถูกพล็อตกับระดับของ X_1 และ X_2 เพื่อที่จะช่วยให้มองรูปร่างของพื้นผิวผลตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น ดังรูปที่ 2.8

อย่างไรก็ตามในการศึกษาโดยใช้วิธีการแสดงผลพื้นผิวตอบสนองนั้น จำเป็นต้องค้นหาฟังก์ชันที่แท้จริงระหว่างตัวแปรตามค่าตอบสนองต่อตัวแปรอิสระต่างๆ เป็นลำดับแรก การค้นหาฟังก์ชันต่างๆ เหล่านี้มักใช้ความสัมพันธ์แบบโพลีโนเมียล (polynomial) ลำดับต้นๆ เช่น ลำดับหนึ่งหรือกำลังหนึ่ง (first order) ลำดับสองหรือกำลังสอง (second order) เป็นต้น โดยทั่วไปฟังก์ชันซึ่งประมาณความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (Linear regression relationship) ดังสมการที่ 2.5

$$Y = \beta 0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \ldots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (2.5)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 กราฟสามมิติของพื้นผิวตอบสนอง

ที่มา: http://www.omicsonline.org/2155-6199/images/2155-6199-2-121-g007.gif

(วันที่สืบค้น 15 ธันวาคม 2556)

ซึ่งสมการดังกล่าวเป็นสมการพื้นฐานง่ายสุด ที่มักรู้จักกันว่าเป็นรูปแบบสมการลำดับที่หนึ่ง (first-order model or equation) ส่วนรูปแบบลำดับที่สอง (second-order model) เป็นความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) ดังสมการที่ 2.6 ซึ่งต้องใช้โพลีโนเมียลที่มีลำดับสูงขึ้น เช่น ลำดับสองหรือกำลังสอง (Saxena และ Singh, 2010; อิศรพงษ์, 2550)

$$Y = \beta 0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i}^{k} \sum_{\substack{j \\ i<j}}^{k} \beta_{ji} X_i X_j + \varepsilon \qquad (2.6)$$

กำหนดให้

$\beta 0$ = จุดตัด (intercept) หรือ Grand mean

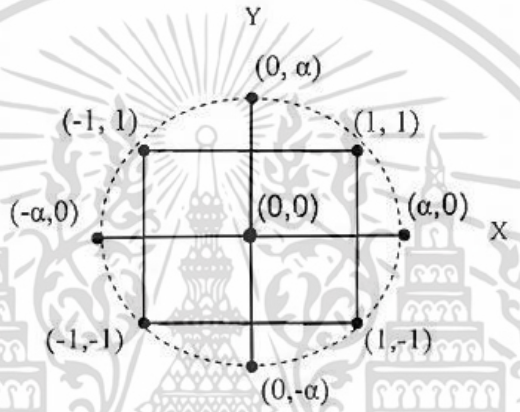
β_i = เป็นผลเชิงเส้นตรง (linear effect) ของ X_i

β_{ii} = เป็นผลเชิงโค้งลำดับที่หนึ่ง (quadratic effect) ของ X_i

β_{ji} = เป็นผลของปฏิกิริยาสัมพันธ์ (interaction effect) ของ X_i และ X_j

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การออกแบบพื้นผิวผลการตอบสนองสำหรับการทดลองนี้ได้เลือกใช้การออกแบบการทดลอง แบบ CCD ซึ่งมีพื้นฐานมาจาก 2^n แฟกตอเรียล (factorial 2^k) อย่างไรก็ตาม CCD จึงเพิ่มระดับการทดลองแฟกเทอเรียลที่จุดศูนย์กลาง (center) และแนวแกน (axial) โดยแบ่งเป็น 5 ระดับ (Coelho และคณะ, 2011) คือ ระดับต่ำสุด ($-\alpha$) ต่ำ (-1) กลาง (0) สูง (+1) และระดับสูงสุด ($+\alpha$) ดังรูปที่ 2.9 เพื่อสามารถสร้างรูปแบบความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์อันดับสองได้ และในการวางแผนการทดลอง CCD มีจำนวนการทดลองเท่ากับ $2^n+(2n+6)$ สำหรับการทดลองที่มีปัจจัยหรือตัวแปรต้น 4 ตัวแปร ดังตารางที่ 2.12 มีจำนวนการทดลองทั้งสิ้น 30 การทดลอง เปรียบเทียบกับ 3^n factorial designs มีจำนวนการทดลองทั้งหมด 81 การทดลอง



รูปที่ 2.9 จุดของการออกแบบ 9 การทดลองสำหรับ 2 ปัจจัย

ที่มา: เสาวนีย์ (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.12 การออกแบบการทดลองแบบ CCD ของตัวแปรเชิงปริมาณ

การทดลอง	ตัวแปรเชิงปริมาณ (Independent variable)			
(Run)	A	B	C	D
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	$-\alpha$	0	0	0
18	$+\alpha$	0	0	0
19	0	$-\alpha$	0	0
20	0	$+\alpha$	0	0
21	0	0	$-\alpha$	0
22	0	0	$+\alpha$	0
23	0	0	0	$-\alpha$
24	0	0	0	$+\alpha$
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

ที่มา: ดัดแปลงจาก Song และคณะ (2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Whatman, England)
2. กระดาษกรอง membrane filters ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Sartorius Stadium Biotech GmbH, Germany)
3. กระบอกตวง (Pyrex, Germany)
4. ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) (Pyrex, Germany)
5. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) (Pyrex, Germany)
6. ขวดแก้วใส่อาหาร (duran) (Duran Group GmbH, Germany)
7. เข็มฉีดสำหรับเครื่อง HPLC (chromatography syringes) (Hamilton, USAX
8. คอลัมภ์ชนิด inertsil C8-3 สำหรับ HPLC (SHIMADZU, Japan)
9. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) (Pyrex, Germany)
10. บีกเกอร์ (Pyrex, Germany)
11. ปิเปตแก้ว (Pyrex, Germany)
12. ไมโครปิเปต (micropipette) (B&M Scientific CC, South America)
13. หลอดทดลอง (test tube) (Pyrex, Germany)
14. คิวเวตแก้ว (Starna, Australia)
15. สายยาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.89 เซนติเมตร รุ่น Tygon tubing 2 stop (Cole-Parmer Instrument, USA)
16. หลอดย่อย (Pyrex, Germany)
17. บิวเรต (Pyrex, Germany)

3.2 เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ รุ่น CH30RF200 (Olympus, Japan)
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น DR/4000 (HACH, USA)
3. เครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) รุ่น LC solution (SHIMADZU, Japan)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ตู้ปลอดเชื้อ (microflow advanced bio safety carbinet) รุ่น ABS1200 (science tech, Englang)
5. ตู้เย็น รุ่น SR-595 (Sanyo, Japan)
6. ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ รุ่น MDF-U 4086S (Sanyo, Japan)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น FALCON 6/300 (Henderson biomedical, Englang)
8. หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ รุ่น HA-MIV (Hirayama, Japan)
9. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น ARC120 (Ohous, USA)
10. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AR 2140 (Ohous, USA)
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง รุ่น UB-10 (Denver Instrument, USA)
12. เครื่องเขย่า รุ่น IS-971R (Oskon, USA)
13. ตู้อบอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส รุ่น Contherm designer series oven (Contherm Scientisic Limited, Newzealand)
14. ตู้อบความร้อน 105 องศาเซลเซียส รุ่น WTC Linder (Binder GmbH, Germany)
15. ตู้อบความร้อน 70 องศาเซลเซียส รุ่น Contherm thermotec 2000 oven (Contherm Scientisic Limited, Newzealand)
16. ตู้บ่ม รุ่น Memmert (Labexchange, Germany)
17. ถังหมัก ขนาด 5 ลิตร รุ่น Biostat B (B. Braun Biotech International GmbH, Germany)
18. เครื่อง Peristaltic pump รุ่น PD 5201 (Heidolph Instruments GmbH, Germany)
19. เครื่องย่อย รุ่น KB8S (C. Gerhardt, Englang)
20. เครื่องกลั่น รุ่น Vapodest30 (C. Gerhardt, Englang)

3.3 สารเคมี

1. แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) (Ajax, Australia)
2. แคลเซียมคลอไรด์ (NaCl) (Ajax, Australia)
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Ajax, Australia)
4. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) (Ajax, Australia)
5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Merck, German)
6. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Ajax, Australia)
7. แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) (Ajax, Australia)
8. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) (Ajax, Australia)
9. ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. กลูโคส (glucose) (Ajax, Australia)
11. เปปโตน (peptone) (Himedia, India)
12. สารสกัดยีสต์ (yeast extract) (Himedia, India)
13. ยีสต์ออโตไลเสทนาโนโปรพลัส (yeast autolysate nanoproplus) (Specialty Biotech, Thailand)
14. สารสกัดยีสต์ CW-V (Thai food international, Thailand)
15. สารสกัดยีสต์ 21 VP (Thai food international, Thailand)
16. สารสกัดยีสต์ HIMAX IG20 (Thai food international, Thailand)
17. มอลส์สกัด (malt extract) (Himedia, India)
18. ทริปติกซอยบรอท (trytic soy broth; TSB) (Merck, Germany)
19. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) (J.T. Baker, China)
20. กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) (Sigma-Aldrich, USA)
21. กรดแอซีติก (acetic acid) (Sigma-Aldrich, USA)
22. ฟีนอล (phenol) (Carlo Erba Reagents, Italy)
23. เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 (องค์การสุรา กรมสรรพสามิต, Thailand)
24. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
25. แคลเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CaCl_2.6H_2O$) (Ajax, Australia)
26. คอปเปอร์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$) (Ajax, Australia)
27. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรตและโพแทสเซียมซัลเฟต (C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Germany)
28. กรดบอริก (boric acid) (Merck, Germany)
29. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Carlo Erba Reagents, Italy)
30. เมทิลเรด (Fluka, Switzerland)
31. บรอมครีซอลกรีน (Ajax, Australia)

3.4 เชื้อจุลินทรีย์และการเก็บรักษา

เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกสายพันธุ์ *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

นำเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 มาขีดลากลงบนอาหารแข็งสูตร de Man Rogosa Sharpe, MRS (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลอง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อ (sub culture) ทุกๆ 1 เดือน (ดัดแปลงจาก Balamurugan และคณะ, 1999)

3.5 วัตถุดิบ

3.5.1 ใบกรุงเขมา ได้รับความอนุเคราะห์จาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสานวิทยาเขตสกลนคร 199 หมู่ 3 ถนนพังโคน-วาริชภูมิ อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร 47160

3.5.2 ยีสต์ออโตไลเสท (Nanoproplus™) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท สเปเชียลตี้ไบโอ-เทค เลขที่ 205 ซอยอ่อนนุช 70/1 แขวงประเวศ เขตประเวศ กรุงเทพมหานคร 10250

3.5.3 สารสกัดยีสต์ HIMAX IG20, สารสกัดยีสต์ CW-V และสารสกัดยีสต์ 21 VP ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Thai food international หมู่ที่ 5 ถนนสุชาติพัฒนา ตำบลบางไทรป่า อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม 73130

3.6 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการหมักกรดโพรพิโอนิกดัดแปลงจากวิธีการของ Choojun และ Yoonprayong, 2012 ถ่ายเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 อายุ 48 ชั่วโมง ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่สภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 จากนั้นดูดเซลล์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ปริมาตรร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารที่จะทำการหมัก นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ได้หัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง

3.7 การสกัดเพกทินจากใบกรุงเขมา (ดัดแปลงจากพิเชษฐ, 2546 และ อรทัย, 2553)

3.7.1 การเตรียมตัวอย่างใบกรุงเขมา

นำใบกรุงเขมามาล้างน้ำให้สะอาด นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (blender) ชั่งใบกรุงเขมาบดละเอียดหนัก 10 กรัม เติมเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที กรองเอาเฉพาะส่วนตะกอน นำมาเติมเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 40 (ปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อปริมาตร) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาเฉพาะส่วนตะกอนแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสให้แห้งสนิท

3.7.2 การสกัดเพกทินจากใบกรุงเขมา

ชั่งใบกรุงเขมาที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 3.7.1 หนัก 5 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร นำไปสกัดเพกทินแบบร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองแยกเอาตะกอนของใบกรุงเขมาออกขณะร้อน นำสารละลายที่ได้จากการกรอง มาระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum evaporator) ให้เหลือปริมาตร 1 ใน 3 ส่วนของสารละลายทั้งหมด จากนั้นนำมาตกตะกอนเพกทินโดยเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนของสารละลายเพกทินต่อสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 1 ต่อ 2 โดยปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองแยกส่วนเอาตะกอนเพกทิน ทำการล้างตะกอนเพกทินด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 4-5 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดให้เป็นผง นำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปคำนวณหาร้อยละของปริมาณเพกทินหยาบ (crude pectin) ที่สกัดได้

3.8 การตรึงเซลล์ด้วยเพกทินจากใบกรุงเขมา

นำเพกทินหยาบที่สกัดจากใบกรุงเขมา มาผสมกับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะทำการหมัก จากนั้นหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก Smogrovicova และ Domeny, 1999; Navratil และคณะ, 2001) ผ่านปั๊ม (peristaltic pump) โดยใช้สภาวะในการเตรียมเม็ดเจลจากวิธีการของ อรทัย (2553) คือ ใช้สายยางซิลิโคนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 0.89 มิลลิเมตร ปรับอัตราการไหลของสารละลายเจลให้เท่ากับ 7 มิลลิเมตรต่อนาที นำเม็ดเจลที่ได้บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 ครั้ง จะได้เซลล์ตรึงสำหรับผลิตกรดโพรพิโอนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422

3.9.1 การคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยการออกแบบการแบบ Plackett-Burman Design (PBD)

การคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ด้วยการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล ที่มีแผนการทดลองแบบ PBD โดยใช้โปรแกรม Design-Expert (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) เพื่อคัดเลือกปัจจัยหลัก (main effect) ที่ส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ต้องการศึกษา 6 ปัจจัย ได้แก่ *X1*-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล (total sugar concentration in molassess), *X2*-ยีสต์ออโตไลเสท (yeast autolysate), *X3*-สารสกัดยีสต์ (yeast extract), *X4*-ทริปติกซอยบรอท (Tryptic soy broth; TSB), *X5*-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) และ *X6*-โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แต่ละปัจจัยจะถูกออกแบบเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (low, -) ระดับกลาง (mid, 0) และระดับสูง (high, +) แสดงดังตารางที่ 3.1 รวมทั้งหมด 15 การทดลอง (ตารางที่ 3.2)

ทำการทดลองโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่เตรียมได้จากภาคผนวก ก เป็นแหล่งคาร์บอน แปรผันองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังสูตรที่ออกแบบด้วยแผนการทดลองแบบ PBD (ตารางที่ 3.2) กำหนดค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดัดแปลงจาก Choojun และ Yoonprayong, 2012) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปบ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 และทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 360 ชั่วโมง โดยน้ำหมักที่ได้นำไปวิเคราะห์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติกที่เกิดขึ้น ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 3.14.2 หลังจากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยแผนการทดลองแบบ PBD ด้วยโปรแกรม Design-Expert (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) ในหัวข้อ 3.15 เพื่อนำไปพิจารณาคัดเลือกปัจจัยและทำการศึกษาหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยหลักโดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) ด้วยการออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design, CCD) ในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ระดับของปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล ด้วยแผนการทดลองแบบ PBD

ปัจจัย	หน่วย	ระดับสูง (+)	ระดับกลาง (0)	ระดับต่ำ (-)
X1	กรัมต่อลิตร	40.00	25.00	10.00
X2	กรัมต่อลิตร	10.00	5.00	0.00
X3	กรัมต่อลิตร	10.00	5.00	0.00
X4	กรัมต่อลิตร	5.00	4.00	3.00
X5	กรัมต่อลิตร	2.50	1.38	0.25
X6	กรัมต่อลิตร	5.00	3.00	1.00

หมายเหตุ: *X1* หมายถึง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล, *X2* หมายถึง ยีสต์ออโตไลเสท, *X3* หมายถึง สารสกัดยีสต์, *X4* หมายถึง ทริปติกซอยบรอท, *X5* หมายถึง ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต, *X6* หมายถึง โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองแบบ PBD ทั้งหมด 15 การทดลอง ประกอบด้วยรหัสและค่าความเข้มข้นของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองทั้ง 6 ปัจจัย ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

การทดลองที่	X_1 (กรัมต่อลิตร)	X_2 (กรัมต่อลิตร)	X_3 (กรัมต่อลิตร)	X_4 (กรัมต่อลิตร)	X_5 (กรัมต่อลิตร)	X_6 (กรัมต่อลิตร)	Y_1 กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	Y_2 กรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร)	Y_3 น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
1	+1 (40)	+1 (10)	-1 (0)	+1 (5)	+1 (2.5)	+1 (5)			
2	0 (25)	0 (5)	0 (5)	0 (4)	0 (1.38)	0 (3)			
3	+1 (40)	+1 (10)	+1 (10)	-1 (3)	-1 (0.25)	-1 (1)			
4	-1 (10)	+1 (10)	+1 (10)	-1 (3)	+1 (2.5)	+1 (5)			
5	+1 (40)	+1 (10)	-1 (0)	-1 (3)	-1 (0.25)	+1 (5)			
6	+1 (40)	-1 (0)	+1 (10)	+1 (5)	+1 (2.5)	-1 (1)			
7	-1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (3)	-1 (0.25)	-1 (1)			
8	-1 (10)	+1 (10)	+1 (10)	+1 (5)	-1 (0.25)	-1 (1)			
9	0 (25)	0 (5)	0 (5)	0 (4)	0 (1.38)	0 (3)			
10	-1 (10)	-1 (0)	+1 (10)	-1 (3)	+1 (2.5)	+1 (5)			
11	0 (25)	0 (5)	0 (5)	0 (4)	0 (1.38)	0 (3)			
12	+1 (40)	-1 (0)	+1 (10)	+1 (5)	-1 (0.25)	+1 (5)			
13	-1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (5)	-1 (0.25)	+1 (5)			
14	+1 (40)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (3)	+1 (2.5)	-1 (1)			
15	-1 (10)	+1 (10)	-1 (0)	+1 (5)	+1 (2.5)	-1 (1)			

หมายเหตุ: X_1 หมายถึง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล, X_2 หมายถึง ยีสต์อโตไลเสท, X_3 หมายถึง สารสกัดยีสต์, X_4 หมายถึง ทริปติกซอยบรอท, X_5 หมายถึง ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต, X_6 หมายถึง โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

3.9.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM)

วิธีพื้นผิวผลตอบสนอง (RSM) ด้วยการออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) ซึ่งมีพื้นฐานมาจาก 2^k แฟกทอเรียล (factorial 2^k) เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้ตัวแปรหลักที่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกซึ่งทำการคัดเลือกได้จากการทดลองในข้อ 3.9.1 ในการออกแบบการทดลองแบบ CCD จะมีการออกแบบในทุกความเข้มข้นของแต่ละปัจจัย และมีการทำซ้ำที่จุดกลางของการทดลอง ทำการกำหนดระดับของปัจจัยที่จะศึกษา ซึ่งประกอบด้วย จุดแฟกทอเรียล จุดขอบ และจุดกึ่งกลาง โดยแปรผันระดับของตัวแปรในแต่ละปัจจัยเป็น 5 ระดับ คือ ระดับสูงสุด ($+\alpha$) ระดับสูง (+) ระดับกลาง (0) ระดับต่ำ (-) และระดับต่ำสุด ($-\alpha$) ดังตารางที่ 3.3

ทำการทดลองโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่เตรียมได้จากภาคผนวก ก เป็นแหล่งคาร์บอน แปรผันองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังสูตรที่ออกแบบด้วยแผนการทดลองแบบ CCD (ตารางที่ 3.4) กำหนดค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดัดแปลงจาก Choojun และ Yoonprayong, 2012) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปบ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 และ ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 360 ชั่วโมง โดยน้ำหมักที่ได้นำไปวิเคราะห์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติกที่เกิดขึ้น ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 3.14.2 หลังจากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ มาวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) ด้วยโปรแกรม Design-Expert (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) ในหัวข้อ 3.15

จากแผนการทดลองแบบ CCD นี้จำนวนการทดลองทั้งหมดที่ออกแบบด้วยโปรแกรม ผลการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อสร้างสมการ Quadratic กำลังสอง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรต่างๆ ที่ทำการศึกษาต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก กรดแอซีติก และน้ำตาลทั้งหมด เพื่อสร้างเป็นกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface) ในรูปแบบสามมิติ (3D) และกราฟเส้นโครงร่างพื้นที่ผิวตอบสนอง (contour plots) โดยใช้ตัวแปรที่มีปฏิสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแต่ละกราฟจะแสดงผลของการทดลองและค่าคงที่ที่ระดับ 0 ดังนั้นส่วนนูนในกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองหรือจุดศูนย์กลางของวงกลมในกราฟเส้นโครงร่าง จึงเป็นค่าความเข้มข้นที่มีเหมาะสมที่สุดในแต่ละตัวแปร เมื่อแทนค่าลงในสมการจะได้ค่าที่เหมาะสมที่สุดของการผลิตกรดโพรพิโอนิก ซึ่งเป็นค่าจากการทำนาย (predicted value) ด้วยโปรแกรมในหัวข้อ 3.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการออกแบบด้วยโปรแกรม RSM

ปัจจัย	หน่วย	-α	ระดับต่ำ (-)	ระดับกลาง (0)	ระดับสูง (+)	+α
X1	กรัมต่อลิตร	6.36	20.00	40.00	60.00	73.64
X2	กรัมต่อลิตร	-3.41	0.00	5.00	10.00	13.41
X3	กรัมต่อลิตร	-3.41	0.00	5.00	10.00	13.41

หมายเหตุ: *X1* หมายถึง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล, *X2* หมายถึง ยีสต์ออโตไล-เสท, *X3* หมายถึง สารสกัดยีสต์

ตารางที่ 3.4 แผนการทดลองแบบ CCD ทั้งหมด 20 การทดลอง ประกอบด้วยรหัสและค่าความเข้มข้นของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองทั้ง 3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

การทดลองที่	*X1* (กรัมต่อลิตร)	*X2* (กรัมต่อลิตร)	*X3* (กรัมต่อลิตร)	*Y1* กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	*Y2* กรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร)	*Y3* น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
1	-1 (20)	-1 (0)	+1 (10)			
2	+1 (60)	+1 (10)	-1 (0)			
3	-1 (20)	-1 (0)	-1 (0)			
4	-1 (20)	+1 (10)	-1 (0)			
5	-1 (20)	+1 (10)	+1 (10)			
6	+1 (60)	+1(10)	+1 (10)			
7	+1 (60)	-1 (0)	-1 (0)			
8	+1 (60)	-1 (0)	+1 (10)			
9	0 (40)	-α (-3.41)	0 (5)			
10	0 (40)	+α (13.41)	0 (5)			
11	+α (73.64)	0 (5)	0 (5)			
12	0 (40)	0 (5)	+α (13.41)			
13	-α (6.36)	0 (5)	(5)			
14	0 (40)	0 (5)	-α (-3.41)			
15	0 (40)	0 (5)	0 (5)			
16	0 (40)	0 (5)	0 (5)			
17	0 (40)	0 (5)	0 (5)			
18	0 (40)	0 (5)	0 (5)			
19	0 (40)	0 (5)	0 (5)			
20	0 (40)	0 (5)	0 (5)			

หมายเหตุ: *X1* หมายถึง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล, *X2* หมายถึง ยีสต์ออโตไลเสท, *X3* หมายถึง สารสกัดยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10 การตรวจสอบยืนยันผล (Validation)

ทำการตรวจสอบยืนยันผลที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.9.2 ในระดับฟลาสก์อีกครั้ง โดยใช้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร ซึ่งได้จากการทำนาย (predicted value) ด้วยโปรแกรม Design-Expert (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) ในหัวข้อ 3.15 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรกำหนดค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดัดแปลงจาก Choojun และ Yoonprayong, 2012) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปบ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 และ ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 144 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติกที่เกิดขึ้นตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 3.14.2

3.11 ศึกษายี่ห้อของสารสกัดยีสต์ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

ศึกษายี่ห้อของสารสกัดยีสต์ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ในระดับฟลาสก์ โดยทำการเปลี่ยนสารสกัดยีสต์ยี่ห้อ Himedia (India) ซึ่งเป็นสารสกัดยีสต์ทางการค้าและมีราคาแพง เป็นสารสกัดยีสต์ที่ผลิตในประเทศไทยจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ สารสกัดยีสต์ CW-V (Thailand), สารสกัดยีสต์ 21 VP (Thailand) และสารสกัดยีสต์ HIMAX IG20 (Thailand) เพื่อเปรียบเทียบลดต้นทุนการผลิตกรดโพรพิโอนิก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ได้จากการทำนาย (predicted value) ด้วยโปรแกรม Design-Expert (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) กำหนดค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดัดแปลงจาก Choojun และ Yoonprayong, 2012) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปบ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 และที่เวลา 144 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติกที่เกิดขึ้น ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 3.14.2 หลังจากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อเปรียบเทียบผลในหัวข้อ 3.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระ โดยการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นจากข้อที่ 3.6 และศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาโดยเตรียมหัวเชื้อจากจากข้อที่ 3.8 จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบตามการศึกษาจากข้อที่ 3.11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดัดแปลงจาก Choojun และ Yoonprayong, 2012) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 และทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 360 ชั่วโมง โดยน้ำหมักที่ได้นำไปวิเคราะห์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติกที่เกิดขึ้น ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 3.14.2 หลังจากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อเปรียบเทียบผลในหัวข้อ 3.15

3.13 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระ โดยการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นจากข้อที่ 3.6 และศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาโดยเตรียมหัวเชื้อจากจากข้อที่ 3.8 จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบตามการศึกษาจากข้อที่ 3.11 ปริมาตร 3,500 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพาะเลี้ยงที่สภาวะดังนี้ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส (Choojun และ Yoonprayong, 2012) ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (Liu และคณะ, 2011; Wang และคณะ, 2013) ควบคุมอัตราการกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที (Feng และคณะ, 2011) และไม่มีการเติมอากาศในถังหมัก (Dishisha และคณะ, 2013) เก็บน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 และทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 360 ชั่วโมง โดยน้ำหมักที่ได้นำไปวิเคราะห์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติกที่เกิดขึ้น ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 3.14.2 หลังจากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อเปรียบเทียบผลในหัวข้อ 3.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.14 วิธีวิเคราะห์

3.14.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสท

3.14.1.1 ปริมาณโปรตีน และปริมาณไนโตรเจนตามวิธี Kjeldahl (Tangüler และ Erten, 2009; Munawar และคณะ, 2010) (ภาคผนวก ข)

3.14.1.2 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ด้วยเครื่อง Hight Performance Liquid Chromatography, HPLC (Adolfo และคณะ, 2000; Gheshlaghi และคณะ, 2008; Dimova และคณะ, 2010)

3.14.2 การวิเคราะห์น้ำหมัก

3.14.2.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.14.2.2 น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก ตามวิธีการของ Dubois, 1956 (ภาคผนวก ข)

3.14.2.3 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี Total plate count (ภาคผนวก ข)

3.14.2.4 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติกด้วยเครื่อง HPLC ทำการเตรียมตัวอย่างโดยนำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็วรอบ 10,000 × g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสกรองผ่านแผ่นกรองที่ทำจากเซลลูโลสเมมเบรน (cellulose acetate filter) ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมภ์ Inertsil C8-3 ใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV-Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติก สำหรับคำนวณหาปริมาณของกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติก ที่เกิดขึ้น ตามลำดับ

3.15 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ การศึกษาในหัวข้อ 3.9.1 และ 3.9.2 นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Design-Expert (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) ในการวางแผนการทดลองแบบ PBD และแบบส่วนประสมกลาง (RSM) การศึกษาในหัวข้อ 3.11, 3.12 และ 3.13 ใช้การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS และการศึกษาในหัวข้อ 3.12 และ 3.13 ใช้การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Pair sample *t*-test โดยใช้โปรแกรม SPSS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง และ วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422

4.1.1 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (PBD)

กระบวนการทางสถิติโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในการออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยสามารถคัดกรององค์ประกอบของสูตรอาหารจำนวนหลายตัวแปรที่ส่งผลต่อกระบวนการผลิตได้พร้อมกัน ในการศึกษานี้เลือกใช้กระบวนการทางสถิติคือ Plackett and Burman design (PBD) ซึ่งมีประโยชน์ในการคัดกรองปัจจัยหลัก (main effect) ต่างๆจำนวนหลายปัจจัยในเบื้องต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยวัตถุประสงค์หลัก คือ คัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และทำการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) โดยใช้การวางแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD) เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิก ในระดับฟลาสก์ และขยายขนาดการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา

ในขั้นตอนแรก จะใช้การออกแบบด้วยโปรแกรม PBD สำหรับการศึกษาเพื่อคัดเลือก (Screening) ปัจจัยที่มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับห้องปฏิบัติการ (flask scale) กล่าวคือจากแผนการทดลองนี้จะทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงผลกระทบหลักของปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น แต่จะไม่สามารถศึกษาถึงความสัมพันธ์ร่วมกันของแต่ละปัจจัยต่างๆ ที่มีในการทดลองได้ โดย PBD จะถูกออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล บนพื้นฐานของสมการที่ 4.1 คือ

$$Y = \beta o + \Sigma \beta i Xi \qquad (4.1)$$

โดย Y คือ ผลการทดลองที่ติดตาม (response), βo คือ ค่าการยอมรับของโมเดล, βi คือ ค่าประมาณของตัวแปรอิสระ และ Xi คือ ตัวแปรอิสระ

ปัจจัยหลักในองค์ประกอบของสูตรอาหารทั้งหมด 6 ปัจจัย ที่มีรายงานว่าส่งเสริมการผลิตกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยเชื้อแบคทีเรียถูกนำมาศึกษา ได้แก่ $X1$-ความเข้มข้นของน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมดในกากน้ำตาล (total sugar concentration in molassess), *X2*-ยีสต์ออโตไลเสท (yeast autolysate), *X3*-สารสกัดยีสต์ (yeast extract), *X4*-ทริปติกซอยบรอท (tryptic soy broth; TSB), *X5*-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4), และ *X6*-โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ซึ่งระดับของตัวแปรคัดเลือกจากรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ แต่ละปัจจัยจะถูกแปรระดับความเข้มข้นเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (low, -) ระดับกลาง (mid, 0) และระดับสูง (high, +) สามารถวางแผนการทดลองได้ 15 การทดลอง จากนั้นทำการหมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 360 ชั่วโมง วิเคราะห์หาค่าปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งถูกกำหนดให้เป็นค่าที่ทำการติดตาม หลังจากนั้นค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ค่าผลกระทบของตัวแปร (effect value) และค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) จะถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ โดยปัจจัยที่พบว่ามีผลกระทบและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ หมายถึง การมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก และแต่ละปัจจัยไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน ค่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกที่ได้จากการทำนายของโปรแกรม PBD สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4.2 คือ

กรดโพรพิโอนิก = 8.93 + 3.04 * ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล + 1.4 * ยีสต์ออโตไลเสท + 1.61 * สารสกัดยีสต์ - 0.77 * ทริปติกซอยบรอท - 0.097 * ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต - 0.24 * โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (4.2)

และค่าจริงที่ได้จากการทดลองสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4.3 คือ

กรดโพรพิโอนิก = 4.39564 + 0.20283 * ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล + 0.28176 * ยีสต์ออโตไลเสท + 0.32149 * สารสกัดยีสต์ - 0.76779 * ทริปติกซอยบรอท - 0.086184 * ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต - 0.12162 * โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (4.3)

ความแปรปรวนทางสถิติให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) โดยทั่วไปควรมีค่าอย่างน้อยร้อยละ 80 (Montgomery 1991; Han และคณะ, 2009) จากการทดลองนี้ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ มีค่าร้อยละ 86.39 ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ สามารถอธิบายได้ว่า ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้เป็นผลมาจากตัวแปรที่เลือกใช้ในการศึกษาร้อยละ 86.39 ส่วนที่เหลือร้อยละ 13.61 เป็นผลจากปัจจัยอื่นที่ไม่สามารถระบุได้ ซึ่งนอกจากนั้นเมื่อพิจารณาค่าค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจแบบจำลอง (Adj-R^2) มีค่าเท่ากับ 74.72 เป็นการยืนยันว่าการออกแบบการทดลองนี้สามารถทำนายการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้อย่างมีนัยสำคัญ ความแม่นยำของการออกแบบ (Adequate precision) พิจารณาจากสัดส่วนของสิ่งรบกวนการออกแบบ โดยต้องมีค่ามากกว่า 4 ขึ้นไป จึงจะถือว่าการออกแบบนี้มีความแม่นยำ ในการออกแบบครั้งนี้พบว่ามีค่าเท่ากับ 9.789 ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการออกแบบนี้สามารถนำไปใช้ในการทดลองได้ดังแสดงในตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการวางแผนการทดลองแบบ PBD ของการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ที่เวลา 144 ชั่วโมง

Source	SS	df	Coefficient Estimate	Standardized effect	Mean square	F-value	*P*-value (Prob>F)	Confidence level
Model	173.80	6	8.93		28.97	7.41	0.0092*	
X1	111.08	1	3.04	6.09	111.08	28.40	0.0011*	99.89
X2	23.82	1	1.41	2.82	23.82	6.09	0.0430*	95.70
X3	31.01	1	1.61	3.21	31.01	7.93	0.0259*	97.41
X4	7.07	1	-0.77	-1.54	7.07	1.81	0.2206	77.94
X5	0.11	1	-0.097	-0.19	0.11	0.029	0.8700	13.00
X6	0.71	1	-0.24	-0.49	0.71	0.18	0.6829	31.71
Curvature	2.23	1			2.23	0.57	0.4752	
Residual	27.38	7			3.91			
Lack of Fit	27.38	5			5.48			
Pure Error	0.000	2			0.000			
Cor. Total	203.41	14						

R^2 = 86.39 %, Adj-R^2 = 74.72 %, Adequate precision = 9.789

หมายเหตุ: * หมายถึง ปัจจัยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ ($P \leq 0.05$); *X1*-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล; *X2*-ยีสต์ออโตไลเสต; *X3*-สารสกัดยีสต์; *X4*-ทริปติกซอย-บรอท; *X5*-โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต; *X6*-โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, SS หมายถึง Sum of squares, df หมายถึง degree of freedom

เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของปัจจัยโดยการหาผลต่างระหว่างผลรวมของผลที่เกิดจากการใช้ปัจจัยในระดับสูง และผลรวมของผลที่เกิดจากการใช้ปัจจัยในระดับต่ำ ด้วยการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม Design-Expert (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) โดยใช้ Student's *t*-test สำหรับ ANOVA (ตารางที่ 4.1) พบว่า ค่า F ของรูปแบบมีค่าเท่ากับ 7.41 ซึ่งหมายถึง การออกแบบการทดลองนี้สามารถทำนายการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้อย่างมีนัยสำคัญ (ค่า *P* เท่ากับ 0.0092) ทั้งนี้ ค่า *P* ที่น้อยกว่า 0.05 หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และค่า *P* ที่มากกว่า 0.05 จะถือว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$)

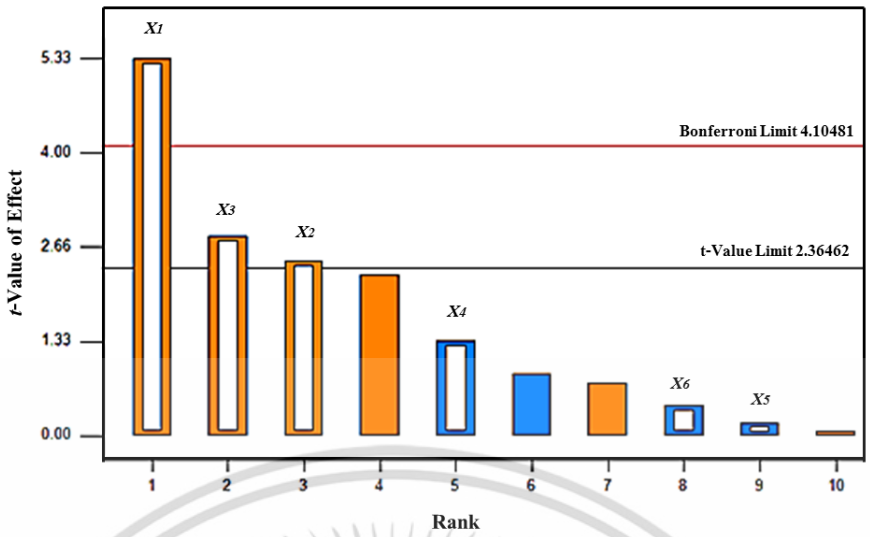
สำหรับค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตในแต่ละสูตรอาหารถูกนำมาพิจารณา จากการวิเคราะห์ 6 องค์ประกอบที่ทำการศึกษา พบว่ามี 3 ปัจจัย ที่มีค่า main effect จากทั้งหมด 6 ปัจจัย ส่งผลกระทบทางบวกต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) หมายความว่าปัจจัยเหล่านั้นมีแนวโน้มสามารถเพิ่มความเข้มข้นขึ้นได้อีก เพื่อให้เชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

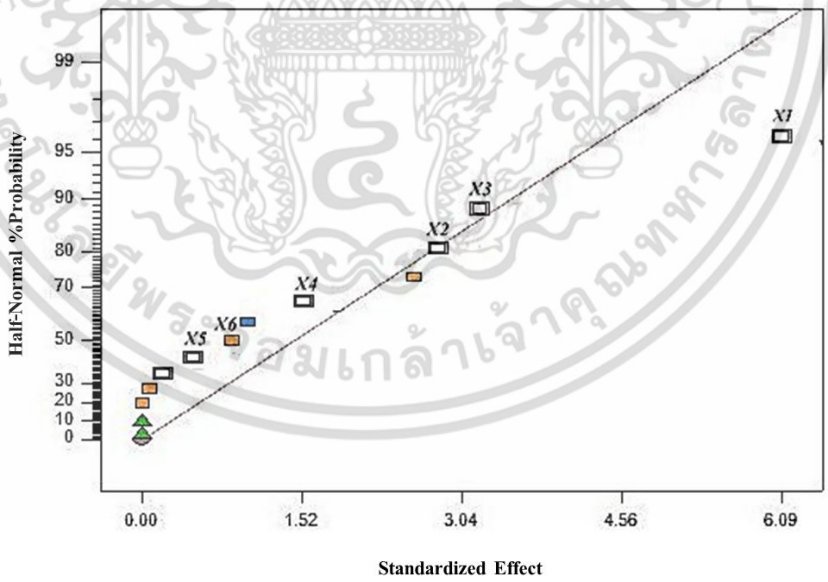
สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงขึ้น ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือ X_1-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล (ค่า P เท่ากับ 0.0011) โดยจะสังเกตได้ว่ามีค่าระดับความเชื่อมั่นที่สูงถึงร้อยละ 99.89 สำหรับปัจจัยที่ 2 และ 3 คือ X_2-ยีสต์ออโตไลเสท และ X_3-สารสกัดยีสต์ ค่า P เท่ากับ 0.0430 และ 0.0259 ตามลำดับ และมีค่าระดับความเชื่อมั่นที่สูงถึงร้อยละ 95.70 และ 97.41 ตามลำดับ โดยทั่วไปควรมีค่าระดับความเชื่อมั่นที่ประมาณร้อยละ 80 เพื่อหลีกเลี่ยงอิทธิพลของปฏิกิริยาสัมพันธ์ของปัจจัยดังกล่าวซึ่งกันและกันด้วย ซึ่งสอดคล้องกับแผนภูมิ Pareto (รูปที่ 4.1) และการวิเคราะห์ผลกระทบโดยใช้เครื่องมือ Half-normal plot (รูปที่ 4.2) โดยทั้งแผนภูมิ Pareto และ Half-normal plot แสดงให้เห็นถึงปัจจัยหลักที่มีผลกระทบเชิงบวกมากที่สุดต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกจนถึงปัจจัยที่มีผลน้อยที่สุดหรือไม่ส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก จากผลการทดลอง พบว่า X_1-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล จะมีผลกระทบมากที่สุด รองลงมาจะเป็น X_3-สารสกัดยีสต์ และ X_2-ยีสต์ออโตไลเสท ตามลำดับ ในขณะที่ X_4-ทริปติกซอยบรอท, X_6-โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และ X_5-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จะมีผลกระทบน้อยลงตามลำดับ ซึ่งสามารถเรียงลำดับได้ดังนี้ X_1-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล $> X_3$-สารสกัดยีสต์ $> X_2$-ยีสต์ออโตไลเสท $> X_4$-ทริปติกซอยบรอท $> X_6$-โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต $> X_5$-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เมื่อพิจารณาถึงผลกระทบ พบว่า X_1-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล, X_3-สารสกัดยีสต์, X_2-ยีสต์ออโตไลเสท, X_4-ทริปติกซอยบรอท, X_6-โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และ X_5-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จะมีค่าร้อยละการมีส่วนร่วม (% contribution) ในสูตรอาหารเท่ากับ ร้อยละ 54.16 > 15.24 > 11.71 > 3.48 > 0.35 > 0.05 ตามลำดับ โดยปกติค่านี้จะอยู่ที่ค่ามากกว่าร้อยละ 10

จากผลการทดลอง ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกนั้นมีความแปรผันในช่วง 0.79±0.53 ถึง 17.68±0.89 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องมาจากองค์ประกอบหลักที่ถูกแปรผันความเข้มข้นของแต่ละสูตรอาหารจากอาหารทั้งหมด 15 สูตรที่ทำการทดลอง พบว่าอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งทำการหมักที่เวลา 144 ชั่วโมง โดยมีองค์ประกอบ คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ยีสต์ออโตไลเสท 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ทริปติก-ซอยบรอท 3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด คือ 17.68±0.89 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกคิดเป็น 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณกรดแอซีติก 7.66±0.45 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนปริมาณกรดโพรพิโอนิกต่อปริมาณกรดแอซีติก (P/A) เท่ากับ 2.31 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ เท่ากับ 14.19±0.01 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 65.47 และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.85 ในขณะที่สูตรอาหารที่ 7 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ต่ำสุด คือ ได้เพียง 0.79±0.53 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกคิดเป็น 0.005 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และไม่มีการผลิตกรดแอซีติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง คือ 4.98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แผนภูมิ Perato ของการออกแบบการทดลองแบบ PBD (■ คือ ผลกระทบที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางบวก, ■ คือ ผลกระทบที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางลบ); *X1*-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล, *X2*-ยีสต์ออโตไลเสท, *X3*-สารสกัดยีสต์, *X4*-ทริปติกซอยบรอท, *X5*-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, *X6*-โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต



รูปที่ 4.2 Half-normal Plot ของการออกแบบการทดลองแบบ PBD ที่มีผลกระทบต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก; *X1*-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล, *X2*-ยีสต์ออโตไลเสท, *X3*-สารสกัดยีสต์, *X4*-ทริปติกซอยบรอท, *X5*-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, *X6*-โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือโดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 จากการออกแบบการทดลองแบบ PBD จำนวน 15 การทดลอง มีปัจจัยศึกษา 6 ปัจจัย ทำการหมักเป็นเวลา 144 ชั่วโมง

การทดลองที่	*X1*	*X2*	*X3*	*X4*	*X5*	*X6*	กรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	
									ค่าที่ได้จากการทดลอง	ค่าที่ได้จากการทำนาย
1	+1(40)	+1 (10)	-1 (0)	+1 (5)	+1 (2.5)	+1 (5)	2.05^{f}±0.31	17.64^{c}±0.01	12.17^{bc} ±1.72	10.66
2	0 (25)	0 (5)	0 (5)	0 (4)	0 (1.38)	0 (3)	5.67^{bc} ±0.33	6.81^{g}±0.01	7.96^{bcd} ± 0.00	7.96
3	**+1 (40)**	**+1 (10)**	**+1 (10)**	**-1 (3)**	**-1 (0.25)**	**-1 (1)**	**7.66^{a}±0.45**	**14.19^{d}±0.01**	**17.68^{a} ± 0.89**	**16.09**
4	-1 (10)	+1 (10)	+1 (10)	-1 (3)	+1 (2.5)	+1 (5)	5.00^{cd}±0.41	2.99^{k}±0.01	7.90^{bcd} ± 1.91	9.33
5	+1 (40)	+1 (10)	-1 (0)	-1 (3)	-1 (0.25)	+1 (5)	1.90^{f}±0.78	20.23^{b}±0.01	10.56^{bcd} ± 0.88	12.39
6	+1 (40)	-1 (0)	+1 (10)	+1 (5)	+1 (2.5)	-1 (1)	7.12^{a}±0.02	13.04^{e}±0.01	12.56^{b} ± 1.30	11.55
7	-1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (3)	-1 (0.25)	-1 (1)	0.00^{h}±0.00	7.97^{f}±0.01	0.79^{e} ± 0.53	3.98
8	-1 (10)	+1 (10)	+1 (10)	+1 (5)	-1 (0.25)	-1 (1)	3.49^{e}±0.32	3.09^{j}±0.01	6.58^{cde} ± 0.30	8.47
9	0 (25)	0 (5)	0 (5)	0 (4)	0 (1.38)	0 (3)	5.67^{bc}±0.33	6.81^{g}±0.01	7.96^{bcd} ± 0.00	7.96
10	-1 (10)	-1 (0)	+1 (10)	-1 (3)	+1 (2.5)	+1 (5)	4.83^{d}±0.43	2.95^{l}±0.01	7.95^{bcd} ± 0.00	6.51
11	0 (25)	0 (5)	0 (5)	0 (4)	0 (1.38)	0 (3)	5.67^{bc}±0.33	6.81^{g}±0.01	7.96^{bcd} ± 0.00	7.96
12	+1 (40)	-1 (0)	+1 (10)	+1 (5)	-1 (0.25)	+1 (5)	6.29^{b}±1.13	13.04^{e}±0.01	12.07^{bc} ± 0.65	11.26
13	-1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (5)	-1 (0.25)	+1 (5)	0.00^{h}±0.00	4.31^{h}±0.01	1.47^{e} ± 0.02	1.96
14	+1 (40)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (3)	+1 (2.5)	-1 (1)	1.40^{f}±0.19	33.36^{a}±0.01	6.79^{cde} ± 0.46	9.87
15	-1 (10)	+1 (10)	-1 (0)	+1 (5)	+1 (2.5)	-1 (1)	1.03^{g}±0.27	2.68^{m}±0.01	5.63^{de} ± 0.01	5.07

หมายเหตุ: *X1*-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล (g/l); *X2*-ยีสต์ออโตไลเสท (g/l); *X3*-สารสกัดยีสต์ (g/l); *X4*-ทริปติกซอยบรอท (g/l); *X5*-K_2HPO_4 (g/l) และ *X6*-KH_2PO_4(g/l); รหัส -1, 0 และ +1 หมายถึง ระดับต่ำ ระดับกลาง และระดับสูง; ± หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตนั้น พบว่าการทดลองชุดที่เติมความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลสูง (40 กรัมต่อลิตร) จะให้ผลผลิตกรดที่สูง ในขณะที่การทดลองที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลที่ต่ำ จะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่ต่ำลงด้วยเช่นกัน โดยกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ที่มีคุณค่ามากที่สุด เป็นส่วนของของเหลวที่เหลือหลังจากการแยกเอาผลึกของน้ำตาลออกแล้วมีลักษณะเหนียวข้น มีสีน้ำตาลเข้ม ในปัจจุบันได้มีการนำกากน้ำตาลมาประยุกต์ใช้เป็นสารอาหารให้กับจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักทำให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าสูงได้ (Calddwell D., Westway Trading Corporation, Cedar Lake, IN) โดยกากน้ำตาลที่ใช้เป็นวัตถุดิบมีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก เนื่องจากกากน้ำตาลประกอบไปด้วย น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรักโทส เป็นองค์ประกอบเป็นส่วนใหญ่ (United States Sugar Corporation Molasses and Liquid Feeds Division P.O. Drawer 1207 Clewiston, Florida 33440, 2003) ซึ่งถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกและมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ และกากน้ำตาลถูกใช้ในการหมักกรดโพรพิโอนิก ซึ่งมีรายงานว่ากากน้ำตาลจะให้ผลได้ของมวลชีวภาพสูงที่สุด (Rossi และคณะ, 2003) ดังมีรายงานการวิจัยของ Coral และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้กากน้ำตาล กลีเซอรอล หรือแลกเตต เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 30 และ 36 องศาเซลเซียส เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตชีวมวลได้มากที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 7.55 กรัมต่อลิตร ในกรณีเดียวกันที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส สามารถผลิตชีวมวล เท่ากับ 3.71 กรัมต่อลิตร รายงานการวิจัยของ Feng และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกที่ประหยัดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมจากเชื้อ *P. freudenreichii* CCTCCM 207015 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด plant fibrous bed bioreactor (PFB) โดยใช้กากน้ำตาลที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เท่ากับ 91.89±4.59 กรัมต่อลิตร มีอัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติก (P/A) เท่ากับ 5 และในขณะเดียวกันได้ทำการศึกษาโดยใช้กากน้ำตาลที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้เซลล์แบคทีเรียโพรพิโอนิกเหลือทิ้งเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน จะให้กรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 79.81±3.99 กรัมต่อลิตร งานวิจัยดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Van (1928) ได้ทำการศึกษาข้อแตกต่างของแบคทีเรียโพรพิโอนิกแต่ละสายพันธุ์ (Propionibacterium) พบว่าการเปลี่ยนกลูโคส แลกเตต หรือไพรูเวทไปเป็นกรดโพรพิโอนิกนั้นจะมีอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติกอยู่ระหว่าง 1.6-1.8 ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์

Piveteau (1999) ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณของโพรพิโอเนตและแอซีเตตที่ผลิตจากน้ำตาลและแลกเตตโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ (Propioni-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bacterium) 12 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน 26 สภาวะ พบว่าอัตราส่วนโดยโมลของโพรพิโอเนตต่อแอซีเตต (P/A) มีค่าอยู่ในช่วง 0.9-3.8 โดยส่วนใหญ่จะมีค่าอยู่ประมาณ 2.0

Himmi และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลูโคสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยกระบวนการหมักแบบกะ (ถังหมักขนาด 1.2 ลิตร) ซึ่งใช้เชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* spp. *shermanii* พบว่าได้ผลผลิตสุดท้าย คือ กรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตเป็นส่วนใหญ่ และได้กรดแอซีติก n-propanol และกรดซักซินิก พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด ซึ่งเชื้อ *P. acidipropionici* มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นได้เร็วกว่า 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดสูงกว่า 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น มีความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ได้จะมากกว่าการใช้กลีเซอรอลถึง 2 เท่า

Lind (2010) ได้รายงานไว้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ (Propionibacterium) บนแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาล เช่น กลูโคส แลกโตส และกาแลกโตส จะให้ผลได้ของพลังงานมากกว่าแลกเตตและเป็นผลให้อัตราการเจริญเติบโตและมวลชีวภาพที่สูงกว่า แต่ในการหมักด้วยแลกเตตจะให้อัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติกที่สูงกว่า

Liu และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *P. acidipropionici* แบบเซลล์อิสระ โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติก (โมลต่อโมล) เท่ากับ 3.63:1 จากงานวิจัยดังกล่าว มีความสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่ได้ใช้กระบวนการหมักแบบกะ และให้ผลผลิตของกรดแอซีติกเช่นเดียวกัน

สำหรับปัจจัยที่ 2 และ 3 คือ X_2-ยีสต์ออโตไลเสท และ X_3-สารสกัดยีสต์ ค่า P เท่ากับ 0.0430 และ 0.0259 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบของสูตรอาหารจากการออกแบบด้วย PBD จะเห็นได้ว่า การทดลองที่เติมยีสต์ออโตไลเสทหรือสารสกัดยีสต์เพียงอย่างเดียวที่ปริมาณสูงที่สุดที่ทำการแปรผัน ร่วมกับการเติมกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดสูง จะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกที่สูงเช่นกัน แต่หากเติมกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดต่ำจะ พบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ได้ มีค่าต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนั้น การใช้ทั้งยีสต์ออโตไลเสทและสารสกัดยีสต์ร่วมกัน ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกที่สูงที่สุด ดังเห็นได้จากการทดลองที่ 3 ดังนั้นจากผลการทดลองนี้น่าจะสามารถกล่าวได้ว่า เมื่อเติมยีสต์ออโตไลเสท และ/หรือ สารสกัดยีสต์รวมกับความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลในองค์ประกอบของสูตรอาหารน่าจะเป็น 2 ปัจจัยที่อาจมีความสำคัญร่วมกันและสามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงขึ้นซึ่งเห็นได้อย่างชัดเจนในการทดลองครั้งนี้ และจากการวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนของยีสต์ออโตไล-เสท (Nanoproplus, Thailand) และสารสกัดยีสต์ (Himedia, India) พบว่ามีกรดอะมิโนซึ่งมีส่วนสำคัญในการช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด แสดงดัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 52. 50 และ 84.38 ปริมาณไนโตรเจน (Kjeldahl) ร้อยละ 8.41 และ 13.66 ตามลำดับ

Praveen และคณะ (2008) ได้กล่าวไว้ว่าสารสกัดจากยีสต์ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพและเป็นแหล่งของสารอาหารในการหมักแบคทีเรียและสร้างกรดโพรพิโอนิกได้ รายงานการวิจัยของ Smith และ Hoitzapple (2011) ได้รายงานไว้ว่าสารอาหารที่สำคัญต่อกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งไนโตรเจน (เช่น โปรตีน และเกลือแอมโมเนีย) มีความจำเป็นสำหรับกระบวนการหมักอย่างมาก และส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานเพราะมีบทบาทในการสร้างเซลล์ การบำรุงรักษา การสังเคราะห์ทางชีวภาพ และการสังเคราะห์เอนไซม์ รายงานการวิจัยของ Prescott และ Dunn (1959) พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีผลต่ออัตราการหมักและอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก โดยเชื้อ *P. shermanii* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด สารสกัดยีสต์ เป็นต้น แต่สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด รายงานงานวิจัยของ Colomban และคณะ (1993) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ สารสกัดยีสต์ ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด และโปรตีนเวย์เข้มข้น พบว่าสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด โดยสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ รายงานการวิจัยของ Yang และคณะ, (1994) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงในหางนมเพื่อผลิตกรดโพร-พิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ ทริปทิเคสซอยบรอท และสารสกัดยีสต์ พบว่าเมื่อใช้สารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร และทริปทิเคสซอยบรอท 20 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด และรายงานการวิจัยของ Lima และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus* SMI8 ซึ่งใช้แหล่งไนโตรเจน คือ น้ำแช่ข้าวโพด และยีสต์ออโตไลเสท พบว่าสามารถสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด เมื่อใช้น้ำแช่ข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร และใช้ยีสต์ออโตไลเสท 5 กรัมต่อลิตร ซึ่งรายงานการศึกษาต่างๆที่กล่าวมา มีความสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในยีสต์ออโตไลเสทและสารสกัดยีสต์

กรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (กรัมต่อ 100 กรัม)	
	Nanoproplus™ (Thailand)	**Himedia (India)**
กรดแอสพาติก (Aspartic acid)	0.024	2.675
ทรีโอนีน (Threonine)	0.056	2.583
เซอรีน (Serine)	0.010	2.648
กรดกลูตามิก (Glutamic acid)	0.842	8.585
โพรลีน (Proline)	0.244	1.362
ไกลซีน (Glycine)	0.171	1.739
อะลานีน (Alanine)	0.849	5.318
ซีสตีน (Cystine)	0.062	-
วาลีน (Valine)	0.291	3.427
เมทไทโอนีน (Methionine)	0.054	0.786
ไอโซลิวซีน (Isoleucine)	0.145	2.773
ลิวซีน (Leucine)	0.256	4.763
ไทโรซีน (Tyrosine)	0.338	1.620
ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine)	3.081	2.791
ฮิสทิดีน (Histidine)	0.051	0.341
ไลซีน (Lysine)	0.132	2.567
อาร์จินีน (Arginine)	0.029	2.094
ทริปโตเฟน (Tryptophan)	0.012	0.486

ที่มา: วิเคราะห์ด้วย HPLC จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา นิคมอุตสาหกรรมบางปู ซอย 1 ถ. สุขุมวิท อ. เมือง จ.สมุทรปราการ 10280

เมื่อพิจารณาปัจจัยอื่นที่เหลือ คือ X_4-ทริปติกซอยบรอท, X_5-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และ X_6-โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ส่งผลกระทบในทางลบต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก หมายความว่า ควรลดความเข้มข้นลงให้มีค่าต่ำที่สุดที่ทำการแปรผันในการทดลองโดยมีค่า P เท่ากับ 0.2206, 0.8700 และ 0.6829 ตามลำดับ

จากผลการทดลองดังที่กล่าวมาข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า 3 ปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบเชิงบวกต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกอย่างมีนัยสำคัญ คือ X_1-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กากน้ำตาล, X_2-ยีสต์ออโตไลเสท และ X_3-สารสกัดยีสต์ จะถูกนำไปแปรผันค่าความเข้มข้น และปัจจัยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ X_4-ทริปติกซอยบรอท, X_5-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และ X_6-โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จะถูกกำหนดให้ใช้ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดจากการออกแบบการทดลองของ PBD สำหรับการทดลองขั้นต่อไปเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology หรือ RSM) โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design หรือ CCD)

4.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

Response surface methodology (RSM) หรือวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง และการวางแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design, CCD) เป็นวิธีในการหาผลตอบสนองของกระบวนการแบบโครงสร้างพื้นผิว (response surface) ซึ่งนำความรู้ทางด้านคณิตศาสตร์และทางสถิติมาประยุกต์ โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของการทดลอง ผ่านการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในรูปแบบแบบสามมิติ (3D contour plot) และทำการวิเคราะห์ปัญหาโดยสนใจที่ผลตอบสนอง (response) (Montgomery, 1991) รายงานของ Myers (1995) ได้กล่าวไว้ว่า RSM และ CCD เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์และสถิติมาใช้เพื่อช่วยในการคำนวณผลตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด ปัจจุบันมีการประยุกต์นำวิธี RSM มาใช้กันอย่างกว้างขวางในงานทางด้านอุตสาหกรรมและการศึกษา รวมถึงทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองในครั้งนี้จึงได้นำเอาวิธีการและการวางแผนการทดลองนี้มาประยุกต์ใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดสำหรับปัจจัยที่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อแบคทีเรีย *P. acidipropionici* TISTR 422 มีจำนวน 3 ปัจจัย ซึ่งเป็นตัวแปรหลักที่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการคัดเลือกได้จากการทดลองในหัวข้อ 4.1.1 ประกอบไปด้วย X_1-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล, X_2-ยีสต์ออโตไลเสท และ X_3-สารสกัดยีสต์ โดยทำการแปรผันค่าความเข้มข้นของแต่ละปัจจัยเป็น 5 ระดับ คือ ระดับต่ำสุด ($-\alpha$), ระดับต่ำ (-), ระดับกลาง (0), ระดับสูง (+), ระดับสูงสุด ($+\alpha$) ให้มีความแตกต่างของค่าความเข้มข้นในแต่ละระดับที่เท่าๆกัน วางแผนการทดลองได้ทั้งหมด 20 การทดลอง กำหนดค่าตอบสนอง (response; Y) ของการทดลองที่ต้องทำการวิเคราะห์คือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณกรดแอซีติกที่ผลิตขึ้น ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (ตารางที่ 4.4) และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก

จากผลการทดลอง พบว่าสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงที่สุด คือ 27.75±1.90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 144 ชั่วโมง ในอาหารสูตรที่ 6 ซึ่งประกอบไปด้วย ความเข้มข้นของน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมดในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์ออโตไลเสท 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ทริปติกซอยบรอท 3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4) อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกคิดเป็น 0.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณกรดแอซีติก 17.09±0.09 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนปริมาณกรดโพรพิโอนิกต่อปริมาณกรดแอซีติก (P/A) เท่ากับ 1.62 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ เท่ากับ 35.68 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 44.09 และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.98 และผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ต่ำที่สุดในอาหารสูตรที่ 13 คือ 0.91±0.01 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลอง เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลโดยใช้เทคนิคในการหาพื้นที่การตอบสนองทางสถิติ ANOVA เพื่อหาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษากับผลการทดลองที่ติดตาม (response) โดยใช้สมการทั่วไปแบบจำลองพหุนามกำลังสองในการทำนายค่า Y แสดงในสมการที่ 4.4

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (4.4)$$

เมื่อ Y คือ ผลการทดลองที่ติดตาม (response)

β_0 คือ ค่าคงที่ β_1, β_2, β_3 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย

β_{11}, β_{22}, β_{33} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ quadratic term

β_{12}, β_{13}, β_{23} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ interaction term

X_1, X_2, X_3 คือ ตัวแปรอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการผลิตกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือโดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ที่ได้ออกแบบการทดลองแบบ CCD จำนวน 20 การทดลอง ที่เวลา 144 ชั่วโมง

การทดลองที่	*X1* (กรัมต่อลิตร)	*X2* (กรัมต่อลิตร)	*X3* (กรัมต่อลิตร)	กรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	
						ค่าที่ได้จากการทดลอง	ค่าที่ได้จากการทำนาย
1	-1 (20)	-1 (0)	+1 (10)	7.82^{fg}±0.33	4.84^{n}±0.01	12.21^{e}±0.80	13.91
2	+1 (60)	+1 (10)	-1 (0)	7.91^{fg}±0.19	42.44^{c}±0.01	19.85^{cd}±4.86	18.82
3	-1 (20)	-1 (0)	-1 (0)	3.45^{hi}±0.66	7.49^{k}±0.01	6.25^{f}±1.02	7.04
4	-1 (20)	+1 (10)	-1 (0)	4.14^{h}±0.17	6.81^{m}±0.01	8.43^{f}±1.24	8.51
5	-1 (20)	+1 (10)	+1 (10)	11.48^{e}±0.48	6.93^{l}±0.01	12.62^{e}±1.00	8.54
6	**+1 (60)**	**+1(10)**	**+1 (10)**	**17.09^{a}±0.10**	**35.68^{c}±0.01**	**27.75^{a}±1.90**	**27.63**
7	+1 (60)	-1 (0)	-1 (0)	8.68^{ef}±0.50	54.13^{a}±0.01	5.31^{f}±2.10	10.07
8	+1 (60)	-1 (0)	+1 (10)	15.12^{b}±0.69	38.04^{d}±0.01	25.13^{ab}±5.12	25.72
9	0 (40)	-α (-3.41)	0 (5)	9.29^{de}±0.06	20.83^{h}±0.01	19.17^{d}±0.03	14.84
10	0 (40)	+α (13.41)	0 (5)	11.50^{c}±0.72	26.02^{g}±0.01	14.29^{e}±3.45	17.68
11	+α (73.64)	0 (5)	0 (5)	15.60^{b}±1.37	53.73^{b}±0.01	22.89^{bc}±2.44	20.73
12	0 (40)	0 (5)	+α (13.41)	15.23^{b}±0.10	20.26^{i}±0.01	24.43^{ab}±0.07	25.90
13	-α (6.36)	0 (5)	(5)	2.97^{i}±0.32	3.28^{o}±0.01	0.91^{g}±0.01	2.13
14	0 (40)	0 (5)	-α (-3.41)	7.73^{g}±0.94	26.45^{f}±0.01	15.12^{e}±0.08	12.71
15	0 (40)	0 (5)	0 (5)	9.72^{d}±0.11	18.10^{j}±0.01	26.08^{ab}±0.65	26.10
16	0 (40)	0 (5)	0 (5)	9.72^{d}±0.11	18.10^{j}±0.01	26.08^{ab}±0.65	26.10
17	0 (40)	0 (5)	0 (5)	9.72^{d}±0.11	18.10^{j}±0.01	26.08^{ab}±0.65	26.10
18	0 (40)	0 (5)	0 (5)	9.72^{d}±0.11	18.10^{j}±0.01	26.08^{ab}±0.65	26.10
19	0 (40)	0 (5)	0 (5)	9.72^{d}±0.11	18.10^{j}±0.01	26.08^{ab}±0.65	26.10
20	0 (40)	0 (5)	0 (5)	9.72^{d}±0.11	18.10^{j}±0.01	26.08^{ab}±0.65	26.10

หมายเหตุ: *X1* หมายถึง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล, *X2* หมายถึง ยีสต์ออโตไลเสท, *X3* หมายถึง สารสกัดยีสต์รหัส -1, 0 และ +1 หมายถึง ระดับต่ำ ระดับกลาง และระดับสูง; ± หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปัจจัยที่ศึกษาด้วยโปรแกรมทางสถิติ เพื่อให้ได้แบบจำลองโครงสร้างที่ใช้ในการทำนายความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นกับค่าผลการทดลองที่ติดตาม (response) ซึ่งใช้อธิบายปัจจัยที่เป็นอิทธิพลหลัก (main effect) และปัจจัยที่เป็นอิทธิพลร่วม (interaction effect) แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษากับค่าตอบสนองด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจที่นำมาปรับเพื่อให้สัมพันธ์กับจำนวนตัวแปรต้นในรูปแบบจำลอง (adj-R^2) และค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจระหว่างข้อมูลชุดใหม่กับรูปแบบจำลอง (predicted R^2) ดังตารางที่ 4.5 สมการเชิงเส้นตรง (linear model) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2), adj-R^2 และ predicted R^2 เท่ากับ 0.4654, 0.3651 และ 0.1950 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า R^2 มีค่าค่อนข้างต่ำทำให้สมการเชิงเส้นไม่มีความน่าเชื่อถือในการทำนายผลการผลิตกรดโพรพิโอนิกและสมการเชิงเส้นตรงยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรที่มีผลร่วมกันได้ สมการเชิงเส้นตรงที่มีอิทธิพลร่วม (2 factorial interaction model; 2FI) พบว่ามีค่า R^2, adj-R^2 และ predicted R^2 เท่ากับ 0.5300, 0.3131 และ -0.3981 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่ามีค่าติดลบ แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถใช้ในการทำนายผลการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ ในขณะที่สมการพหุนามกำลังสอง (Quadratic model) พบว่ามีค่า R^2, adj-R^2 และ predicted R^2 เท่ากับ 0.9352, 0.8769 และ 0.4932 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า R^2 มีค่าสูง ถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ เป็นการยืนยันว่าสามารถใช้ในการทำนายการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด และสมการพหุนามกำลังสาม (Cubic model) พบว่ามีค่า R^2, adj-R^2 และ predicted R^2 เท่ากับ 0.9984, 0.9948 และ 0.6386 ตามลำดับ การวิเคราะห์ทางสถิติโดยสมการพหุนามกำลังสามไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของค่าตอบสนองและตัวแปรได้ เนื่องจากชุดการทดลองไม่เพียงพอในการคำนวณสัมประสิทธิ์ของสมการพหุนามกำลังสาม ดังนั้นจึงเลือกสมการที่มีลำดับสูงสุด คือ สมการพหุนามกำลังสอง เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของการผลิตกรดโพรพิโอนิกกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ $X1$-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล $X2$-ยีสต์ออโตไลเสท และ $X3$-สารสกัดยีสต์ ซึ่งจากการวิเคราะห์จะแสดงความสัมพันธ์ในรูปแบบสมการกำลังสองของแบบจำลอง โดยค่าทำนายสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4.5

$$\text{กรดโพรพิโอนิก} = 26.10 + 5.53 * X1 + 0.84 * X2 + 3.92 * X3 + 1.82 * X1 * X2 + 2.20 * X1 * X3 - 1.71 * X2 * X3 - 5.19 * X1^2 - 3.48 * X2^2 - 2.40 * X3^2 \quad (4.5)$$

และค่าผลผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการทดลองสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4.6

$$\text{กรดโพรพิโอนิก} = -10.03780 + 1.11338 * X1 + 1.17611 * X2 + 1.20951 * X3 + 0.018197 * X1 * X2 + 0.021962 * X1 * X3 - 0.068464 * X2 * X3 - 0.012972 * X1^2 - 0.13927 * X2 - 0.096176 * X3^2 \quad (4.6)$$

เมื่อ Y คือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิก $X1$, $X2$, และ $X3$ คือ ตัวแปรที่ใช้แทนปัจจัยที่นำมาทำการทดลอง ได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล ยีสต์ออโตไลเสท และสารสกัดยีสต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองโครงสร้างที่ใช้ในการทำนายความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นกับค่าผลการทดลองที่ติดตาม (response) เพื่อหาพื้นที่การตอบสนอง

Model	**SS**	**df**	**MS**	R^2	adj-R^2	predicted R^2
Linear	73182	11	66.53	0.4654	0.3651	0.1950
2FI	643.31	8	80.41	0.5300	0.3131	-0.3981
Quadratic	88.67	5	17.73	0.9352	0.8769	0.4932
Cubic	2.24	1	2.24	0.9984	0.9948	0.6386

หมายเหตุ: SS หมายถึง Sum of square; df หมายถึง Degree of freedom; MS หมายถึง Mean square

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปัจจัยที่ศึกษา ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.6 พบว่ารูปแบบที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองมีความเหมาะสมกับ Quadratic model ซึ่งได้กล่าวไปก่อนหน้านี้ มีค่า F-value ของแบบจำลองเท่ากับ 16.04 และมีค่าความแตกต่างอย่างนัยสำคัญ (มีค่า P เท่ากับ <0.0001) ทั้งนี้ ค่า P ที่น้อยกว่า 0.05 หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และค่า P ที่มากกว่า 0.05 จะถือว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) เมื่อตรวจสอบค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) จากการทดลองนี้ค่า R^2 มีค่าร้อยละ 93.52 ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจแบบจำลอง (Adj-R^2) มีค่าเท่ากับร้อยละ 87.69 โดยแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามเมื่อได้รับอิทธิพลจากตัวแปรต้น และบ่งชี้ระดับความแม่นยำที่ทำการทดลอง (Coefficient of Variation; C.V%) มีค่าเท่ากับร้อยละ 16.06 ซึ่งควรมีค่าในระดับต่ำ เนื่องจากจะบ่งบอกถึงรูปแบบโมเดลที่เหมาะสม และเป็นการยืนยันว่าการออกแบบการทดลองนี้สามารถทำนายการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้อย่างมีนัยสำคัญ ความแม่นยำของการออกแบบ (Adequate precision) พิจารณาจากสัดส่วนของสิ่งรบกวนการออกแบบ โดยต้องมีค่ามากกว่า 4 ขึ้นไป จึงจะถือว่าการออกแบบนี้มีความแม่นยำ ในการออกแบบครั้งนี้พบว่ามีค่าเท่ากับ 12.019 ซึ่งยืนยันว่าการออกแบบนี้สามารถนำไปใช้ในหาค่าที่เหมาะสมในการทดลองได้

จากตารางที่ 4.6 พิจารณาสมการเส้นตรง (linear term) ของแต่ละปัจจัย คือ X_1-ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล และ X_3-สารสกัดยีสต์ พบว่ามีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ <0.0001 และ 0.0007 ตามลำดับ) ในขณะที่ X_2-ยีสต์ออโตไลเสท ไม่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ 0.3190) และทั้ง 3 ปัจจัย ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกในทางบวก มีค่าเท่ากับ 5.53, 0.84 และ 3.92 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิจารณาในส่วนปฏิสัมพันธ์ต่อกัน (interaction term) ระหว่างผลของความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลกับยีสต์ออโตไลเสท (X_1X_2) ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลกับสารสกัดยีสต์ (X_1X_3) และยีสต์ออโตไลเสทกับสารสกัดยีสต์ (X_2X_3) พบว่าปัจจัยที่เป็นอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลกับยีสต์ออโตไลเสท (X_1X_2), ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลกับสารสกัดยีสต์ (X_1X_3) และยีสต์ออโตไลเสทกับสารสกัดยีสต์ (X_2X_3) ไม่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ 0.1146, 0.0635 และ 0.1351 ตามลำดับ) แสดงว่าทั้ง 3 ปัจจัย ไม่มีอิทธิพลร่วมต่อกัน แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลกับยีสต์ออโตไลเสท (X_1X_2) และความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล กับสารสกัดยีสต์ (X_1X_3) ส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกในทางบวก เท่ากับ 1.82 และ 2.20 ในทางตรงกันข้าม ยีสต์ออโตไลเสทกับสารสกัดยีสต์ (X_2X_3) ส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกในทางลบ เท่ากับ -1.71

พิจารณาในส่วนกำลังสองของปัจจัย (Quadratic term) ซึ่งมีแนวโน้มของกราฟนี้จะเป็นเส้นโค้ง เมื่ออธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัย พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล (X_1^2) ยีสต์ออโตไลเสท (X_2^2) และสารสกัดยีสต์ (X_3^2) มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ <0.0001, 0.0013 และ 0.0119 ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามทั้ง 3 ปัจจัย ส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกในทางลบ เท่ากับ -5.19, -3.48 และ -2.40 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาทีละปัจจัยจากการทดลอง พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลมีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก เนื่องจากกากน้ำตาลมีองค์ประกอบ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ดังนี้ น้ำตาลนอน-รีดิวซ์ (ซูโครสร้อยละ 24.5), น้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคสร้อยละ 19.2), น้ำตาลที่ไม่สามารถใช้ในการหมัก (unfermentable sugar) ร้อยละ 4.8, เถ้าร้อยละ 10.5, ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ร้อยละ 0.51 และฟอสเฟตในรูปฟอสเฟตออกไซด์ (P_2O_5) ร้อยละ 0.15 (Xiao และคณะ, 2007) กากน้ำตาลถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกในกระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพเป็นจำนวนมาก มีรายงานว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลได้ของมวลชีวภาพสูงที่สุด (Rossi และคณะ, 2003; Coral และคณะ, 2008) สำหรับรายงานการวิจัยของ Najafpour และ Shan (2003) ได้ทำการศึกษาการย่อยกากน้ำตาลด้วยเอนไซม์ พบว่ากากน้ำตาลเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ซึ่งถูกนำมาใช้ในกระบวนการหมักและสามารถเพิ่มผลได้และอัตราการผลิตในกระบวนการหมักได้เป็นอย่างดี โดยเชื้อแบคทีเรียจะใช้น้ำตาล ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการหมักแล้วจะได้เป็นกรดโพรพิโอนิกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และจากวิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Propionibacterium พบว่าน้ำตาลกลูโคส 1.5 โมล จะสามารถเปลี่ยนไปเป็นกรด โพรพิโอนิก 2 โมล และกรดแอซีติก 1 โมล (Roberto และ Mayra, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับสมการของ Fitz (Fitz equation) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 lactate ⟶ 2 propionate + 1 acetate + 1 CO_2 + 1 H_2O

1.5 glucose ⟶ 2 propionic acid + 1 acetic acid + 1 CO_2 + 1 H_2O

ดังสมการการเกิดกรดโพรพิโอนิกจะเกิดกรดแอซีติกเป็นผลิตผลพลอยได้เพื่อรักษาไฮโดรเจนและสมดุลของรีดอกซ์ (Benjelloun, และคณะ, 2005; Boyaval และ Corre, 1995) จากผลการทดลองในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่าอัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติกสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีรายงานมาก่อนหน้าซึ่งให้อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติกประมาณ (P/A) เท่ากับ 2 นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Martinez และ Torre (2002) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในการหมักแบบกึ่งกะโดยเชื้อ *P. acidipropionici* มีการใช้กลูโคสหรือแลกเตตหรือของผสมระหว่างกลูโคสและแลกเตต พบว่าของผสมระหว่างกลูโคสและแลกเตตจะสามารถเพิ่มอัตราการผลิตโพร-พิโอเนตและแอซีเตต (P/A) เท่ากับ 7.60 เมื่อใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียวจะให้อัตราการผลิตโพรพิ-โอเนตและแอซีเตต (P/A) เท่ากับ 1.85 และเมื่อใช้แลกเตตเพียงอย่างเดียวจะให้อัตราการผลิตโพร-พิโอเนตและแอซีเตต (P/A) เท่ากับ 1.34 สำหรับงานวิจัยของ Liu และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *P. acidipropionici* แบบเซลล์อิสระโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติก (โมลต่อโมล) เท่ากับ 3.63 : 1

เมื่อพิจารณา 2 ปัจจัยที่เหลือ คือ ยีสต์ออโตไลเสทและสารสกัดยีสต์ ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่จำเป็นต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก เนื่องจากเป็นปัจจัยที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน วิตามินบี และสารอื่นๆ (Altaf และคณะ, 2006; Lima และคณะ, 2009) จากผลการทดลองพบว่า ยีสต์ออโตไลเสทส่งผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกในทางบวกน้อยกว่าสารสกัดยีสต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยีสต์ออโตไลเสทจะมีปริมาณของกรดอะมิโน วิตามิน และสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าสารสกัดยีสต์ทางการค้า เมื่อคำนวณต้นทุนในเชิงเศรษฐศาสตร์และเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย ดังนั้นจึงเลือกที่จะนำยีสต์ออโตไลเสทมาทดแทนสารสกัดยีสต์ สำหรับยีสต์ออโตไลเสทที่ผลิตได้ในประเทศไทยมีราคาถูก จึงได้เลือกมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทางเลือกอีกทางหนึ่ง ดังรายงานการวิจัยที่สอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ของ Lima และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus* SMI8 ซึ่งใช้แหล่งไนโตรเจน คือ น้ำแช่ข้าวโพดและยีสต์ออโตไลเสท พบว่าสามารถสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด เมื่อใช้น้ำแช่ข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร และใช้ยีสต์ออโตไลเสท 5 กรัมต่อลิตร รายงานการวิจัยของ Kagliwal และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษากระบวนการหมักกรดโพรพิโอนิกจากข้าวสาลีและใช้แหล่งไนโตเจนต่างๆ คือ สารสกัดยีสต์ ซอยเพปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าหมักกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 48.61 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ข้าวสาลีที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเทียบเท่ากับการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลถึง 90 กรัมต่อลิตร และใช้สารสกัดยีสต์ 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน มีรายงานการวิจัยของ Yang และคณะ, (1994) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจนที่เติมลงในหางนมเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ ทริปทิเคสซอยบรอท และสารสกัดยีสต์ พบว่าจะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด เมื่อใช้สารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร และทริปทิเคสซอยบรอท 20 กรัมต่อลิตร และมีรายงานของ Praveen และคณะ (2008) ได้กล่าวไว้ว่าสารสกัดจากยีสต์ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพและเป็นแหล่งของสารอาหารในการหมักแบคทีเรียและสร้างกรดโพรพิโอนิกได้

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (CCD)

Terms	Coefficient Estimate	SE Coefficient	Sum of Squares	df	Mean Square	F value	P-value (Prob>F)
Model	26.10	1.21	1280.17	9	142.24	16.04	<0.0001*
X1	5.53	0.81	417.47	1	417.47	47.08	<0.0001*
X2	0.84	0.81	9.75	1	9.75	1.10	0.3190
X3	3.92	0.81	209.81	1	209.81	23.66	0.0007*
X1X2	1.82	1.05	26.49	1	26.49	2.99	0.1146
X1X3	2.20	1.05	38.59	1	38.59	4.35	0.0635
X2X3	-1.71	1.05	23.44	1	23.44	2.64	0.1351
$X1^2$	-5.19	0.78	387.99	1	387.99	43.75	0.0001*
$X2^2$	-3.48	0.78	174.70	1	174.70	19.70	0.0013*
$X3^2$	-2.40	0.78	83.31	1	83.31	9.40	0.0119*
Residual			88.67	10	8.87		

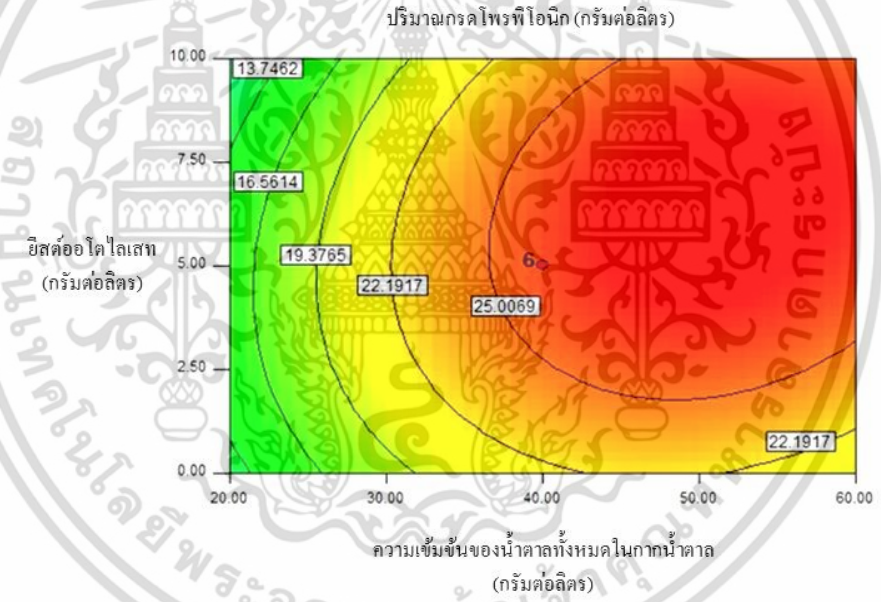
R^2 = 93.52%, Adj-R^2 = 87.69%, C.V% = 16.06, Adequate precision =12.019

หมายเหตุ: SE Coefficient หมายถึง Standard error of coefficient; df หมายถึง Degree of freedom; * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$); *X1* หมายถึง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล; *X2* หมายถึง ยีสต์ออโตไลเสท; *X3* หมายถึง สารสกัดยีสต

การสร้างพื้นผิวตอบสนอง (3D surface response plot) ของปริมาณกรดโพรพิโอนิก เมื่อได้สมการสำหรับการทำนายการผลิตกรดโพรพิโอนิก จึงนำมาสร้าง โครงร่าง และกราฟพื้นผิวตอบสนองของปริมาณกรดโพรพิโอนิกระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสท (รูปที่ 4.3 และ 4.4) พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้น

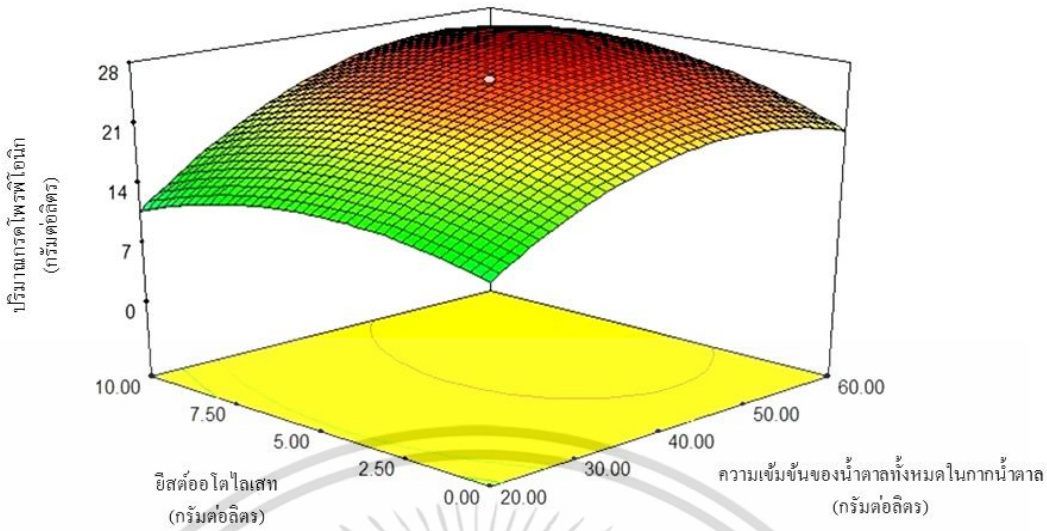
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสทเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ดังจะเห็นได้จากบริเวณพื้นที่กราฟที่เป็นสีแดง และเมื่อนำกราฟพื้นผิวตอบสนองของอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสทมาแสดงในลักษณะกราฟโครงร่าง จะเห็นความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลกับยีสต์ออโตไลเสท ที่ส่งผลต่อปริมาณกรดโพรพิโอนิก มีลักษณะไม่เป็นเส้นตรงเช่นเดียวกัน โดยพบว่าเส้นโค้งทางด้านขวาวงแรกสุดของกราฟที่ล้อมรอบพื้นที่บริเวณสีแดง แสดงถึงปริมาณกรดโพรพิโอนิก 25.0069 กรัมต่อลิตร จะสังเกตได้ว่าการได้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกที่มากที่สุดในพื้นที่สีแดงนั้น จะมีองค์ประกอบของความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร และยีสต์ออโตไลเสท 5 กรัมต่อลิตร ขึ้นไปเป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร ส่วนโค้งวงที่ถัดออกมาจะแสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่เริ่มลดลง เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสท ความเข้มข้นที่น้อยลง คือ 22.1917, 19.3765, 16.5614 และ 13.7462 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 โครงร่างระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสท

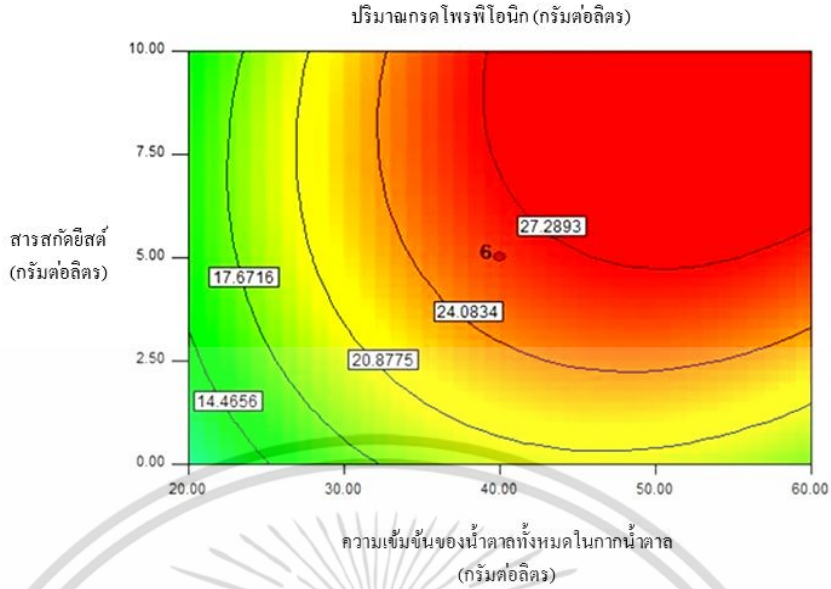
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



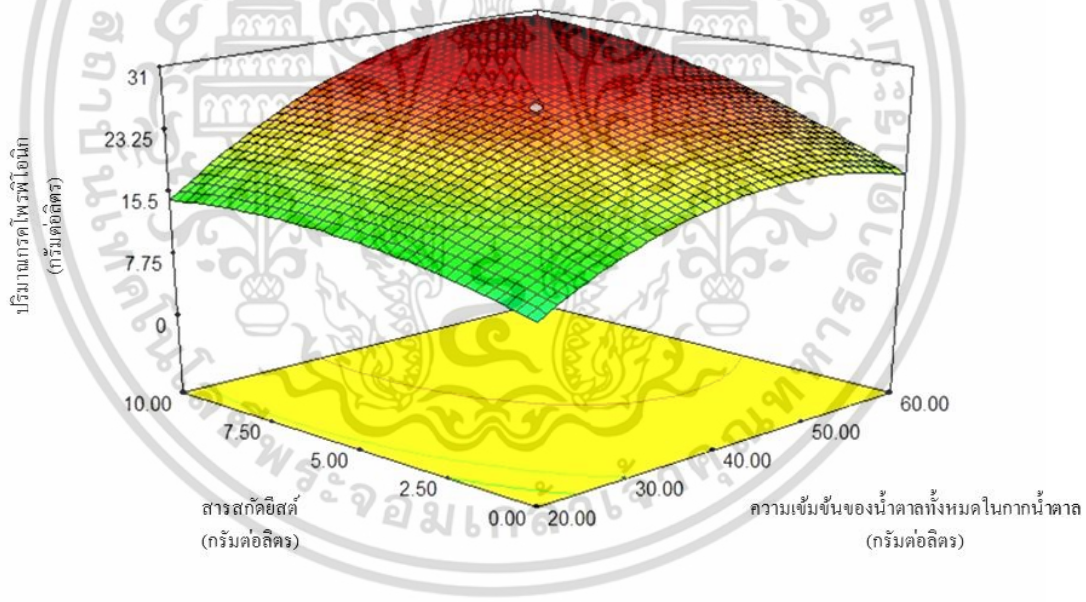
รูปที่ 4.4 พื้นผิวตอบสนองปริมาณกรดโพรพิโอนิกระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและยีสต์ออโตไลเสท

จากรูปที่ 4.5 แสดงลักษณะกราฟโครงร่าง และพื้นผิวตอบสนองของปริมาณกรดโพรพิโอนิกระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและสารสกัดยีสต์ (รูปที่ 4.6) พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและสารสกัดยีสต์อยู่ที่ระดับสูงเช่นกัน เมื่อนำกราฟพื้นผิวตอบสนองของอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและสารสกัดยีสต์มาแสดง จะเห็นความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลกับสารสกัดยีสต์ ที่ส่งผลต่อปริมาณกรดโพรพิโอนิก เช่นเดียวกับในกราฟโครงร่าง ที่มีลักษณะไม่เป็นเส้นตรงเช่นเดียวกัน โดยพบว่าเส้นโค้งทางด้านขวาวงแรกสุดของกราฟที่ล้อมรอบพื้นที่บริเวณสีแดง แสดงถึงปริมาณกรดโพรพิโอนิก 27.2893 กรัมต่อลิตร จะสังเกตได้ว่าการได้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกที่มากที่สุดในพื้นที่สีแดงนั้น จะมีองค์ประกอบของความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร และสารสกัดยีสต์ 7.5 กรัมต่อลิตร ขึ้นไปเป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร ส่วนโค้งที่ถัดออกมาจะแสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่เริ่มลดลง คือ 24.0834, 20.8775, 17.6716 และ 14.4656 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 โครงร่างระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและสารสกัดยีสต์

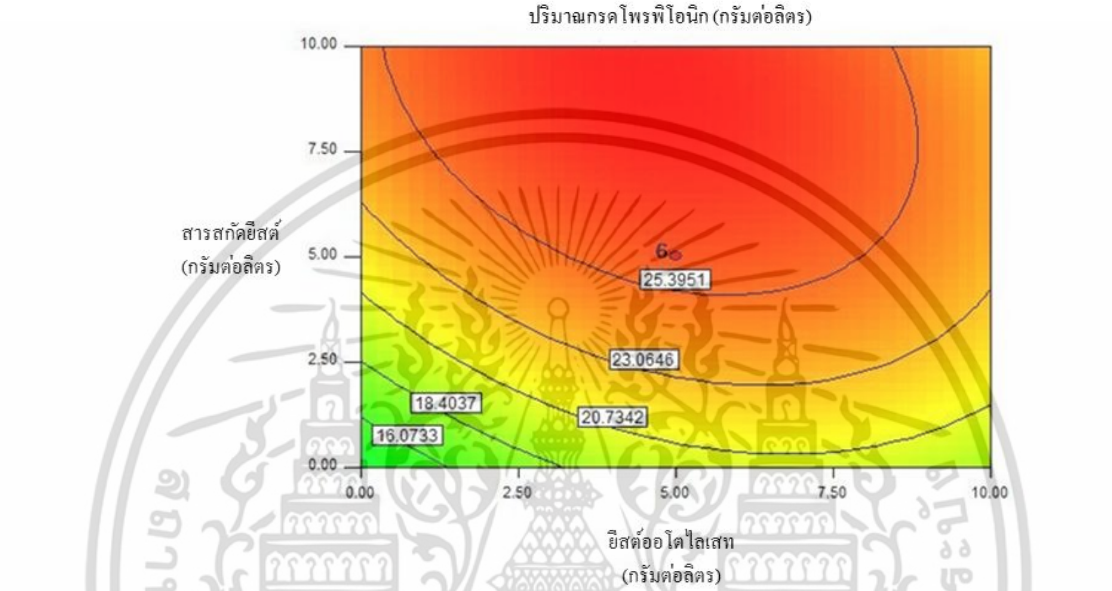


รูปที่ 4.6 พื้นผิวตอบสนองปริมาณกรดโพรพิโอนิกระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลและสารสกัดยีสต์

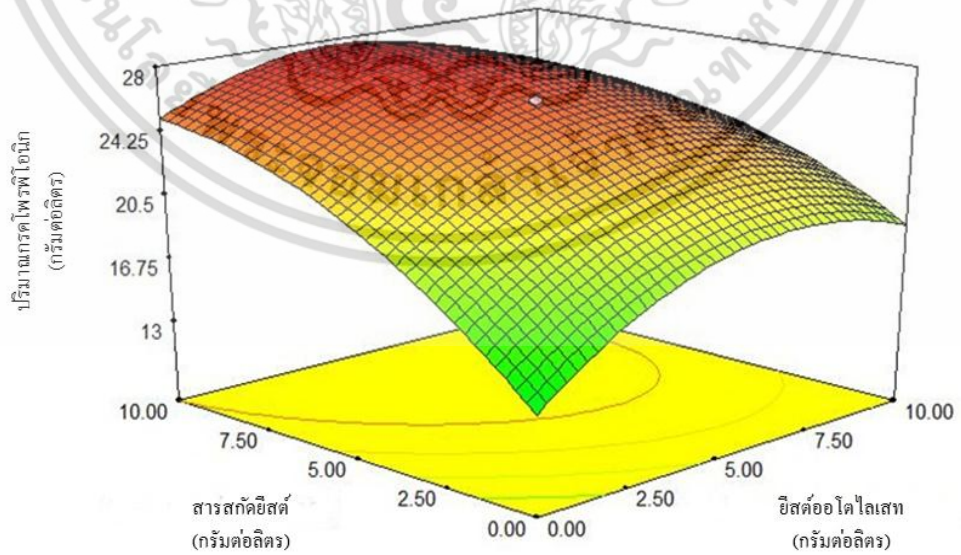
จากรูปที่ 4.7 แสดงลักษณะกราฟโครงร่าง และพื้นผิวตอบสนองของปริมาณกรดโพรพิโอนิกระหว่างยีสต์ออโตไลเสทและสารสกัดยีสต์ (รูปที่ 4.8) พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากขึ้นเมื่อสารสกัดยีสต์อยู่ที่ระดับสูง (5 ถึง 10 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่ยีสต์ออโตไลเสทอยู่ที่ระดับ 2.5 ถึง 7.5 กรัมต่อลิตร เมื่อนำกราฟพื้นผิวตอบสนองของอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของระหว่างยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออโตไลเสทและสารสกัดยีสต์มาแสดง จะเห็นความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของทั้งสองปัจจัย ที่ส่งผลต่อปริมาณกรดโพรพิโอนิก เช่นเดียวกับในกราฟโครงร่างที่มีลักษณะไม่เป็นเส้นตรงเช่นเดียวกัน โดยพบว่าเส้นโค้งทางด้านบนวงแรกสุดของกราฟที่ล้อมรอบพื้นที่บริเวณสีแดง แสดงถึงปริมาณกรดโพรพิโอนิก 25.3951 กรัมต่อลิตร ส่วนโค้งที่ถัดออกมาจะแสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่เริ่มลดลง คือ 23.0646, 20.7342, 18.4037 และ 16.0733 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.7 โครงร่างระหว่างยีสต์ออโตเสทและสารสกัดยีสต์



รูปที่ 4.8 พื้นผิวตอบสนองปริมาณกรดโพรพิโอนิกระหว่างยีสต์ออโตไลเสทและสารสกัดยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

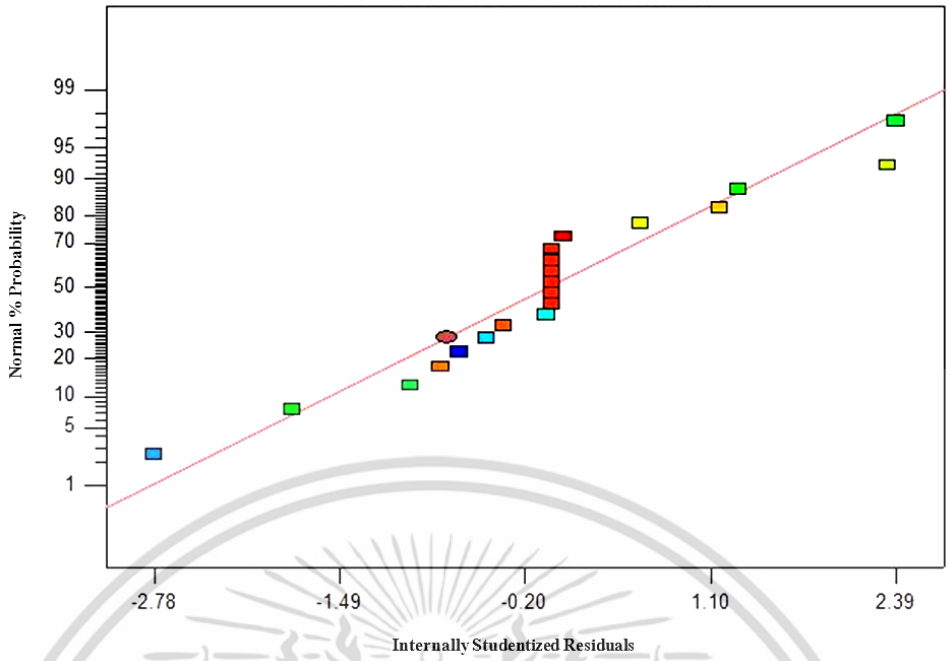
เมื่อพิจารณาความถูกต้องของแบบจำลอง (Normal probability) ซึ่งเป็นการตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ โดยจะทำการตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูลว่ามีการกระจายแบบแจกแจงปกติหรือไม่ ดังรูปที่ 4.9 พบว่ามีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง และแสดงให้เห็นว่าส่วนตกค้างจากผลการทดลองของปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ได้จากการทดลองไม่แสดงสิ่งผิดปกติใดให้เห็น จึงสรุปว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ

การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน (Studentized residuals)โดยใช้การกระจายของส่วนระดับในแต่ละระดับปัจจัย ดังรูปที่ 4.10 พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองการผลิตกรดโพรพิโอนิกมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและทางลบ แสดงว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน

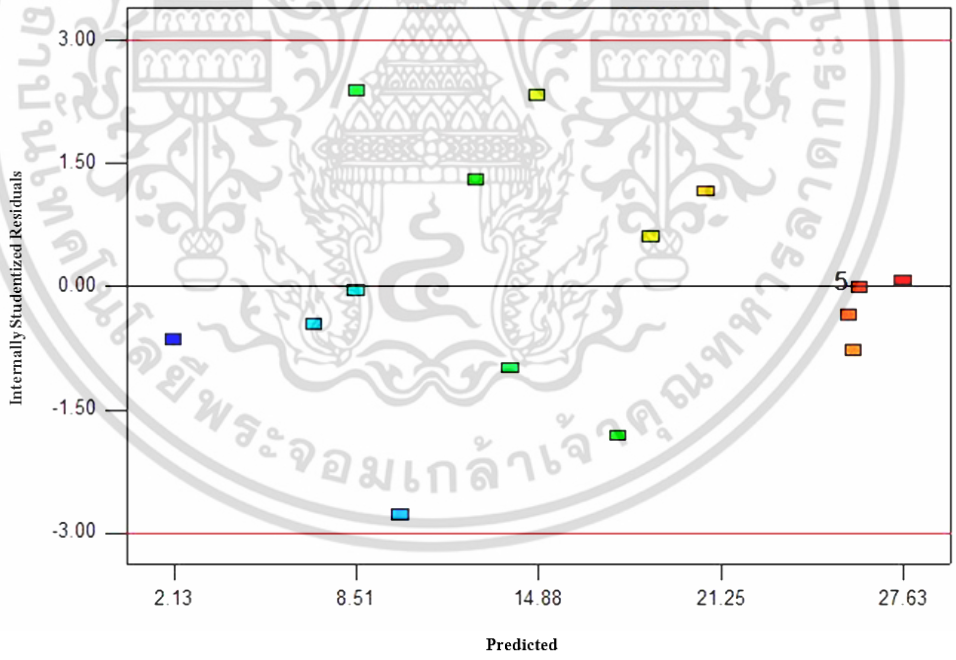
การตรวจสอบความอิสระของข้อมูล ซึ่งเป็นการตรวจสอบความเป็นอิสระของค่าส่วนตกค้างโดยใช้การกระจายเพื่อสังเกตลักษณะการกระจายของจุดที่แทนข้อมูล ดังรูปที่ 4.11 พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองการผลิตกรดโพรพิโอนิกไม่มีรูปแบบที่แน่นอน หรือไม่สามารถประมาณรูปแบบที่แน่นอนได้ มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ แสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ

จากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลอง พบว่าค่าส่วนตกค้างของข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นไปดังนี้ คือ ส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ ค่าความแปรปรวนมีความเหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก และค่าส่วนตกค้างมีความเป็นอิสระต่อกัน จึงสรุปได้ว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองชุดนี้มีความถูกต้องและเหมาะสม รูปแบบจำลองนี้มีความสามารถในการทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ด้วยเซลล์อิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสามารถทำนายระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 จากสมการพหุนามกำลังสอง (สมการที่ 4.5) ซึ่งได้ 1 ชุดการทดลอง ดังตารางที่ 4.7 จึงนำสภาวะนี้ คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล 40.87 กรัมต่อลิตร ยีสต์ออโตไลเสท 4.36 กรัมต่อลิตร และสารสกัดยีสต์ 6.90 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตโพร-พิโอนิกได้เท่ากับ 27.46 กรัมต่อลิตร กรดแอซีติก เท่ากับ 10.93 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ 24.62 กรัมต่อลิตร นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

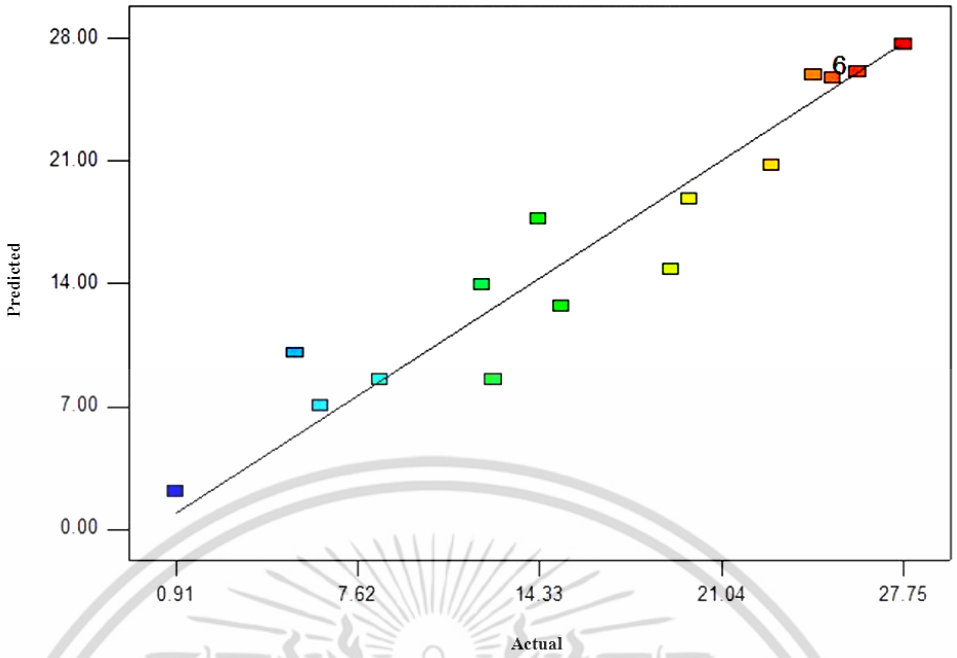


รูปที่ 4.9 การกระจายแบบปกติของส่วนตกค้างที่มีผลต่อรูปแบบการผลิตกรดโพรพิโอนิก



รูปที่ 4.10 การกระจายของส่วนตกค้างกับค่าที่ได้จากการทำนายที่มีผลต่อรูปแบบการผลิตกรดโพรพิโอนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 การกระจายของส่วนตกค้างกับค่าตอบสนองในแต่ละระดับของปัจจัยที่มีผลต่อรูปแบบการผลิตกรดโพรพิโอนิก

ตารางที่ 4.7 ค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาและสอดคล้องกับค่าที่ได้จากทำนายและค่าที่ได้จากการทดลองของปริมาณกรดโพรพิโอนิก โดยการออกแบบการทดลองแบบ CCD

ปัจจัย	ช่วงที่ใช้ในการศึกษา	ค่าที่เหมาะสมที่สุด	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	
			ค่าที่ได้จากการทดลอง	ค่าที่ได้จากการทำนาย
X1	20-60	40.87	25.55±0.58	27.46
X2	0-10	4.36		
X3	0-10	6.90		

หมายเหตุ: *X1* หมายถึง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล; *X2* หมายถึง ยีสต์ออโตไลเสท; *X3* หมายถึง สารสกัดยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การตรวจสอบยืนยันผล (Validation)

ทำการตรวจสอบยืนยันผลที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 4.2 ในระดับฟลาสก์ โดยใช้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยซึ่งเป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ได้จากการทำนาย (predicted value) ประกอบด้วย ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล 40.87 กรัมต่อลิตร ยีสต์ออโตไลเสท 4.36 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 6.90 กรัมต่อลิตร ทริปติกซอยบรอท 3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร กำหนดค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และปริมาณกรดแอซีติก

จากผลการทดลองพบว่า ที่เวลา 144 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิก กรดแอซีติก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ เท่ากับ 25.55±0.58, 8.29±0.85 และ 13.99±0.68 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยผลการตรวจสอบยืนยันผลนี้ มีความถูกต้อง แม่นยำ สอดคล้องกับการทดลองเบื้องต้น ค่าความเข้มข้นที่เหมาะจากการทดลองที่ได้นี้สามารถทำซ้ำได้ และเหมาะที่จะนำไปศึกษาการขยายขนาดการผลิตให้มีขนาดใหญ่ขึ้นต่อไปในระดับ pre-pilot scale

4.4 การศึกษายี่ห้อของสารสกัดยีสต์ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ได้รับอิทธิพลอย่างมากจากแหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งในการทดลองนี้ หมายถึง ยีสต์ออโตไลเสท และสารสกัดยีสต์ทางการค้า หลังจากทำการตรวจสอบยืนยันผล (หัวข้อ 4.3) โดยใช้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งได้จากการวางแผนการออกแบบการทดลองแบบ CCD ประกอบด้วย ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล 40.87 กรัมต่อลิตร ยีสต์ออโตไลเสท 4.36 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 6.9 กรัมต่อลิตร ทริปติกซอยบรอท 3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเปลี่ยนสารสกัดยีสต์ยี่ห้อ Himedia (India) เป็นสารสกัดยีสต์ทางการค้าที่ผลิตในประเทศไทยจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ สารสกัดยีสต์ CW-V (Thailand), สารสกัดยีสต์ 21VP (Thailand) และสารสกัดยีสต์ HIMAX IG20 (Thailand) โดยใช้ปริมาตร 6.9 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบการลดต้นทุนการผลิตกรดโพรพิโอนิกภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กำหนดค่าความเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และปริมาณกรดแอซีติก

จากผลการทดลอง พบว่าที่เวลา 144 ชั่วโมง สารสกัดยีสต์ยี่ห้อ Himedia มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด (25.50±0.43) รองลงมาคือ สารสกัดยีสต์ยี่ห้อ HIMAX IG20 (22.87 ±0.37), สารสกัดยีสต์ยี่ห้อ 21VP (21.71±0.56) โดยการใช้สารสกัดยีสต์ทั้งสามชนิดนี้เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตของกรดโพรพิโอนิก พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$) ในขณะที่สารสกัดยีสต์ยี่ห้อ CW-V (12.46 ±4.36) ให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกน้อยที่สุด และมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.8

ทำการวิเคราะห์ปัจจัยทางเศรษฐศาสตร์ของสารสกัดยีสต์ทั้ง 4 ยี่ห้อ (ตารางที่ 4.9) โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องมีดังนี้ ราคาของสารสกัดยีสต์ (บาทต่อ 500 กรัม) พบว่าสารสกัดยีสต์ยี่ห้อ Himedia มีราคาเท่ากับ 4,200 บาท ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง ในขณะที่สารสกัดยีสต์ที่ผลิตในประเทศไทยซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Thai Foods International Co., LTD คือ สารสกัดยีสต์ยี่ห้อ CW-V, สารสกัดยีสต์ยี่ห้อ 21VP, และสารสกัดยีสต์ยี่ห้อ HIMAX IG20 มีราคาเท่ากับ 200, 400 และ 400 บาท ตามลำดับ ซึ่งมีต้นทุนที่ต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อวิเคราะห์ราคาของสารสกัดยีสต์ที่ใช้เพียงอย่างเดียวในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร (เท่ากับ 6.9 กรัมต่อลิตร) จะให้ราคาเท่ากับ 57.96, 2.76, 5.52 และ 5.52 บาทต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยคำนวณจากปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่เวลา 144 ชั่วโมง เท่ากับ 25.50, 12.46, 21.71 และ 22.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากการประเมินต้นทุนการผลิต พบว่าจะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการผลิตกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 2.27, 0.22, 0.25 และ 0.24 บาทต่อกรัมโพรพิโอนิก ตามลำดับ ดังนั้นการประเมินทางเศรษฐศาสตร์เบื้องต้น พบว่าในกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกของสารสกัดยีสต์ยี่ห้อ Himedia มีราคาของสารสกัดยีสต์ที่สูง ความคุ้มค่าต่อการลงทุนน้อย จึงเลือกสารสกัดยีสต์ยี่ห้อ HIMAX IG20 ซึ่งพบว่ามีราคาของสารสกัดยีสต์น้อยกว่าถึงประมาณ 10.5 เท่า ให้ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์เบื้องต้น และยังมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกมีประสิทธิภาพสูงเทียบเท่าสารสกัดยีสต์ทางการค้ายี่ห้อ Himedia และให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ยี่ห้อของสารสกัดยีสต์ที่มีผลต่อกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก ที่เวลา 144 ชั่วโมง

ผลการศึกษา	ยี่ห้อของสารสกัดยีสต์			
	Himedia	**CW-V**	**21VP**	**HIMAX IG20**
ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	25.50[a]±0.43	12.46[b]±4.36	21.71[a]±0.56	22.87[a]±0.37
ปริมาณกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร)	11.47±0.97	11.41±0.97	12.52±1.21	11.91±1.21
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	14.08±1.33	20.66±0.25	13.47±0.17	13.54±0.40
อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.18	0.09	0.15	0.16
ผลได้ของกรดโพรพิโอนิก (กรัมของกรัมโพรพิโอนิกต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์)	1.81	0.72	1.61	1.69
ร้อยละของน้ำตาลที่ถูกใช้	67.45	52.23	68.85	68.69
อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก (P/A)	2.22	1.09	1.73	1.92

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าที่ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.9 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการประเมินทางเศรษฐศาสตร์*

ยี่ห้อของสารสกัดยีสต์	ราคาของสารสกัดยีสต์ (บาทต่อ500กรัม)	ราคาของสารสกัด-ยีสต์ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร (บาทต่อลิตร)	กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้[3] (กรัมต่อลิตร)	ต้นทุนการผลิต (บาทต่อกรัมโพรพิโอนิก)
Himedia (India)[1]	4,200	57.96	25.50	2.27
CW-V (Thailand)[2]	200	2.76	12.46	0.22
21VP (Thailand)[2]	400	5.52	21.71	0.25
HIMAX IG20 (Thailand)[2]	400	5.52	22.87	0.24

หมายเหตุ: * หมายถึง คำนวณจากสารสกัดยีสต์เพียงอย่างเดียว; [1] หมายถึง www.himedia.com สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2556; [2] หมายถึง Thai Foods International Co., LTD; [3] หมายถึง คำนวณจากปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่เวลา 144 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

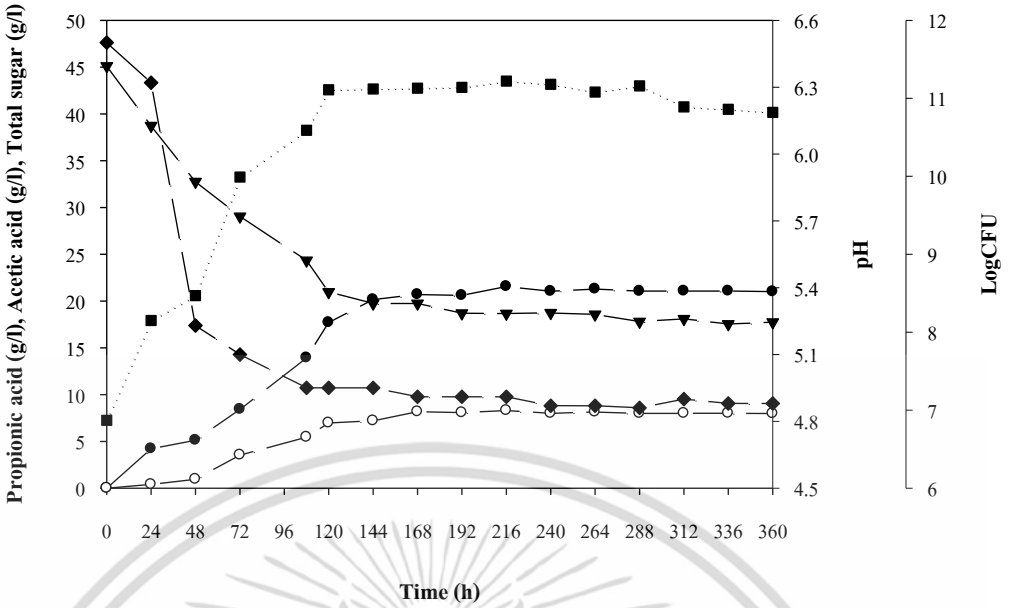
4.5 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

4.5.1 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ

ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเซลล์แบคทีเรีย *P. acidipropionici* TISTR 422 แบบเซลล์อิสระในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะและความเข้มข้นที่เหมาะสม กำหนดค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอด์นต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 360 ชั่วโมง

จากผลการทดลอง พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้สูงสุด เท่ากับ 21.55±0.58 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 216 ชั่วโมงของการหมัก คิดเป็นอัตราการการผลิตกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 0.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณกรดแอซีติก เท่ากับ 8.29±0.85 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนปริมาณกรดโพรพิโอนิกต่อปริมาณกรดแอซีติก (P/A) เท่ากับ 2.60 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเท่ากับ 18.65±0.68 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 58.66 และค่าความ-กรดเป็นด่างเท่ากับ 4.91 ในกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกนี้จะพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมีการเจริญสูงสุด เท่ากับ 11.22 LogCFU ที่เวลา 216 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.12 เซลล์แบคทีเรียจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงต้นของการหมัก (log phase) จนถึงชั่วโมงที่ 120 ชั่วโมง และหลังจากนั้นเซลล์แบคทีเรียก็มีการเจริญเพียงเล็กหรือแทบจะไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (stationary phase) จนสิ้นสุดระยะการหมัก จะเห็นได้ว่าซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงต้นของการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 120 ชั่วโมง และหลังจาก 168 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงเพียงเล็กน้อย และในขณะเดียวกันค่าความเป็นกรด-ด่างก็ลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นกัน สำหรับปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขึ้น จะพบว่ามีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ชั่วโมงถึงชั่วโมงที่ 216 ชั่วโมงของการหมัก หลังจากนั้นมีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก ในขณะที่ปริมาณกรดแอซีติกมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเช่นเดียวกับปริมาณกรดโพรพิโอนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการหมักจากเซลล์อิสระของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (●คือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร), o คือ ปริมาณกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร), ▼คือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร), ■ คือ ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์, ♦ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง)

4.5.2 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา

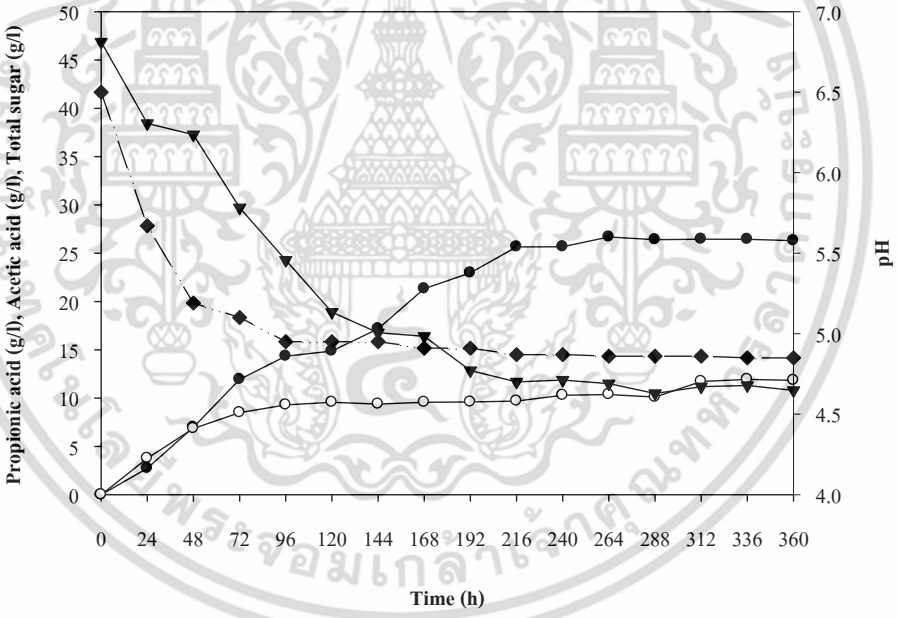
ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเซลล์แบคทีเรีย *P. acidipropionici* TISTR 422 แบบเซลล์อิสระที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะและความเข้มข้นที่เหมาะสม กำหนดค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอด์นต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 360 ชั่วโมง

แบคทีเรียจะค่อยผลิตกรดโพรพิโอนิก และสามารถตรวจวัดได้หลังจากเริ่มหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีแนวโน้มสูงขึ้น จนถึงชั่วโมงที่ 216 ของการหมักและเริ่มคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก สำหรับกรดแอซีติกนั้นเริ่มผลิตและตรวจวัดได้เมื่อเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการหมักเช่นกัน จากนั้นเริ่มผลิตมากขึ้นจนคงที่หลังจากเวลา 96 ชั่วโมงของการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพรพิโอนิก และสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 216 ของการหมัก และเริ่มคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเท่ากับ 10.79±1.05 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 76.98

จากผลการทดลองผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเท่ากับ 26.68±0.07 กรัมต่อลิตร ในช่วงโมงที่ 264 ของการหมัก คิดเป็นอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณกรดแอซีติก 10.36±0.15 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนปริมาณกรดโพรพิโอนิกต่อปริมาณกรดแอซีติก (P/A) เท่ากับ 2.58 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเท่ากับ 11.68±2.41 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 75.07±5.14 และค่าความ-กรดเป็นด่างเท่ากับ 4.87 แสดงดังรูปที่ 4.13 แต่เมื่อพิจารณาปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขึ้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ระหว่างกันของระยะเวลาในการหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 216 (25.65±0.72 กรัมต่อลิตร) จนถึงชั่วโมงที่ 360 (26.30±1.94 กรัมต่อลิตร) เมื่อเทียบกับการผลิตในช่วงโมงที่สูงที่สุด



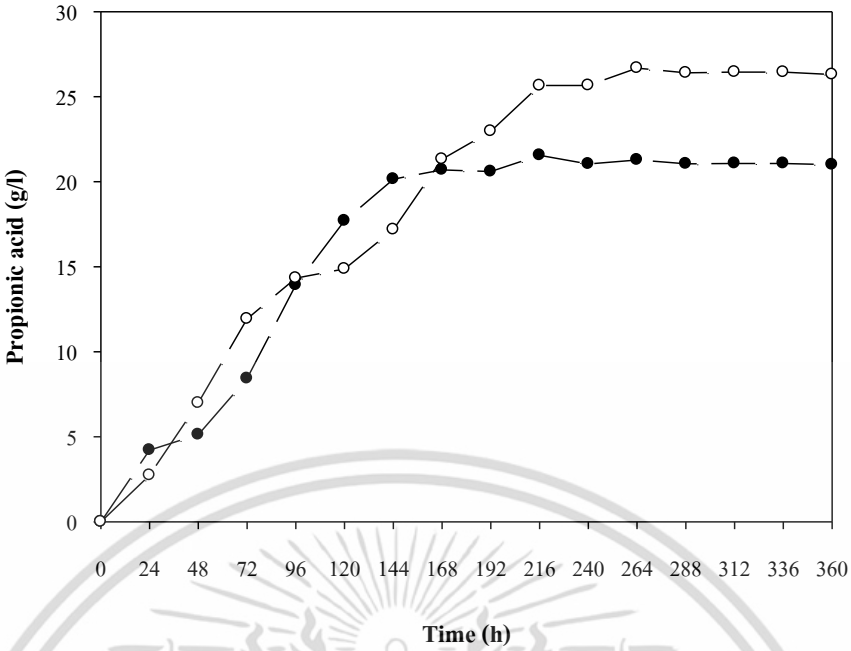
รูปที่ 4.13 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการหมักจากเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (● คือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร), o คือ ปริมาณกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร), ▼ คือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร), ♦ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการหมักด้วยเซลล์อิสระ (รูปที่ 4.14) เชื้อแบคทีเรียเริ่มผลิตกรดโพรพิโอนิกตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก โดยกรดเพิ่มขึ้นจนสูงสุด 21.55±0.58 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 แต่เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าจากชั่วโมงที่ 144 ถึงชั่วโมงที่ 360 ของการหมักปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับการผลิตในช่วงโมงที่สูงที่สุด นอกจากนี้ในช่วงระยะการหมัก พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่ามีค่าลดลงอย่างรวดเร็วที่ชั่วโมง 24 ถึงชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 360

เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติที่เวลา 216 ชั่วโมง สำหรับการหมักด้วยเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาและเซลล์อิสระ พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สูงที่สุดจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (25.65±0.72 กรัมต่อลิตร) และแบบเซลล์อิสระ (21.55±0.58 กรัมต่อลิตร) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ 0.029) อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกของทั้งเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (0.12±0.003 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) และเซลล์อิสระ (0.10±0.003 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ 0.021) ในการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (2.19±0.05 กรัมโพรพิโอนิกต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด) และเซลล์อิสระ (1.16±0.03 กรัมโพรพิโอนิกต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ 0.002) และร้อยละน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (75.07±5.14) และเซลล์อิสระ (58.65±1.12) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ 0.045) ดังตารางที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 แบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (o คือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิกของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (กรัมต่อลิตร), ● คือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิกของเซลล์อิสระ (กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.10 ค่า *P*-value ของการเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 แบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้วิธี *t*-test ที่เวลา 216 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลผลิต (กรัมโพรพิโอนิกต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด)	น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ (ร้อยละ)
เซลล์อิสระ	21.55±0.58	0.10±0.003	1.16±0.03	58.65±1.12
เซลล์ตรึง	25.65±0.72	0.12±0.003	2.19±0.05	75.07±5.14
P-value	.029*	.021*	.002*	.045*

หมายเหตุ: * หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึงแม้ว่าการหมักโดยใช้เซลล์อิสระจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกที่สูงและใช้เวลาหมักที่เร็วกว่า (144 ชั่วโมง) การหมักโดยใช้เซลล์ตรึง (216 ชั่วโมง) ดังรูปที่ 4.14 เนื่องจากกรดโพรพิโอนิกเป็นสารปฐมภูมิ (primary metabolite) ซึ่งเชื้อจะผลิตและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ในระหว่างที่เชื้อมีการเจริญ ซึ่งนอกจากผลิตกรดโพรพิโอนิก เชื้อจุลินทรีย์ก็ยังสามารถผลิตกรดแอซีติกออกมาด้วย และเมื่อปริมาณกรดเพิ่มสูงขึ้นจึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ เมื่อเกิดการยับยั้งการเจริญก็จะยับยั้งการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยเช่นกัน (Zhu และคณะ, 2010) จึงไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงซ้ำเพื่อผลิตกรดได้ ซึ่งเป็นข้อเสียของการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ ในขณะที่การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้วัสดุห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเอาไว้นั้น ทำให้เซลล์ไม่สัมผัสกับอาหารโดยตรง จึงส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโต มีชีวิตอยู่รอดยาวนานขึ้น และผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงขึ้น ดังนั้นการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้วัสดุตรึงเซลล์จึงให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ates และคณะ, 2002 ที่กล่าวไว้ว่าแอลจิเนตที่ห่อหุ้มเซลล์จะทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากสภาวะความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เซลล์ตรึงมีความคงตัวมากกว่าเซลล์อิสระ อีกทั้งเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ที่ใช้ในการทดลองนี้เจริญในสภาวะไร้อากาศ การห่อหุ้มด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาจึงช่วยส่งเสริมให้เชื้ออยู่ในสภาวะไร้อากาศมากขึ้น โดยความหนาแน่นของออกซิเจนภายในเม็ดเจลจะมีค่าน้อยกว่าออกซิเจนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้เซลล์ตรึงมีการเจริญและผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงกว่าเซลล์อิสระ (Champagne และคณะ, 1989) งานวิจัยของ Czaczyk และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการตรึงเซลล์เชื้อ *Propionibacterium* sp. พบว่าเซลล์อิสระจะใช้เวลาในการผลิตกรดโพรพิโอนิกเป็นเวลา 6-8 วัน แต่เมื่อใช้การหมักโดยวิธีการตรึงเซลล์จะใช้เวลานานกว่า เป็นเวลา 10-12 วัน แต่อย่างไรก็ตามถึงจะใช้เวลานานก็ยังสามารถให้ผลผลิตที่สูง

4.6 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

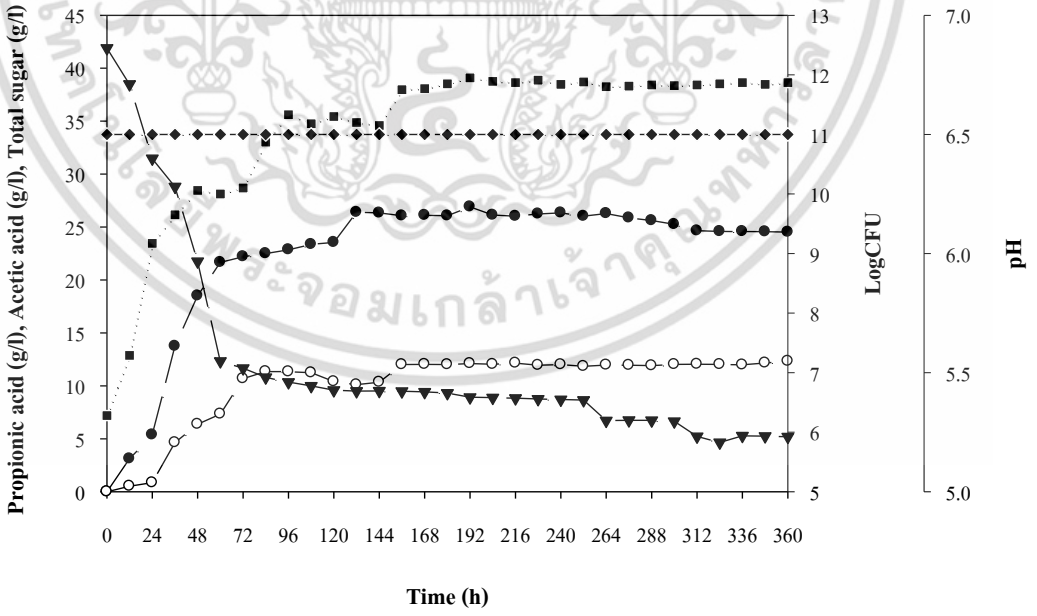
4.6.1 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ

ในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 แบบเซลล์อิสระ โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะและความเข้มข้นที่เหมาะสม ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 3,500 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอด์นต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะดังนี้ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียม-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ อัตราการกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที ในสภาวะที่ไม่มีการเติมอากาศในถังหมัก

จากผลการทดลอง พบว่าที่เวลา 192 ชั่วโมง ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเท่ากับ 26.90±0.66 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกคิดเป็น 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณกรดแอซีติก 12.10±0.72 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนปริมาณกรดโพรพิโอนิกต่อปริมาณกรดแอซีติก (P/A) เท่ากับ 2.22 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ เท่ากับ 8.92±0.55 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 78.71 จากรูป 4.15 พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 60 ของการหมัก หลังจากนั้นมีการเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 132 และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 360 จึงสามารถสรุปได้ว่าระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก อยู่ในช่วง 132-360 ชั่วโมงจะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกดีที่สุด ในขณะที่ปริมาณกรดแอซีติกมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเช่นเดียวกับปริมาณกรดโพรพิโอนิก ช่วงระยะการหมัก พบว่าจำนวนเซลล์จุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มขึ้นโดยจำนวนเซลล์จุลินทรีย์สูงสุด เท่ากับ 11.95 LogCFU ที่เวลา 192 ชั่วโมง และจำนวนเซลล์จุลินทรีย์คงที่หลังจาก 156 ชั่วโมงของการหมักเป็นต้นไป สอดคล้องน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงต่อเนื่องตลอดการทดลอง ซึ่งปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ลดลงอย่างรวดเร็วใน 60 ชั่วโมงแรกของการหมัก และการใช้น้ำตาลเริ่มน้อยลงในช่วง 72 ถึง ชั่วโมงที่ 252 ของการหมัก อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเท่ากับ 5.9 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 87.61 (ดังรูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.15 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการหมักจากเซลล์อิสระของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (●คือ ปริมาณกรด โพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร), O คือ ปริมาณกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร), ▼ คือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร), ■ คือ ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์, ♦ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง)

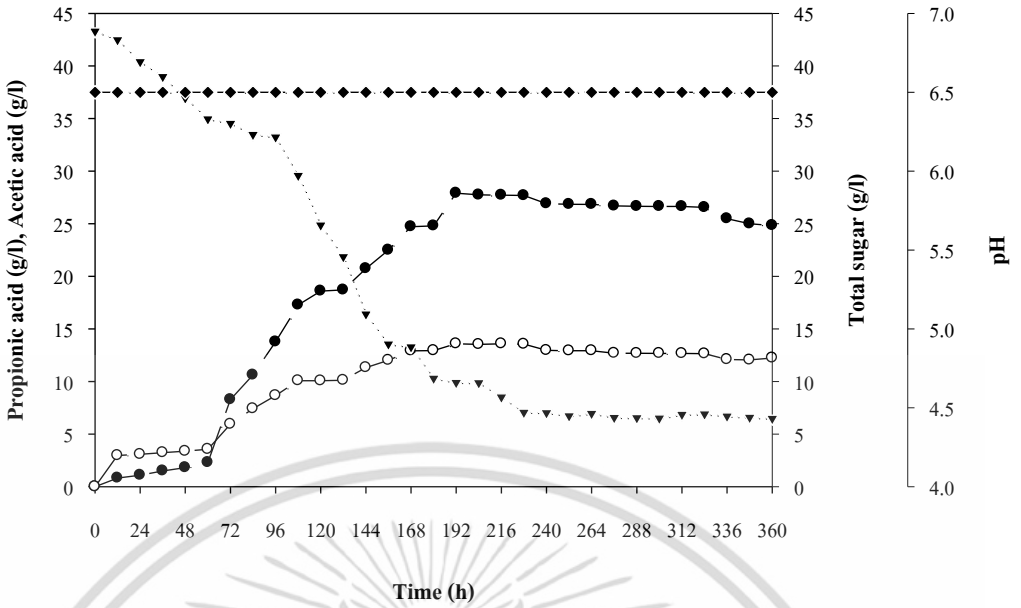
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา

ในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา ร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะและความเข้มข้นที่เหมาะสม ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 3,500 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอด์นต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงที่สภาวะดังนี้ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ อัตราการกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที ในสภาวะที่ไม่มีการเติมอากาศในถังหมัก

จากผลการทดลอง พบว่าที่เวลา 192 ชั่วโมง ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเท่ากับ 27.91±0.41 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกคิดเป็น 0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณกรดแอซีติก 13.59±0.69 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนปริมาณกรดโพรพิโอนิกต่อปริมาณกรดแอซีติก (P/A) เท่ากับ 2.05 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ เท่ากับ 9.89±1.17 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 77.16 จากรูป 4.16 พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 จนถึงชั่วโมงที่ 168 ชั่วโมง โดยใน 60 ชั่วโมงแรกของการหมักเชื้อสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เล็กน้อย และหลังจากชั่วโมงที่ 72 เป็นต้นไป เชื้อผลิตกรดเพิ่มอย่างต่อเนื่อง และเริ่มคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 240 เป็นต้นไป ในขณะที่ปริมาณกรดแอซีติกมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเรื่อยๆ เช่นเดียวกับปริมาณกรดโพรพิโอนิกจนกระทั่งเริ่มคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 216 ของการหมัก เมื่อพิจารณาถึงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 96 ชั่วโมงแรกของการหมัก และลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 168 หลังจากนั้นมีการลดลงอย่างช้าๆต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 360 ของการหมัก ทั้งนี้น่าจะสอดคล้องกับระยะการเจริญของเซลล์แบคทีเรียในแต่ละช่วง คือ ช่วงระยะพักตัว ช่วงแบ่งตัวทวีคูณ และช่วงระยะที่เซลล์คงตัว อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการหมักมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเท่ากับ 6.48±0.12 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 85.04

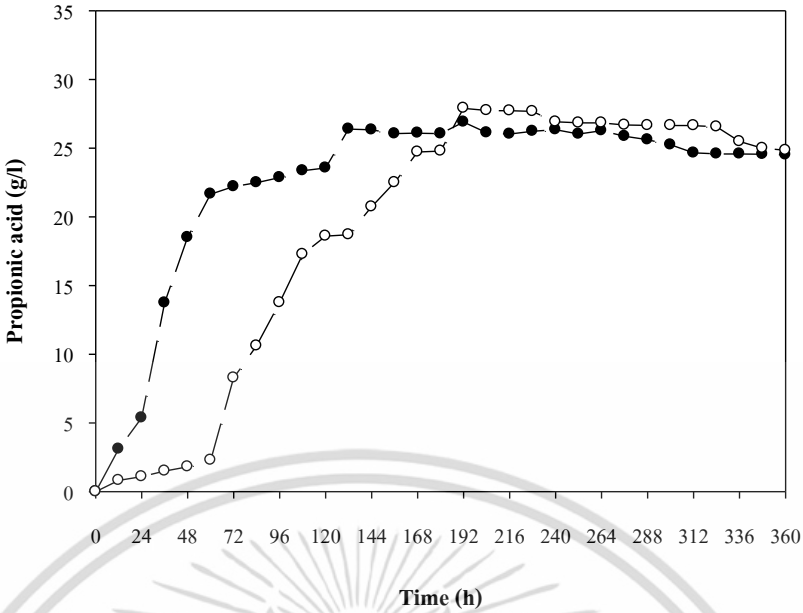
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการหมักจากเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (● คือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร), o คือ ปริมาณกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร), ▼ คือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร), คือ ♦ ค่าความเป็นกรด-ด่าง)

รูปที่ 4.17 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาและเซลล์อิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่เชื้อผลิตกรดโพรพิโอนิกมีแนวโน้มสูงขึ้น เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติที่เวลา 192 ชั่วโมง สำหรับการหมักด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาและเซลล์อิสระ พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (27.91±0.41 กรัมต่อลิตร) และเซลล์อิสระ (26.90±0.66 กรัมต่อลิตร) พบว่าไม่แตกต่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ 0.121) ในการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาให้อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (0.15±0.002 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) และเซลล์อิสระ (0.15±0.002 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ 0.150) ในการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาให้ผลผลิต (2.82±0.42 กรัมโพรพิโอนิกต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป) และเซลล์อิสระ (3.02±0.72 กรัมโพรพิโอนิกต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป) พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ 0.450) และร้อยละน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (77.16±2.69) และเซลล์อิสระที่มีร้อยละน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ (78.71±1.31) พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P เท่ากับ 0.488) ดังตารางที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 แบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (O คือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิกของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (กรัมต่อลิตร), ● คือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิกของเซลล์อิสระ (กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.11 ค่า *P*-value ของการเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้วิธี *t*-test ที่เวลา 192 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	**ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)**	**อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)**	**ผลผลิต (กรัมโพรพิโอนิกต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด)**	**น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ (ร้อยละ)**
เซลล์อิสระ	26.90±0.66	0.14±0.003	3.02±0.72	78.71±1.31
เซลล์ตรึง	27.91±0.41	0.15±0.002	2.82±0.42	77.16±2.69
P-value	.121**	.150**	.450**	.488**

หมายเหตุ: ** หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบการหมักจากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา พบว่าเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในถังหมักจะให้ปริมาณปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการหมักจากเซลล์อิสระ แต่การหมักในเซลล์ตรึงมีข้อดี คือ สามารถนำเซลล์กลับไปใช้ในการหมักได้โดยไม่ต้องเตรียมหัวเชื้อใหม่และการหมักด้วยเซลล์ตรึงยังมีผลดีต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยการเก็บเกี่ยวผลผลิตจากการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงสามารถทำได้ง่ายและสะดวกกว่าการเก็บเกี่ยวผลผลิตจากการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตจากน้ำหมักได้โดยตรง เนื่องจากไม่มีเซลล์เจริญในน้ำหมัก ข้อดีนี้จะส่งผลดีในด้านการลดต้นทุนในการผลิต ทำให้การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์ตรึงนี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไป อีกทั้งเชื้อ *P. acidipropionici* ที่ใช้ในการทดลองนี้เจริญในสภาวะไร้อากาศ การตรึงเซลล์จึงช่วยส่งเสริมให้เชื้ออยู่ในสภาวะไร้อากาศได้ดียิ่งขึ้น และผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* CGMCC 1.2230 โดยการตรึงเซลล์ในถังหมักชนิด fibrous bed bioreactor (FBB) โดยทำการหมักแบบ repeat batch ได้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเป็น 22.9 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการผลิตแบบเซลล์อิสระประมาณร้อยละ 25 ที่ได้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกเป็น 18.3 กรัมต่อลิตร และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Suwannakham และ Yang (2005) ที่ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 เปรียบเทียบระหว่างการใช้เซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักแบบ fibrous bed โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักแบบ fibrous bed ให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 71.8±0.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระถึงร้อยละ 20-59 และงานวิจัยของ Feng และคณะ (2010) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการหมักแบบเซลล์อิสระของเชื้อ *P. freudenreichii* CCTCCM 207015 เปรียบเทียบกับการหมักแบบตรึงเซลล์โดยถังหมักชนิด multi-point fibrous bed bioreactor (MFB) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการหมักแบบเซลล์อิสระหลังจากทำการหมักไป 120 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 14.58 กรัมต่อลิตร อัตราการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดโพรพิโอนิกเท่ากับร้อยละ 36.45 และอัตราการผลิต 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สำหรับการหมักแบบตรึงเซลล์ด้วยถังหมัก MFB พบว่าให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเป็น 20.41 กรัมต่อลิตรที่เวลา 60 ชั่วโมง อัตราการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดโพรพิโอนิกเท่ากับร้อยละ 51.02 และอัตราการผลิต 0.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการหมักชนิด MFB มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากกว่าการหมักแบบเซลล์อิสระ โดยสามารถย่นระยะเวลาการหมักได้ถึง 2 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และ ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ PBD พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล ยีสต์ออโตไลเสท สารสกัดยีสต์ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกอย่างมีนัยสำคัญ มีค่า *P* เท่ากับ 0.0011, 0.0430 และ 0.0259 ตามลำดับ ในขณะที่ ทริปติกซอยบรอท ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไม่มีนัยสำคัญต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก มีค่า *P* เท่ากับ 0.2206, 0.8700 และ 0.6829 ตามลำดับ และจากการทดลองนี้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับร้อยละ 86.39 ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ค่า ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจแบบจำลอง (Adj-R^2) เท่ากับร้อยละ 74.72 เป็นการยืนยันว่าการออกแบบการทดลองนี้สามารถทำนายการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้อย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นจึงนำปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PBD จะถูกนำไปศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยการใช้โปรแกรมการออกแบบการทดลองพื้นที่ผิวตอบสนอง(RSM) ด้วยการออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) ซึ่งสามารถสร้างสมการพหุนามกำลังสอง (quadratic equation) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญและค่าผลิตกรดโพรพิโอนิก (response; *Y*) ดังสมการที่ 5.1

$$\text{กรดโพรพิโอนิก} = 26.10 + 5.53 * X_1 + 0.84 * X_2 + 3.92 * X_3 + 1.82 * X_1 * X_2 + 2.20 * X_1 * X_3 - 1.71 * X_2 * X_3 - 5.19 * X_1^2 - 3.48 * X_2^2 - 2.40 * X_3^2 \quad (5.1)$$

เมื่อ Y คือ ปริมาณกรดโพรพิโอนิก

X_1 คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล

X_2 คือ ยีสต์ออโตไลเสท

X_3 คือ สารสกัดยีสต์

เมื่อตรวจสอบค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับร้อยละ 93.52 ซึ่งถือว่าเป็นค่ายอมรับได้ และค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจแบบจำลอง (Adj-R^2) เท่ากับร้อยละ 87.69 ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามเมื่อได้รับอิทธิพลจากตัวแปรต้น ดังนั้นจึงสามารถทำนายระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 จากสมการพหุนามกำลังสอง คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล 40.87 กรัมต่อลิตร ยีสต์ออโตไลเสท 4.36 กรัมต่อลิตร และสารสกัดยีสต์ 6.90 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เท่ากับ 27.46 กรัมต่อลิตร กรดแอซีติกเท่ากับ 10.93 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมดที่เหลือเท่ากับ 24.62 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 144 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่มในสภาวะนิ่ง

ทำการตรวจสอบยืนยันผลที่ได้จากการออกแบบการทดลองพื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) ด้วยการออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) ในระดับฟลาสก์ โดยใช้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยซึ่งเป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ได้จากการทำนาย (predicted value) ประกอบด้วย ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล 40.87 กรัมต่อลิตร ยีสต์ออโตไลเสท 4.36 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 6.90 กรัมต่อลิตร ทริปติกซอยบรอท 3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิก กรดแอซีติก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ เท่ากับ 25.55±0.58, 8.29±0.85 และ 13.99±0.68 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยผลการตรวจสอบยืนยันผลนี้สอดคล้องกับการทดลองเบื้องต้นและเหมาะสมที่นำไปศึกษาต่อไป

จากนั้นได้ศึกษายี่ห้อของยีสต์สกัดที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก เนื่องจากปริมาณกรดโพรพิโอนิกและการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ได้รับอิทธิพลอย่างมากจากแหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสารสกัดยีสต์ Himedia (India) มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดยีสต์ HIMAX IG20 (Thailand) และสารสกัดยีสต์ 21VP (Thailand) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงปริมาณของกรดโพรพิโอนิก พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่สารสกัดยีสต์ CW-V (Thailand) ให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกน้อยที่สุด ดังนั้นการประเมินทางเศรษฐศาสตร์เบื้องต้น พบว่าในกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกของสารสกัดยีสต์ Himedia (India) มีต้นทุนวัตถุดิบต่อหน่วยที่สูง จึงเลือกสารสกัดยีสต์ HIMAX IG20 (Thailand) ซึ่งพบว่าต้นทุนต่อหน่วยน้อยกว่า ให้ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ และยังมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกที่มีประสิทธิภาพสูงเทียบเท่าสารสกัดยีสต์ทางการค้ายี่ห้อ Himedia (India)

จากนั้นได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (ความเข้มข้นร้อยละ 4 น้ำหนักต่อปริมาตร) และการเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์อิสระ ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า ที่เวลา 216 ชั่วโมง เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมามีศักยภาพในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกได้

และเมื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 โดยการเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์อิสระและการใช้เซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา ภายใต้สภาวะที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสม พบว่า ที่เวลา 192 ชั่วโมง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีหลายงานวิจัยได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยเซลล์ตรึง พบว่าข้อดีของเซลล์ที่ถูกตรึง คือ วัสดุที่ห่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากสภาวะความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เซลล์ตรึงมีความคงตัวมากกว่าเซลล์อิสระ และสามารถนำเซลล์กลับไปใช้ในการหมักได้โดยไม่ต้องเตรียมหัวเชื้อใหม่การหมักด้วยเซลล์ตรึงยังมีผลดีต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตกรดโพรพิโอนิก สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ก็ได้นำสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมามาใช้เป็นวัสดุในการตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก ซึ่งถือได้ว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าของใบกรุงเขมา และช่วยลดต้นทุนการผลิตกรดโพรพิโอนิก และลดการนำเข้าเพกทินจากต่างประเทศได้ ผลของการศึกษานี้น่าจะเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตให้มีต้นทุนต่ำลงและใช้เป็นต้นแบบในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ในระดับอุตสาหกรรม

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มในขั้นตอนการนำเอาสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมามาเป็นวัสดุห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 ถึงแม้ว่ารายงานการวิจัยของ อรทัย (2553) พบว่าสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมายังไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อให้ได้ผลผลิตมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จีราภรณ์ สังข์ผุด. 2549. “การผลิตและคุณสมบัติของเพกทินผงสกัดจากกรุงเขมา.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร (วิทยาศาตร์การอาหาร) มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

ธีรวุฒิ ฤทธิ์เดชา. 2544. “การเลียนแบบกลิ่นรสเนื้อโดยใช้ยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

น้ำทิพย์ นาเชียงใต้ และยุวภา ทัศบุต. 2550. “ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อคุณภาพของเพกทินที่สกัดได้จากใบหมาน้อย.” ปริญญาวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตร วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติจังหวัดสกลนคร.

พิเชษฐ เทบำรุง. 2546. “การหาปริมาณเพกทินและคุณภาพของเพกทินจากใบหมาน้อย.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2555. **การออกแบบการทดลองขั้นสูง**. พิมพ์ครั้งที่ 2 เชียงใหม่: ทรีโอ แอเวอร์ไทซิ่ง แอนด์ มีเดีย จำกัด.

สุขใจ ชูจันทร์. 2554. **การผลิตกรดอินทรีย์จากวัสดุเหลือใช้มวลชีวภาพ**. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุธเนต แซ่เล้า. 2553. “ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะราชิโดนิคจากแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล *A. maritima* TISTR 1715.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สงขลานครินทร์.

สุรนารถ อร่ามเรือง. 2550. “การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุวรรณี ชัยชนะ. 2551. “การปรับปรุงคุณภาพของกิมจิโดยการเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นและความดันสูงยิ่ง.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เสาวนีย์ นิลลักษณ์. 2551. “การศึกษาองค์ประกอบอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรติเอสและไซลาเนสจาก *Bacillus* sp. ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติ.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรทัย วิไลวัลย์. 2553. “การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) เพื่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 ในการผลิตกรดแลกติก.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Altaf, M. D., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Vijay, K.E. and Reddy, G. 2006. “Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen source to replace peptone and yeast extract optimization by RSM. ” **Process Biochem.** 41: 465-472.

AOAC. 2000. Official method of analysis by the association of official analytical chemists. 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Asenjo, J.A. and Andrew, B.A. 1990. Enzymatic cell lysis for product release. In Asenjo, J.A. (ed.). Separation process in biotechnology. New York: Marcell Dekker. edd. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

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

Balamurugan, K., Dasu, V.V. and Panda, T. 1999. “Propionic acid production by whole cells of *Propionibacterium acidipropionici*.” **Bioprocess Engineering.** 20: 109-116.

Bekatorou, A., Psarianos, C. and Koutinas, A. A. 2006. “Production of food grade yeasts.” **Food Technol. Biotechnol**. 44(3): 407-415.

Belz, M.C., Mairinger, R. Zannini, E. Ryan, L. A. Cashman, K.D. and Arendt, E.K. 2012. “The effect of sourdough and calcium propionate on the microbial shelf-life of salt reduced bread.” **Applied Microbiology and Biotechnology.** 92(2): 493-501.

Benjelloun, H. Rochex, A. Lecouturier, D. Dechemi, S. and Lebeault, J.M. 2005. “An on-line technique for monitoring propionic acid fermentation.” **Applied Microbiology and Biotechology.** 68: 316-321.

Bories, A., Himmi, E., Jauregui, J.J.A., Pelayo-Ortiz, C. and Gonzales, V.A. 2004. “Glycerol fermentation with *Propionibacteria* and optimization of the production of propionic acid.” **Sci. Aliments**. 24: 121-135.

Boyaval, P. and Corre, C. 1995. “Production of propionic acid. ” **Lait**. 75: 453-461.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Champagnem C.P., Baillargcon-cote, C. and Goulet. 1989. "Whey fermentation by immobilization cell of *Propionibacterium theonii*." **Applied Bacteriology.** 66: 175-184.

Caldwell, D. 2013. **Molasses in feed**. Weastway Trading Corporation, Cedar Lake, IN. 49-56.

Chauhan, K., Trivedi, U. and Patel, K.C. 2007. "Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice." **Bioresource Technology.** 98: 98-103.

Choojun, S. and Yoonproyong, P. 2012. "Improvement of propionic acid production for antifungal activity from whey by calcium alginate immobilization of *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 442." **Agricultural Science and Technology.** A2: 863-872.

Coelho, L.F., Lima, C.J.B.de, Rodovalho, C.M., Bernardo, M.P. and Contiero, J. 2011. "Lactic acid production by new *Lactobacillus plantatum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition." **Brazilian Journal of Chemical Engineering.** 28(01): 27-36.

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.

Coral J., Karp, S.G., Vandenberghe L.P. de S., Parada, J.L., Pandey, A. and Soccol, C.R. 2008. "Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources." **Appl Biochem Biotechnol.** 151: 333-341.

Cotârlet, M. and Bahrim, G.-E. 2012. "Application of Plackett-Burman experimental design to optimize the cold-active alpha amylase biosynthesis by *Psychrotrophic streptomyces* 4 alga." **The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati.** 36(2): 9-19.

Crespo, J.P., Almeide, J.S., Moura, M.J. and Carrondo, M.J.T. 1990. "Modelling of immobilized cell reactor for propionic acid fermentation." **Biotecnology and Bioengineering.** 36: 705-716.

Czaczyk, K., Trojanowska, K. and Albrecht, A. 1995. "Batch production of propionic acid by immobilized *Propionibacterium* sp.." **Folia Microbiol.** 40(3): 337-340.

Dalal, R.K., Akedo, M., Cooney, C.L. and Sinskey, A.J. 1980. "A microbial route for acrylic acid production." **Journal of Biosource Digest.** 2(2): 89-97

Dietz, D. Sabra, W. and Zeng, A.-P. 2013. "Co-cultivation of *Lactobacillus zeae* and *Veillonella criceti* for the production of propionic acid." **AMB Express a Springer Open.** 3: 1-9.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dimova, N.D., Iovkova, Z.S., Brinkova, M. and Godjevargova, Ts.I. 2010. "Production of *Candida* biomass from hydrolysed agricultural biowaste." **Biotechnol and Biotechnol.** EQ. 24(1): 1577-1581.

Dishisha, T., Alvarez, M.T. and Hatti-Kaul, R. 2012. "Batch and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*." **Bioresesource Technology.** 118: 553-562.

Dishisha, T., Stahl, A., Lundmark, S. and Hatti-Kaul, R. 2013. "An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation." **Bioresource Technology.** 135: 504-512.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamiton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." **Analytical Chemistry.** 28: 350-356.

Erten, H. and Tanguler, H. 2006. **The production methods of yeast extract.** Feed info News Service. [Online]. Available: http://www.feedinfo.com.

Feng, X., Chen, F., Xu, H., Wu, B., Li, H., Li, S. and Ouyang, P. 2011. "Green and economical production of propionic acid by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in plant fibrous-bed bioreactor." **Bioresource Technology.** 102: 6141–6146.

Feng, X.-H., Chen, F., Xu, H., Wu, B., Yao, J. Ying, H.-J. Ouyang, P.-K. 2010. "Propionic acid *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in a multi-point fibrous-bed bioreactor." **Bioprocess Biosyst Eng.** DOI 10.1007/s00449-010-0433-7.

Filya, I., Sucu, E. and Karabulut, A..2004. "The effect of *Propionibacterium acidipropionici* with or without *Lactobacillus plantarum* on the fermentation and aerobic stability of wheat sorghum and maize silages." **Applied Microbiology.** 97(9): 818-826.

Gheshlaghi, R., Scharer, J.M., Moo-Young, M. and Douglas, P.L. 2008. "Application of statistical design for the optimization of amino acid separation by reverse-phase HPLC." **Analytical Biochemistry**. 383: 93-102.

Goswami, V. and Srivastava, A. K. 2001. "Propionic acid production in an in situ cell retention bioreactor." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 56: 676-680.

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

Gupta, A. and Srivastava, A.K. 2001. "Continuous propionic acid production from cheese whey using in situ spin filter." **Biotechnol. Bioprocess Eng**. 6: 1-5.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Han, L. Feng, J. Zhu, C. and Zhang, X. 2009. “Optimizing cellulose production of *Penicillium warksmanii* F10-2 with response surface methodology.” **African Journal of Biotechnology.** 8(16): 3879-3886.

Haque, M.N., Chowdhury, R., Islam, K.M.S. and Akbar, M. A. 2009. “Propionic acid is an alternative to antibiotics in poultry diet.” **Bang. J. anim. Sci.** 38(1&2): 115- 122.

Himmi, E.H., Bories, A., Boussaid, A., Hassami, L. 2000. “Propionic acidfermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii spp. shermanii*.” **Applied Microbiology and Biotechnology.** 53: 435-440.

Hough, J.S. and Maddox, I.S. 1970. “Yeast autolysis.” **Process Biochem.** 5: 50-52.

Hunter, J.B. and Asenjo, J.A. 1988. “A structured mechanistic model of the kinetic lysis and distruption of yeast cells.” **Biotech. and Bioeng.** 31: 929-943.

Jazwinski, S.M. 1990. **Preparation of extraction from yeast,. In Deutscher, M.P. (ed.). Method in Enzymology**. London: Academic Press.

Kagliwal, L.D., Survase S.A., Singhal, R.S. and Granström, T. 2013. “Wheat flour based propionic acid fermentation: an economic approach.” **Bioresource Technology.** 129: 694-699.

Kelly, M. 1983. **Yeast extract. In Godfrey nad Reichelt (eds.). The application of enzyme in industry**. London: Academic Press.

Kośmider, A., Drożdżńska, A., Blaszka, K., Leja, K. and Czaczyk, K. 2010. “Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* using crude glycerol and whey lactose industrial wastes.” **Pilish Journal of Environmental Studies.** 19(6): 1249-1253.

Kumer, S. and Babu, B.V. 2006. “A brief review on propionic acid: a renewal energy source.” **Proceedings of National conference on environmental conservation**. 459-464. in Environmental Engineering.

Kurita, O., Fujiwara, T. and Yamazaki, E. 2008. “Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid.” **Carbohyd. Polym.** 74: 725-730.

Lazaridou, A, Roukas, T, Biliaderis, C.G. and Vaikousi, H. 2002. “Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation.” **Enzyme and Microbial Technology.** 31: 122-132.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lee, B.-K. and Kim, J.K. 2001. "Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture type." **Aquacultural Engineering.** 25: 111-124.

Liang, Z.-X., Li, L., Li, S., Cai, Y.-H., Yang, S.-T., Wang, J-F. 2012. "Enhanced propionic acid production from Jerusalem artichoke hydrolysate by immobilized *Propionibacterium acidipropionici* in a fibrous-bed bioreactor." **Bioprocess and Biosystems Engineering.** 35(6): 915-921.

Lima, C.J.B. de, Coelho, L.F., Blanco, K.C. and Contiero, J. 2009. "Response surface optimization of D(-)-lactic acid production by *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate an alternative nitrogen source." **Biotechnology.** 8(21): 5842-5846.

Lind, H. 2010. "Antifungal properties of dairy propionibacteria." **Doctoral Thesis**, Swedish University of agricultural Sciences, Uppsala.

Liu, L.C., Prokopakis, K.J. and Asenjo, A.J. 1988. "Optimization of enzymatic lysis of yeast." **Biotech. and Bioeng.** 32: 1113-1127.

Liu, Y., Zhang, Y.-G., Zhang, R.-B., Zhang, F. and Zhu, J. 2011. "Glycerol/glucose co-fermentation: one more proficient process to produce propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici*." **Curr Microbiol**. 62: 152-158.

Liu, Z., Ma, C., Gao, C. and Xu, P. 2012. "Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici*." **Bioresource Technology.** 114: 711-714.

Mabrouk, M., Abou-Zeid, D.-M. and Sabra, W. 2012. "Application of Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for poly (γ-glutamic acid) production in batch fermentation by *Bacillus licheniformis* A13". **African Journal of applied Microbiology Research.** 1(2): 6-18.

Maneeboon, T., Vanichsriratana, W., Pomchaitaward, C. and Kitpreechavanich, V. 2010. "Optimization of lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in 3-L airlift bioreactor using response surface methodology." **Appl Biochem Biotechnol**. 161: 137-146.

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 Letter.** 24: 427-431.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mohammadi, M., Najafpour, G.D., Asadi, M., Rahimnejad, M., Najafpour, S. and Pazouki, M. 2008. "Production of organic acids in an immobilized cell reactor using *Propionibacterium acidi-propionici*." **African Journal of Biotechnology.** 7(18): 3332-3338.

Montgomery, D.C. 1991. **Design and Analysis of Experiments**. 3rd ed. New York: John Willey and Sons.

Morales, J., Choi, J.-S. and Kim, D.-S. 2006. "Production rate of propionic acid in fermentation of cheese whey with enzyme inhibitors." **Environmental Progress.** 25(3): 228-234.

Munawar, R. A., Iefan, M., Nadeem, M., Syed, Q. A. and Siddique, Z.H. 2010. "Biosynthesis of single cell biomass of *Candida utilis* by submerged fermentation." **Pakistan Journal of Science.** 62(1): 1-5.

Myers, R.H. 1995. **Response surface methodology: process and production optimization using designed experiments**. John Wiley and Sons. New York.

Nagodawithana, T.W. 1995. **Yeast extract**. In: Savory flavor. USA.: Esteekay Associates.

Najafpour, G.D. and Shan, C.P. 2003. "Enzymatic hydrolysis of molasses." **Bioresource Technology.** 86: 91-94.

Navratil, M., J. Tkac, J. Svitel, B. Danielsson and E. Sturdik. 2001. "Monitoring of bioconversion of glycerol to dihydroxyacetone with immobilized *Gluconobacter oxydans* cell using thermometric flow injection analysis." **Process Biochem.** 36: 1045-1052.

Olsen, H.S. 1995. **Production of flavor enhancers**. In Jand, R.H., Reed, G., Puhlex, A. and Stadler, P. (eds.). Biotechnology. Vol.9. 2nd ed. Weinhiem.

Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Knill, C.J. and Kosseva, M.R. 2007. "Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L(+) lactic acid production from whey." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 74: 35-42.

Pievteau, P. 1999. "Metabolism of lactate and sugar bu dairy Propionibacteria: a review". **Lait**. 79: 23-41.

Plackett, R.L. and Burman, J.P. 1946. "The design of optimum multifactorial experiments." **Biometrika**. 33(4): 305-325.

Praveen, V. V., Alexander, P. M. and Greg, S. K. 2008. "Low-cost propionate salt as road deicer: evaluation of cheese whey and other media constituents." **World Journal of Microbiol Biotechnol**. 24: 825-832.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Prescott, S.C., Dunn, C.G., 1959. **Industrial Microbiology**. 3th ed. Mc Graw Hill Co, Inc., New York. P. 50.

Prvan, T. and Street, D.J. 2002. "An annotated bibliography of application papers using certain classes of fractional factorial and related designs." **Statistical Planning and Inference.** 106: 245-269.

Quesada-Chanto, A. Afschar, A.S. and Wagner, F. 1994. "Microbial production of propionic acid and vitamin B_{12} using molasses or sugar." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 1: 378-383.

Reed, G. and Nagodawithana, T.W. 1991. **Yeast technology**. 2nd ed. New York: AVI. Publishing.

Reed, G. and Peppler, H.J. 1973. **Yeast technology**. Westport, Connecticut: AVI. Publishing.

Rehm, H.-J. and Reed, G. 1981. **Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes**. Weinheim: Verlag Chemic.

Roberto, M.C. and Mayra, T. 2002. "Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose." **Biotechnol. Lett.** 24: 427-431.

Rogers, P. Chen, J.S. and Zidwick, M.J. 2006. **Organic acid and solvent production**. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E. (eds). The peokaryotes. 3rd ed. New York: Springer.

Rossi, F.M., Moschini, F., Cavanna, G. and Piva, G. 2003. "Rumen gedradation and intestinal digestibility of rumen protected amino acids: comparison between in situ an in vitro data." **Anim Feed Sci. Tech**. 108: 223-229.

Ruhal, R. and Choudhury, B. 2012. "Use of an osmotically sensitive mutant of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for the simultaneous production of organic acid and trehalose from biodesel waste based crude glycerol." **Bioresesource Technology**. 109: 131-139.

Sabra, W., Dietz, D. and Zeng, A.P. 2013. "Substrate-limited co-culture for efficient production of propionic acid from flour hydrolysate." **Appl Microbiol Biotechnol**. 97: 5771-5777.

Saxena, R and Singh, R. 2010. "Statistical optimization of conditions for protease production from *Bacillus* sp. 2010." **Acta Biologica Szegediensis**. 54(2): 135-141.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Smith, A.D. and Holtzapple, M.T. 2011. “Investigation of the optimal carbon-nitrogen ratio and carbohydrate-nutrient blend for mixed-acid batch fermentations.” **Bioresour. Technol.** 102(10): 5976-5987.

Smogrovicova, D. and Domeny, Z. 1999. “Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilized yeast.” **Process Biochemistry.** 34: 785-794.

Song, X., Zhang, X., Kuang, C., Zhu, L. and Guo, N. 2007. “Optimization of fermentation parameters for the biomass and DHA production of *Schizochytrium limacinum* OUC88 using response surface methodology.” **Process Biochem.** 42: 1391-1397.

Sugimoto, H. 1974. “Synergistic effect of ethanol and sodium chloride on autolysis of baker’s yeast for preparing food grade yeast extract.” **Food Sci.** 39: 939-942.

Suwannakham, S. 2005. “Metabolic engineering for enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*.” PhD Thesis, The Ohio State University.

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

Tanguler, H. and Erten, H. 2008. “Utilisation of spent brewer’s yeast for yeast extract production by autolysis: the effect of temperature.” **Food and Bioproduct processing**. 86: 317-321.

Tangüler, H. and Erten, H. 2009. “The effect of different temperatures on autolysis of baker’s yeast for the production of yeast extract.” **Turk. J. Agric.** 33: 2009.

Thornton, J. 1992. “Brewer’s yeast extract a survey of the types available to the food processor.” **Food ingredient.** 2: 40-43.

Tittster, R.P. 1940. “The influence of hydrogen ion concentration upon the growth of *Propionibacterium*.” **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.” **Chemits Technology and Biotechnology.** 50: 157-166.

United states sugar corporation. 2013. **Molasses composition**. Molasses and liquid feeds division, P.O. Drawer 1207, Clewiston, Florida 33440.

Van niel, C. B. 1928. “The propionic acid bacteria.” **Milk Food Technology.** 35: 295-447.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wang, Z. and Yang, S.-T. 2003. “Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*.” **Bioresesource Technology.** 137: 116-123.

Wu, Q.-L., Chen, T., Gan, Y., Chen, X. and Zhao, X.-M. 2007. “Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs.” **Appl Microbiol Biotechnol.** 76: 783-794.

Xiao, Z.J., Liu, P.H., Qin, J.Y. and Xu, P. 2007. “Statistical optimization of medium component for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate.” **Appl Microbiol Biotechnol.** 74: 61-68.

Xu, Z., Shi, Z. and Jiang, L. 2011. **Acetic and propionic acids**. In: Moo-Young, M. (ed), Comprehensive biotechnology, 2nd ed, Vol 3. Boston: Elsevier.

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

Zhang, A. and Yang, S.-T. 2009a. “Engineering *Propionibacterium acidipropionici* for enhanced propionic acid tolerance and fermentation.” **Biotechnology and Bioengineering.** 104(4): 766-773.

Zhang, A. and Yang, S.T. 2009b. “Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*.” **Process Biochemistry**. 44: 1346-1351.

Zhu, L., Wei, P., Caim J., Zhu, X., Wang, Z., Huang, L. and Xu, Z. 2012. “Improving the productivity of propionic acid with FBB-immobilized cells of an adapted acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici*.” **Bioresource Technology**. 112: 248-253.

Zhu, Y., Li, J., Tan, M., Liu, L., Jiang, L., Sun, J., Lee, P., Du, G. and Chen. J. 2010. “Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source.” **Bioresource Technology**. 101(22): 8902-8906.

[Online] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma aldrich/structure3/168 /mfcd00146341.eps /_jcr_content/renditions/medium.png

[Online] http://www.pnas.org/content/104/25/10631/F4.large.jpg

[Online] www.thaicattle.com/.../plant/kamoun.jpg

[Online] http://www.omicsonline.org/2155-6199/images/2155-6199-2-121-g007.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว de Man Rogosa Sharpe (MRS broth) ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (beef extract)	10.00	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5.00	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10.00	กรัมต่อลิตร
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20.00	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1.00	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.00	กรัมต่อลิตร
โซเดียมแอซีเทต (CH_3COONa)	5.00	กรัมต่อลิตร
ไตรแอมโมเนียมซิเตรต	2.00	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.20	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.20	กรัมต่อลิตร

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารแข็ง de Man Rogosa Sharpe (MRS agar) ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (beef extract)	10.00	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5.00	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (peptone)	10.00	กรัมต่อลิตร
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20.00	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1.00	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.00	กรัมต่อลิตร
โซเดียมแอซีเทต (CH_3COONa)	5.00	กรัมต่อลิตร
ไตรแอมโมเนียมซิเตรต	2.00	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.20	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.20	กรัมต่อลิตร
วุ้น (agar)	15.00	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 6.5 จากนั้นจึงเติมวุ้นลงไป ให้ความร้อนและคนจนวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู่นึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมกากน้ำตาล (ดัดแปลงจาก Lazaridou และคณะ, 2002; Lee และ Kim, 2001; Xiao, และคณะ, 2007; Coelho และคณะ, 2011)

ทำการปรับสภาพกากน้ำตาลโดยนำกากน้ำตาลมาทำการเจือจาง เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 20 เพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 3.0 จากนั้นปิดปากภาชนะและนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 × g เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 รอบ เก็บเฉพาะส่วนใส นำมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 6.5 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 10 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นตามระดับความเข้มข้นที่จะทำการศึกษา จากนั้นจึงนำไปใช้ทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและการนับจำนวนโคโลนีโดยวิธี Total plate count

(AOAC, 2000)

1.1 วิธีการเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 0.85 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1ลิตร

1.2 วิธีการนับจำนวนโคโลนี

1. ดูดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ

2. ดูดตัวอย่างแต่ละความเจือจางที่เหมาะสมใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว จานละ 1 มิลลิลิตร

3. นำอาหารแข็ง MRS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วที่มีอุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 มิลลิลิตร

4. ทำการวนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ 4-5 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในวุ้นแข็งตัว จากนั้นคว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

5. นับจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกเฉพาะระดับความเจือจางที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี

6. คำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อมิลลิลิตร)

CFU ต่อมิลลิลิตร = จำนวนโคโลนีที่นับได้ × ส่วนกลับของ Dilution factor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dubois, 1956)

2.1 อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. คิวเวตแก้ว
3. ปิเปต

2.2 สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific 1.84)
2. ฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางที่ ข-1 การเจือจางสารละลายกลูโคสด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.0	1.0	0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.0	1.0

2.3 วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอลร้อยละ 5 ลงไป 1 มิลลิลิตร

2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรง จะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการปล่อยลงที่ข้างหลอด

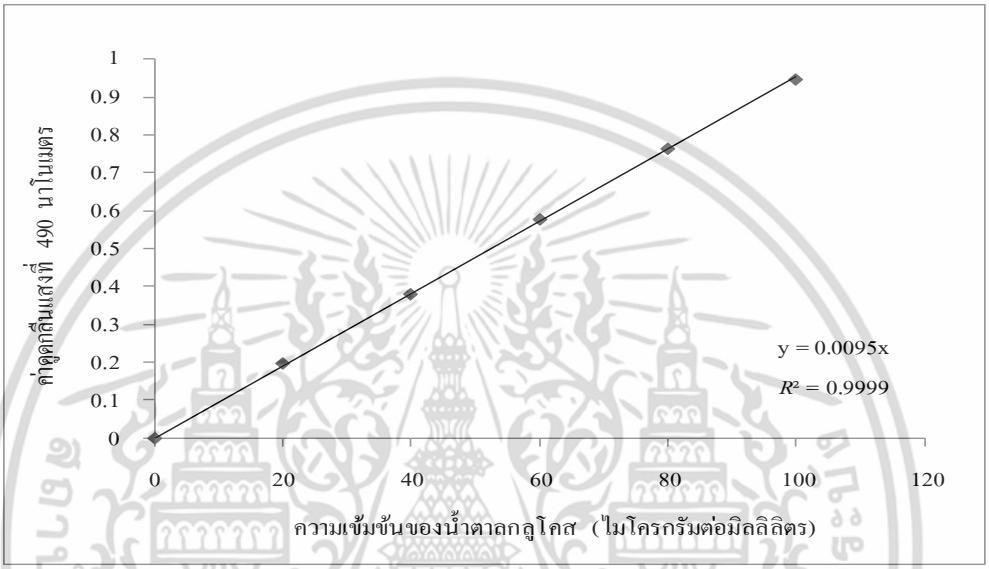
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร}) \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1000}$$



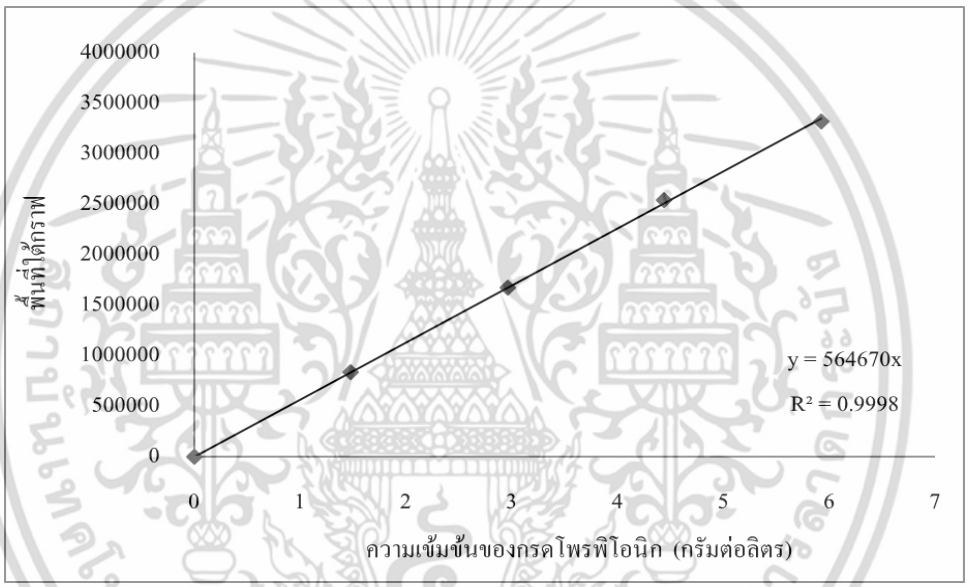
รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอซีติกและปริมาณกรดโพรพิโอนิกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (อรทัย, 2553)

3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดโพรพิโอนิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกด้วย HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดโพรพิโอนิกโดยคำนวณความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกมาตรฐานที่มีหน่วยมิลลิโมลาร์เป็นหน่วยกรัมต่อลิตร แสดงกราฟมาตรฐานของกรดโพรพิโอนิกดังรูปที่ ข-2

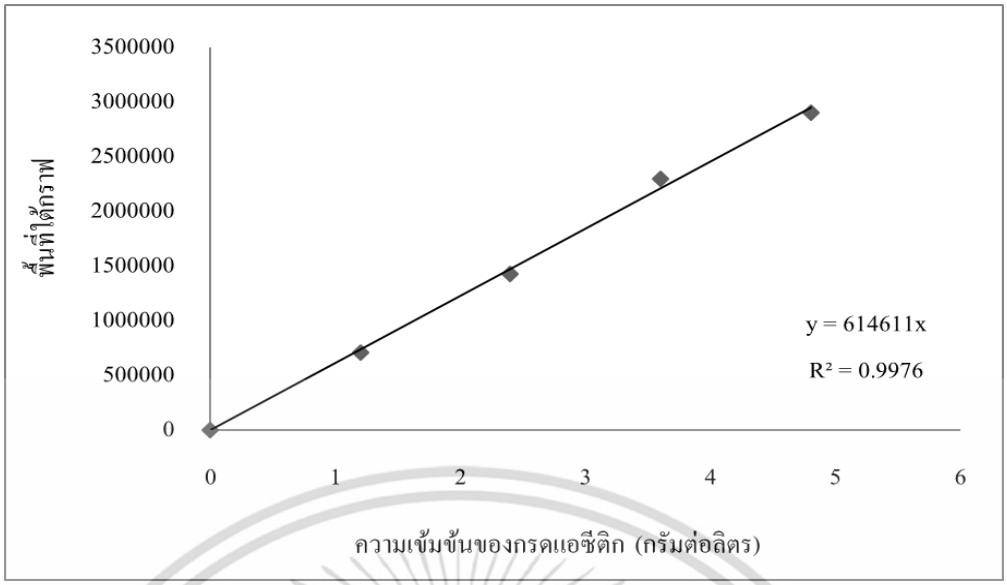


รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐานกรดโพรพิโอนิก

3.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแอซีติก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอซีติกความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแอซีติกด้วย HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดแอซีติกโดยคำนวณความเข้มข้นของกรดแอซีติกมาตรฐานที่มีหน่วยมิลลิโมลาร์เป็นหน่วยกรัมต่อลิตร แสดงกราฟมาตรฐานของกรดแอซีติกดังรูปที่ ข-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐานกรดแอซีติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (ดัดแปลงจาก Tangüler และ Erten , 2009; Munawar และคณะ, 2010)

5.1 สารเคมี

5.1.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4 conc.)

5.1.2 สารผสมคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต และโพแทสเซียมซัลเฟต

5.1.3 กรดบอริก

5.1.4 กรดไฮโดรคลอริก

5.1.5 เมทิลเรด

5.1.6 บรอมครีซอลกรีน

5.2 วิธีการ

ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หนัก 2 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยสำหรับวิเคราะห์โปรตีน เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 30 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการย่อยตัวอย่าง เติมสารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต และโพแทสเซียมซัลเฟต เพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยา ย่อยที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือจนกว่าสารละลายจะใส ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปกลั่นโดยใช้เครื่องกลั่น และใช้กรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนัก ต่อ ปริมาตร) เป็นตัวดักจับก๊าซแอมโมเนีย จากนั้นนำกรดบอริกที่มีก๊าซแอมโมเนียมาไตเตรทด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยใช้อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง เมทิลเรดและบรอมครีซอลกรีน บันทึกปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทแล้วนำค่าไปคำนวณปริมาณไนโตรเจนเป็นหน่วยร้อยละ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{0.0014 \times A \times (B-C) \times 100}{0.1 \times D}$$

A = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรท

B = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

C = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทกับแบลงค์ (Blank)

D = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้

จากนั้นนำปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ) ที่ได้ไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) จากสูตร

ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) = ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ) × ค่าแฟกเตอร์

ค่าแฟกเตอร์ที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนของสัปปะรดเท่ากับ 6.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (PBD)

ตารางที่ ค-1 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร) โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)							
	0	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**	**168**
1	0.00±0.00	0.00±0.00	3.93±0.79	6.74±0.42	9.54±0.05	10.85±0.83	12.17±1.72	11.89±0.02
2	0.00±0.00	0.00±0.00	1.67±0.91	3.56±0.93	5.44±0.95	6.70±0.47	7.96±0.00	6.78±0.46
3	0.00±0.00	0.00±0.00	10.97±0.55	13.93±0.87	16.88±1.19	17.57±0.06	17.68±0.89	16.05±0.26
4	0.00±0.00	0.00±0.00	7.40±1.06	8.40±0.57	9.39±0.07	8.64±0.92	7.90±1.91	7.42±0.62
5	0.00±0.00	0.00±0.00	4.69±0.26	6.89±1.64	9.10±3.01	10.59±5.83	10.56±0.88	12.04±4.27
6	0.00±0.00	0.00±0.00	9.24±4.80	9.74±2.44	10.23±0.07	11.39±0.61	12.56±1.30	11.09±0.51
7	0.00±0.00	3.14±1.03	7.33±1.00	8.02±1.34	8.70±1.68	7.25±1.11	0.79±0.53	7.52±0.63
8	0.00±0.00	0.02±2.09	7.29±2.46	8.55±2.77	9.81±3.08	8.20±1.39	6.58±0.30	8.47±0.17
9	0.00±0.00	0.00±0.00	1.67±0.91	3.56±0.93	5.44±0.95	6.70±0.47	7.96±0.00	6.78±0.46
10	0.00±0.00	0.00±0.00	1.02±1.66	3.24±1.53	5.46±1.40	6.70±1.46	7.95±0.00	9.51±0.71
11	0.00±0.00	0.00±0.00	1.67±0.91	3.56±0.23	5.44±0.95	6.70±0.47	7.96±0.00	6.78±0.46
12	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	6.13±2.02	8.35±1.43	12.07±0.65	9.27±3.72
13	0.00±0.00	0.56±0.32	1.24±0.53	1.41±0.31	1.59±0.10	1.53±0.04	1.47±0.02	2.64±1.54
14	0.00±0.00	0.00±0.00	0.19±1.23	3.27±1.85	6.34±4.94	6.57±2.70	6.79±0.46	7.68±3.11
15	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.72±0.32	6.06±1.35	5.84±0.68	5.63±0.01	10.81±0.94

ตารางที่ ค-1 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร) โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (ต่อ)

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)							
	192	**216**	**240**	**264**	**288**	**312**	**336**	**360**
1	11.62±1.75	10.81±1.76	10.00±1.77	7.61±3.00	5.22±4.23	4.40±4.81	3.57±5.40	0.43±4.85
2	5.59±0.92	2.54±0.07	0.50±0.78	0.96±0.54	1.43±0.30	2.45±0.02	3.47±0.25	8.43±2.44
3	12.65±1.88	10.96±0.88	9.27±0.11	8.71±0.44	8.15±0.99	8.67±1.47	9.19±1.96	8.29±5.11
4	6.94±0.68	6.31±0.37	5.67±0.06	6.33±0.78	6.98±1.49	6.79±1.32	6.60±1.15	8.00±2.12
5	12.01±0.12	9.16±0.12	6.31±0.36	5.03±1.27	3.75±2.18	3.77±5.05	3.80±7.92	1.50±9.42
6	9.61±0.29	11.09±0.79	12.56±1.26	10.64±1.53	8.72±1.77	9.55±0.40	10.38±0.98	9.84±4.64
7	9.25±0.72	9.84±1.99	10.42±3.27	8.79±1.73	7.16±0.20	5.94±1.47	4.72±2.74	6.45±2.89
8	10.35±0.04	8.93±0.29	7.50±0.63	7.40±0.90	7.30±1.18	6.87±0.13	6.44±0.92	7.69±1.30
9	5.59±0.92	2.54±0.07	0.50±0.78	0.96±0.54	1.43±0.30	2.45±0.02	3.47±0.25	8.43±2.44
10	11.08±3.91	9.29±2.21	7.50±0.50	7.04±0.53	6.58±0.57	6.47±0.62	6.36±0.66	7.65±1.74
11	5.59±0.92	2.54±0.07	0.50±0.78	0.96±0.54	1.43±0.30	2.45±0.02	3.47±0.25	8.43±2.44
12	7.98±2.56	7.35±1.36	6.73±0.17	6.71±0.97	6.70±2.12	5.19±0.82	3.69±0.47	0.33±3.58
13	3.82±3.09	9.12±0.99	14.43±1.12	13.49±1.64	12.56±4.41	8.33±2.29	4.10±0.18	5.49±0.57
14	8.56±5.77	9.49±3.26	10.43±0.76	10.24±1.03	10.06±1.30	7.78±3.13	5.50±4.97	6.24±4.38
15	15.99±1.89	11.80±1.41	7.62±0.92	7.12±0.63	6.63±0.33	6.70±0.57	6.78±0.81	8.15±1.31

ตารางที่ ค-2 ปริมาณกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร) โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)							
	0	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**	**168**
1	0.00±0.00	0.00±0.00	2.30±0.16	2.61±0.01	2.92±0.15	2.49±0.08	2.05±0.31	4.96±1.42
2	0.00±0.00	0.00±0.00	1.64±0.11	2.11±0.17	2.59±0.23	4.13±0.05	5.67±0.33	5.74±0.15
3	0.00±0.00	0.00±0.00	8.57±0.58	8.50±0.02	8.43±0.53	8.04±0.49	7.66±0.45	9.32±1.08
4	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±1.70	1.10±1.24	2.26±0.77	3.63±0.18	5.00±0.41	2.96±0.44
5	0.00±0.00	0.00±0.00	2.20±0.29	2.50±0.28	2.81±0.27	2.35±0.25	1.90±0.78	3.54±1.19
6	0.00±0.00	0.00±0.00	6.19±0.53	5.90±0.13	5.61±0.27	6.36±0.12	7.12±0.02	5.86±2.51
7	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.37	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.58±1.65
8	0.00±0.00	0.00±0.00	1.86±3.37	1.97±0.07	2.08±0.08	2.78±0.12	3.49±0.32	2.39±0.15
9	0.00±0.00	0.00±0.00	1.64±0.11	2.11±1.65	2.59±0.23	4.13±0.05	5.67±0.33	5.74±0.15
10	0.00±0.00	0.00±0.00	3.01±0.44	3.47±0.17	3.92±0.24	4.38±0.33	4.83±0.43	3.33±0.13
11	0.00±0.00	0.00±0.00	1.64±0.11	2.11±0.34	2.59±0.23	4.13±0.05	5.67±0.33	5.74±0.15
12	0.00±0.00	0.00±0.00	0.97±0.41	2.78±0.17	4.58±0.60	5.44±0.87	6.29±1.13	6.48±0.79
13	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
14	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.93±0.78	1.17±0.30	1.40±0.19	0.88±0.29
15	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.03±0.27	0.84±0.44

ตารางที่ ค-2 ปริมาณกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร) โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (ต่อ)

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)							
	192	**216**	**240**	**264**	**288**	**312**	**336**	**360**
1	8.87±1.42	8.49±2.54	9.10±1.02	8.88±0.10	7.65±1.22	7.65±1.30	7.19±1.39	5.62±1.26
2	6.81±1.15	5.62±0.63	6.42±0.40	7.15±0.23	7.88±0.86	7.88±0.44	8.63±0.02	6.94±0.02
3	9.99±1.08	6.69±1.71	8.39±0.31	7.74±0.05	7.08±0.21	7.08±0.23	4.14±0.24	7.39±0.22
4	1.91±0.45	0.39±0.48	0.88±0.61	0.42±0.31	1.71±0.01	1.71±0.10	3.35±0.20	3.95±0.18
5	6.18±1.19	3.19±1.60	2.20±0.18	2.96±0.17	3.72±0.53	3.72±0.37	3.57±0.21	2.34±0.19
6	5.60±2.51	6.34±5.04	6.09±0.43	5.79±0.36	5.49±0.28	5.49±0.13	5.99±0.02	11.80±0.02
7	2.47±1.65	4.83±3.12	5.20±1.40	5.00±0.12	4.79±1.17	4.79±1.03	5.51±0.89	5.92±0.81
8	2.29±0.15	0.12±0.02	0.53±1.10	0.98±0.01	1.44±1.09	1.44±0.70	3.89±0.31	4.45±0.28
9	6.81±0.15	5.62±0.63	6.42±0.40	7.15±0.23	7.88±0.86	7.88±0.44	8.63±0.02	6.94±0.02
10	2.82±0.13	0.76±1.16	2.35±0.21	2.31±0.16	2.27±0.11	2.27±0.14	2.82±0.17	3.47±0.16
11	6.81±0.15	5.62±0.63	6.42±0.40	7.15±0.23	7.88±0.86	7.88±0.44	8.63±0.02	6.94±0.02
12	5.66±0.79	4.22±0.45	5.78±0.36	5.07±0.77	5.35±1.19	5.35±3.36	3.96±5.54	9.06±5.03
13	0.00±0.00	5.96±0.12	6.17±0.47	6.17±0.31	6.17±0.14	6.17±0.00	5.02±0.15	5.48±0.13
14	1.36±0.29	0.34±0.40	0.04±0.48	1.37±0.47	2.70±0.45	2.70±0.32	3.84±0.20	4.40±0.18
15	3.71±0.44	1.09±1.15	0.48±0.81	1.86±0.10	3.23±1.01	3.23±0.44	3.15±0.13	1.95±0.11

ตารางที่ ค-3 ปริมาณน้ำทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)							
	0	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**	**168**
1	41.10	34.14	27.18	24.59	22.01	19.83	17.64	17.08
2	28.04	23.43	18.82	14.03	9.23	8.02	6.81	6.89
3	41.10	37.78	34.45	27.11	19.76	18.98	14.19	13.42
4	13.13	8.76	4.39	3.80	3.21	3.10	2.99	2.98
5	41.10	38.57	36.03	29.70	23.36	21.80	20.23	18.28
6	41.10	32.86	24.61	20.92	17.23	15.14	13.04	11.49
7	13.13	12.18	11.23	10.72	10.20	10.09	7.97	7.70
8	13.13	9.13	5.12	4.23	3.34	3.22	3.09	3.01
9	28.04	23.43	18.82	14.03	9.23	8.02	6.81	6.89
10	13.13	7.82	2.51	2.27	2.02	2.49	2.95	2.38
11	28.04	23.43	18.82	14.03	9.23	8.02	6.81	6.89
12	41.10	32.86	24.61	20.92	17.23	15.14	13.04	11.49
13	13.13	9.53	5.92	5.37	4.82	4.57	4.31	3.99
14	41.10	40.49	39.89	37.96	36.03	34.70	33.36	31.80
15	13.13	9.48	5.82	4.61	3.39	3.04	2.68	2.71

ตารางที่ ค-3 ปริมาณน้ำทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (ต่อ)

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)							
	192	**216**	**240**	**264**	**288**	**312**	**336**	**360**
1	16.52	16.35	16.18	15.59	14.99	14.39	13.79	12.95
2	6.98	6.25	5.51	5.38	5.24	5.11	4.97	4.65
3	13.65	13.01	13.37	13.82	12.26	12.70	12.14	12.85
4	2.98	2.99	3.01	2.97	2.93	2.89	2.84	2.81
5	16.33	15.60	14.87	14.76	14.65	14.54	14.42	14.14
6	9.94	9.22	8.50	8.46	8.41	8.37	8.32	8.28
7	7.43	7.28	7.13	6.91	6.68	6.51	6.33	5.81
8	2.93	3.04	3.14	3.07	2.99	2.92	2.85	2.83
9	6.98	6.25	5.51	5.38	5.24	5.11	4.97	4.65
10	1.81	6.25	1.65	1.64	1.63	1.78	1.92	1.90
11	6.98	6.25	5.51	5.38	5.24	5.11	4.97	4.65
12	9.94	9.22	8.50	8.46	8.41	8.37	8.32	8.30
13	3.68	3.03	2.38	2.29	2.19	2.15	2.11	2.09
14	30.23	28.71	27.19	23.78	20.37	19.70	19.03	17.92
15	2.73	2.53	2.33	2.32	2.31	2.52	2.72	2.62

ตารางที่ ค-4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)							
	0	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**	**168**
1	6.50	5.33	5.00	4.85	4.85	4.87	4.89	4.85
2	6.50	5.34	5.10	4.91	4.97	4.98	4.95	5.00
3	6.50	5.20	5.02	4.85	4.86	4.86	4.85	4.90
4	6.50	5.01	4.93	4.89	5.00	4.99	5.02	4.99
5	6.50	5.24	5.04	4.91	4.96	4.97	4.97	4.99
6	6.50	5.43	5.13	4.97	5.02	5.02	5.03	5.00
7	6.50	6.14	5.18	5.02	4.92	4.90	4.98	4.90
8	6.50	5.28	4.94	4.87	4.96	4.98	5.02	5.02
9	6.50	5.34	5.10	4.91	4.97	4.98	4.95	5.00
10	6.50	5.04	4.95	4.92	5.06	5.01	5.12	5.09
11	6.50	5.34	5.10	4.91	4.97	4.98	4.95	5.00
12	6.50	5.43	5.13	4.97	5.02	5.02	5.03	5.00
13	6.50	6.05	5.13	4.87	4.97	4.98	4.98	4.98
14	6.50	6.13	5.23	4.99	4.98	4.98	4.98	4.98
15	6.50	4.90	4.79	4.81	4.84	4.89	4.89	4.97

ตารางที่ ค-4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (ต่อ)

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)							
	192	**216**	**240**	**264**	**288**	**312**	**336**	**360**
1	4.82	4.87	4.90	4.87	4.85	4.86	4.86	4.84
2	5.01	4.96	5.01	5.01	4.98	5.05	5.03	5.06
3	4.89	4.85	4.90	4.89	4.92	4.87	4.92	4.88
4	5.06	5.03	5.08	5.13	5.10	5.14	5.13	5.14
5	4.97	4.93	4.99	4.92	4.94	4.95	4.97	5.01
6	5.02	5.00	5.03	4.98	4.96	4.92	4.99	5.08
7	4.91	4.92	4.93	4.88	4.88	4.87	4.86	4.89
8	5.03	5.03	5.08	5.10	5.10	5.08	5.11	5.09
9	5.01	4.96	5.01	5.01	4.98	5.05	5.03	5.06
10	5.10	5.10	5.15	5.18	5.13	5.19	5.20	5.20
11	5.01	4.96	5.01	5.01	4.98	5.05	5.03	5.06
12	5.02	5.00	5.03	4.98	4.96	4.92	4.99	5.08
13	4.97	4.96	4.96	4.98	4.96	4.97	4.98	4.99
14	4.95	4.96	4.95	4.94	4.92	4.92	4.93	4.93
15	4.99	4.97	5.03	5.01	5.02	5.01	5.06	5.05

2. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

ตารางที่ ค-5 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร) ด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)						
	0	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**
1	0.00±0.00	6.99±0.67	9.79±0.26	11.21±0.11	11.81±0.17	12.05±0.14	12.21±0.80
2	0.00±0.00	8.24±0.13	9.17±0.26	11.58±0.27	14.48±0.23	16.93±0.55	19.85±4.85
3	0.00±0.00	4.36±0.14	5.47±0.46	6.13±0.40	5.98±0.71	5.74±0.17	6.25±1.03
4	0.00±0.00	4.19±0.10	4.37±0.30	5.60±0.40	7.70±0.20	7.67±0.11	8.43±1.24
5	0.00±0.00	10.56±0.16	12.98±0.69	11.63±0.22	11.86±0.18	12.29±0.14	12.62±1.00
6	0.00±0.00	13.23±0.18	19.39±0.18	19.73±0.34	21.51±0.20	24.84±0.37	27.75±1.90
7	0.00±0.00	7.12±0.10	8.55±0.41	8.75±0.27	8.54±0.31	7.15±0.57	5.31±2.10
8	0.00±0.00	14.11±0.58	18.71±0.13	17.92±0.56	20.43±0.34	22.73±0.30	25.13±5.12
9	0.00±0.00	10.23±0.10	12.25±0.18	13.06±0.25	14.60±0.03	16.92±0.69	19.17±0.03
10	0.00±0.00	10.09±0.31	13.80±1.31	14.45±0.21	13.64±0.17	13.67±0.12	14.29±3.45
11	0.00±0.00	15.12±0.65	17.05±0.69	16.29±0.06	17.28±0.51	18.22±0.34	22.89±2.45
12	0.00±0.00	12.35±0.23	14.42±0.62	15.45±0.20	17.91±0.29	19.89±0.12	24.43±0.07
13	0.00±0.00	7.18±0.11	8.31±0.28	7.55±1.14	6.25±0.11	5.64±0.18	0.91±0.01
14	0.00±0.00	8.11±0.09	12.93±2.35	12.72±0.21	13.76±0.18	14.48±0.54	15.12±0.08
15	0.00±0.00	8.94±0.53	10.42±0.50	14.66±0.11	16.66±0.23	19.80±0.32	26.08±0.65
16	0.00±0.00	8.94±0.53	10.42±0.50	14.66±0.11	16.66±0.23	19.80±0.32	26.08±0.65
17	0.00±0.00	8.94±0.53	10.42±0.50	14.66±0.11	16.66±0.23	19.80±0.32	26.08±0.65
18	0.00±0.00	8.94±0.53	10.42±0.50	14.66±0.11	16.66±0.23	19.80±0.32	26.08±0.65
19	0.00±0.00	8.94±0.53	10.42±0.50	14.66±0.11	16.66±0.23	19.80±0.32	26.08±0.65
20	0.00±0.00	8.94±0.53	10.42±0.50	14.66±0.11	16.66±0.23	19.80±0.32	26.08±0.65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-6 ปริมาณกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร) ด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)						
	0	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**
1	0.00±0.00	5.56±0.59	5.99±0.68	6.51±0.27	6.93±0.50	7.36±0.53	7.82±0.33
2	0.00±0.00	10.38±3.42	8.46±3.37	6.59±0.16	7.02±0.61	7.46±0.62	7.91±0.19
3	0.00±0.00	2.69±0.63	2.87±0.55	2.88±0.55	3.10±0.91	3.30±0.90	3.45±0.66
4	0.00±0.00	3.55±0.21	3.47±0.18	3.45±0.15	3.67±0.27	3.90±0.28	4.14±0.17
5	0.00±0.00	6.61±2.16	7.82±2.14	9.01±0.09	9.62±1.13	10.55±1.48	11.48±0.48
6	0.00±0.00	12.70±1.27	13.46±1.30	14.24±0.08	15.19±1.57	16.14±1.57	17.09±0.10
7	0.00±0.00	6.56±0.22	6.83±0.40	7.23±0.41	7.68±0.48	8.17±0.52	8.68±0.50
8	0.00±0.00	12.27±0.78	12.53±0.68	12.60±0.58	13.48±2.04	14.32±2.02	15.12±0.69
9	0.00±0.00	5.61±1.89	6.68±1.87	7.74±0.05	8.26±0.94	8.78±0.94	9.29±0.06
10	0.00±0.00	11.02±0.73	10.40±0.95	9.59±0.60	10.27±1.72	10.90±1.70	11.50±0.72
11	0.00±0.00	14.34±2.15	13.48±1.91	13.00±1.14	13.79±0.69	14.66±0.82	15.60±1.37
12	0.00±0.00	12.71±0.05	12.71±0.05	12.69±0.08	13.54±1.54	14.39±1.54	15.23±0.10
13	0.00±0.00	3.61±1.74	4.29±1.54	4.65±0.97	3.85±0.72	3.33±0.31	2.97±0.32
14	0.00±0.00	4.87±0.69	5.52±0.99	6.44±0.78	6.82±0.39	7.25±0.47	7.73±0.94
15	0.00±0.00	5.65±2.03	6.86±2.06	8.09±0.09	8.62±0.84	9.16±0.85	9.72±0.11
16	0.00±0.00	5.65±2.03	6.86±2.06	8.09±0.09	8.62±0.84	9.16±0.85	9.72±0.11
17	0.00±0.00	5.65±2.03	6.86±2.06	8.09±0.09	8.62±0.84	9.16±0.85	9.72±0.11
18	0.00±0.00	5.65±2.03	6.86±2.06	8.09±0.09	8.62±0.84	9.16±0.85	9.72±0.11
19	0.00±0.00	5.65±2.03	6.86±2.06	8.09±0.09	8.62±0.84	9.16±0.85	9.72±0.11
20	0.00±0.00	5.65±2.03	6.86±2.06	8.09±0.09	8.62±0.84	9.16±0.85	9.72±0.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-7 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)						
	0	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**
1	20.27	19.02	18.43	11.94	5.45	5.15	4.84
2	63.82	60.21	58.02	54.90	51.79	49.12	42.44
3	20.27	19.15	18.43	14.10	9.78	8.64	7.49
4	20.27	19.78	18.43	14.16	9.90	8.36	6.81
5	20.27	19.53	18.43	13.31	8.20	7.57	6.93
6	63.82	60.92	58.02	56.86	55.71	43.20	35.68
7	63.82	61.97	57.23	57.08	56.92	56.03	54.13
8	63.82	60.11	58.02	51.70	45.39	43.72	38.04
9	40.61	38.57	36.92	32.30	27.69	24.26	20.83
10	40.61	38.71	36.92	35.40	33.88	31.45	26.02
11	74.50	69.19	67.73	65.25	62.78	59.76	53.73
12	40.61	28.56	36.92	35.96	35.00	27.63	20.26
13	7.47	7.01	6.68	5.16	3.64	3.46	3.28
14	40.61	38.16	36.92	37.08	37.24	35.85	26.45
15	40.61	38.16	36.92	35.49	24.07	29.59	18.10
16	40.61	38.16	36.92	35.49	24.07	29.59	18.10
17	40.61	38.16	36.92	35.49	24.07	29.59	18.10
18	40.61	38.16	36.92	35.49	24.07	29.59	18.10
19	40.61	38.16	36.92	35.49	24.07	29.59	18.10
20	40.61	38.16	36.92	35.49	24.07	29.59	18.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-8 ค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)						
	0	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**
1	6.50	5.11	5.07	4.85	5.06	4.99	4.87
2	6.50	5.01	5.02	5.02	4.96	4.85	4.98
3	6.50	4.89	4.93	5.10	5.06	4.95	4.98
4	6.50	5.19	4.92	4.94	4.97	5.03	4.89
5	6.50	4.99	5.04	4.77	4.99	4.94	4.90
6	6.50	4.95	5.13	5.09	5.02	4.98	4.98
7	6.50	5.11	5.07	4.85	5.06	4.99	4.98
8	6.50	4.82	4.99	4.94	5.01	5.02	5.01
9	6.50	4.86	4.88	5.08	4.92	4.98	4.99
10	6.50	5.00	5.21	4.94	4.89	5.06	5.02
11	6.50	5.16	4.99	5.00	4.92	4.94	4.90
12	6.50	4.90	4.95	4.93	5.06	5.02	4.98
13	6.50	4.79	4.98	5.06	5.08	4.96	4.98
14	6.50	5.03	5.04	5.08	4.96	4.92	5.00
15	6.50	4.89	5.07	4.85	4.87	4.86	4.86
16	6.50	4.89	4.89	4.88	4.87	4.86	4.86
17	6.50	4.89	4.89	4.88	4.87	4.86	4.86
18	6.50	4.89	4.89	4.88	4.87	4.86	4.86
19	6.50	4.89	4.89	4.88	4.87	4.86	4.86
20	6.50	4.89	4.89	4.88	4.87	4.86	4.86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-9 อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติกด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

การทดลองที่	เวลา (ชั่วโมง)						
	0	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**
1	0.00 : 1	1.26 : 1	1.63 : 1	1.72 : 1	1.70 : 1	1.56 : 1	1.56 : 1
2	0.00 : 1	0.79 : 1	1.09 : 1	1.76 : 1	2.06 : 1	2.51 : 1	2.51 : 1
3	0.00 : 1	1.62 : 1	1.90 : 1	2.13 : 1	1.93 : 1	1.81 : 1	1.81 : 1
4	0.00 : 1	1.18 : 1	1.26 : 1	1.62 : 1	2.10 : 1	2.04 : 1	1.09 : 1
5	0.00 : 1	1.60 : 1	1.66 : 1	1.29 : 1	1.23 : 1	1.10 : 1	1.10 : 1
6	0.00 : 1	1.04 : 1	1.44 : 1	1.38 : 1	1.42 : 1	1.62 : 1	1.62 : 1
7	0.00 : 1	1.08 : 1	1.25 : 1	1.21 : 1	1.11 : 1	0.61 : 1	0.61 : 1
8	0.00 : 1	1.15 : 1	1.49 : 1	1.42 : 1	1.52 : 1	1.66 : 1	1.66 : 1
9	0.00 : 1	1.82 : 1	1.83 : 1	1.69 : 1	1.77 : 1	2.06 : 1	2.06 : 1
10	0.00 : 1	0.92 : 1	1.33 : 1	1.51 : 1	1.33 : 1	1.24 : 1	1.24 : 1
11	0.00 : 1	1.05 : 1	1.26 : 1	1.25 : 1	1.25 : 1	1.47 : 1	1.47 : 1
12	0.00 : 1	0.97 : 1	1.13 : 1	1.22 : 1	1.32 : 1	1.60 : 1	1.60 : 1
13	0.00 : 1	1.99 : 1	1.94 : 1	1.62 : 1	1.62 : 1	0.31 : 1	0.31 : 1
14	0.00 : 1	1.67 : 1	2.34 : 1	1.98 : 1	2.02 : 1	1.96 : 1	1.95 : 1
15	0.00 : 1	1.58 : 1	1.52 : 1	1.81 : 1	1.93 : 1	2.68 : 1	2.68 : 1
16	0.00 : 1	1.58 : 1	1.52 : 1	1.81 : 1	1.93 : 1	2.68 : 1	2.68 : 1
17	0.00 : 1	1.58 : 1	1.52 : 1	1.81 : 1	1.93 : 1	2.68 : 1	2.68 : 1
18	0.00 : 1	1.58 : 1	1.52 : 1	1.81 : 1	1.93 : 1	2.68 : 1	2.68 : 1
19	0.00 : 1	1.58 : 1	1.52 : 1	1.81 : 1	1.93 : 1	2.68 : 1	2.68 : 1
20	0.00 : 1	1.58 : 1	1.52 : 1	1.81 : 1	1.93 : 1	2.68 : 1	2.68 : 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การตรวจสอบยืนยันผล (Validation)

ตารางที่ ค-10 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบอิสระในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	กรดโพรพิโอนิก (g/l)	กรดแอซีติก (g/l)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (g/l)	ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด
0	0.00±0.00	0.00±0.00	41.58±0.00	0.00
24	3.87±0.59	0.06±0.92	38.07±1.32	8.44
48	5.46±0.26	0.62±0.29	32.08±3.89	22.85
72	8.75±1.85	3.20±0.55	28.37±4.75	31.77
108	14.25±0.35	5.12±0.59	23.68±1.07	43.05
120	18.04±0.37	6.64±0.42	21.19±2.24	49.04
144	25.55±0.58	8.29±0.85	13.99±0.68	66.35

ตารางที่ ค-11 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก และผลผลิตกรดโพรพโอนิก โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบอิสระในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (g/l.h)	อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก	ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (g_{PA}/g_{Sugar})
0	6.50	6.80	0.00	0.00 : 1	0.00
24	6.30	7.15	0.16	64.5 : 1	0.10
48	5.21	9.47	0.11	8.81 : 1	0.17
72	5.08	10.99	0.12	2.73 : 1	0.30
108	4.92	11.59	0.13	2.78 : 1	0.59
120	4.90	11.46	0.15	2.72 : 1	0.86
144	4.85	11.38	0.16	3.08 : 1	1.37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 โดยการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

ตารางที่ ค-12 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทิน ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	กรดโพรพิโอนิก (g/l)	กรดแอซีติก (g/l)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (g/l)	ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด
0	0.00±0.00	0.00±0.00	46.86±0.08	0.00
24	2.73±1.04	3.77±0.31	38.43±1.07	18.00
48	6.98±0.98	6.85±0.43	37.27±6.58	20.45
72	11.93±1.94	8.50±0.20	29.71±6.90	36.60
108	14.33±0.90	9.30±0.66	24.28±0.41	48.19
120	14.87±1.51	9.57±0.25	18.89±6.29	59.69
144	17.18±0.86	9.38±0.54	16.77±3.74	64.21
168	21.32±1.27	9.56±0.27	16.39±0.92	65.02
192	22.97±0.40	9.60±0.19	12.85±2.97	72.58
216	25.65±0.72	9.69±0.19	11.68±2.41	75.07
240	25.66±0.74	10.29±1.09	11.87±0.72	74.67
264	26.68±0.07	10.36±0.15	11.50±1.45	75.45
288	26.40±0.15	10.11±0.72	10.48±1.42	77.64
312	26.45±0.56	11.72±0.14	11.18±2.48	76.14
336	26.44±1.03	11.93±0.55	11.31±0.99	75.86
360	26.30±1.94	11.84±0.18	10.79±1.05	76.98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-13 ค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติกและผลผลิตกรดโพรพโอนิกโดยการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทิน ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (g/l.h)	อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก	ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (g_{PA}/g_{Sugar})
0	6.50	0.00	0.00 : 1	0.00
24	5.67	0.11	0.72 : 1	0.07
48	5.19	0.15	1.02 : 1	0.19
72	5.10	0.17	1.40 : 1	0.40
108	4.95	0.15	1.54 : 1	0.59
120	4.95	0.12	1.55 : 1	0.79
144	4.95	0.12	1.83 : 1	1.02
168	4.91	0.13	2.23 : 1	1.30
192	4.91	0.12	2.39 : 1	1.79
216	4.87	0.12	2.65 : 1	2.20
240	4.87	0.11	2.49 : 1	2.16
264	4.86	0.10	2.58 : 1	2.32
288	4.86	0.09	2.61 : 1	2.52
312	4.86	0.08	2.26 : 1	2.37
336	4.85	0.08	2.22 : 1	2.34
360	4.85	0.08	2.22 : 1	2.44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-14 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์อิสระ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	กรดโพรพิโอนิก (g/l)	กรดแอซีติก (g/l)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (g/l)	ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด
0	0.00±0.00	0.00±0.00	45.11±0.00	0.00
24	4.21±0.14	0.40±0.48	38.74±1.09	14.12
48	5.12±0.60	0.95±0.57	32.75±4.98	17.40
72	8.42±1.28	3.53±0.06	29.04±5.72	35.62
108	13.92±0.89	5.45±0.63	24.34±2.14	46.04
120	17.70±0.51	6.97±0.21	20.97±1.73	53.53
144	20.15±0.57	7.19±1.22	19.74±1.40	56.24
168	20.70±0.55	8.17±0.94	19.73±0.45	56.26
192	20.59±0.40	8.07±0.45	18.69±1.47	58.57
216	21.55±0.58	8.29±0.85	18.65±0.68	58.66
240	21.04±0.70	8.00±0.95	18.73±0.55	58.48
264	21.28±0.40	8.13±0.52	18.57±0.18	58.83
288	21.05±0.39	8.00±0.63	17.80±0.24	60.54
312	21.07±0.74	8.00±0.51	18.09±0.42	59.90
336	21.07±0.34	8.01±0.52	17.53±0.57	61.14
360	21.00±0.60	7.97±0.34	17.74±0.12	60.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-15 ค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติกและผลผลิตกรดโพรพโอนิกโดยการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด (LogCFU)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (g/l.h)	อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก	ผลผลิตกรด โพร-พิโอนิก (g_{PA}/g_{Sugar})
0	6.50	6.87±0.01	0.00	0.00 : 1	0.00
24	6.32	8.15±0.26	0.18	10.60 : 1	0.11
48	5.23	8.47±0.06	0.11	5.37 : 1	0.16
72	5.10	9.99±0.28	0.12	2.38 : 1	0.29
108	4.95	10.59±0.05	0.13	2.55 : 1	0.57
120	4.95	11.11±0.04	0.15	2.54 : 1	0.84
144	4.95	11.12±0.07	0.14	2.80 : 1	1.02
168	4.91	11.13±0.07	0.12	2.53 : 1	1.05
192	4.91	11.14±0.03	0.11	2.55 : 1	1.10
216	4.91	11.22±0.07	0.10	2.60 : 1	1.16
240	4.87	11.18±0.17	0.09	2.63 : 1	1.12
264	4.86	11.08±0.04	0.08	2.62 : 1	1.15
288	4.90	11.16±0.24	0.07	2.63 : 1	1.18
312	4.88	10.89±0.16	0.07	2.63 : 1	1.16
336	4.88	10.86±0.12	0.06	2.63 : 1	1.20
360	4.89	10.82±0.08	0.06	2.64 : 1	1.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ ค-16 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์อิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	กรดโพรพิโอนิก (g/l)	กรดแอซีติก (g/l)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (g/l)	ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด
0	0.00±0.00	0.00±0.00	41.90±1.00	0.00
12	3.10±0.24	0.52±0.45	38.49±0.47	8.14
24	5.37±0.74	0.84±0.57	31.47±0.46	24.89
36	13.74±1.25	4.63±0.79	28.81±0.47	31.24
48	18.50±1.21	6.37±2.41	21.75±0.68	48.09
60	21.66±0.53	7.34±2.13	12.32±0.27	70.60
72	22.20±0.87	10.68±1.39	11.65±2.84	72.20
84	22.49±0.73	11.35±0.86	10.79±0.10	74.25
96	22.86±0.59	11.33±2.74	10.34±0.25	75.32
108	23.36±0.74	11.23±0.39	9.99±0.29	76.16
120	23.55±0.68	10.39±1.22	9.58±0.16	77.14
132	26.39±0.44	10.10±1.30	9.49±0.26	77.35
144	26.33±0.58	10.34±0.59	9.52±0.44	77.28
156	26.05±0.55	12.00±1.02	9.48±0.37	77.37
168	26.10±0.22	12.03±0.75	9.42±0.38	77.52
180	26.05±0.39	12.00±0.83	9.32±0.34	77.76
192	26.90±0.66	12.10±0.72	8.92±0.55	78.71
204	26.12±0.46	12.03±0.64	8.88±0.55	78.81
216	26.01±0.12	12.15±0.89	8.83±0.55	78.93
228	26.23±0.32	11.94±1.02	8.75±0.55	79.12
240	26.34±0.43	12.00±1.10	8.70±0.57	79.24
252	26.02±0.59	11.84±1.10	8.65±0.66	79.36
264	26.27±0.47	11.96±1.05	6.70±0.64	84.01
276	25.86±0.84	11.94±1.27	6.74±0.63	83.91
288	25.61±0.64	11.90±1.29	6.73±0.59	83.94
300	25.24±0.54	12.01±1.23	6.64±0.62	84.15
312	24.64±0.44	12.04±1.25	5.21±0.76	87.57
324	24.58±0.34	12.01±1.19	4.65±0.57	88.90
336	24.58±0.31	11.98±1.11	5.28±0.72	87.40
348	24.55±0.79	12.16±1.51	5.24±0.69	87.49
360	24.51±0.86	12.33±1.77	5.19±0.68	87.61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-17 ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก และผลผลิตกรดโพรพโอนิก โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบอิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด (LogCFU)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (g/l.h)	อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก	ผลผลิตกรด โพรพิโอนิก (g_{PA}/g_{Sugar})
0	6.28	0.00	0.00 : 1	0.00
12	7.29	0.26	5.97 : 1	0.08
24	9.17	0.22	6.40 : 1	0.17
36	9.65	0.38	2.97 : 1	0.48
48	10.06	0.39	2.90 : 1	0.85
60	10.00	0.36	2.95 : 1	1.76
72	10.10	0.31	2.08 : 1	1.91
84	10.87	0.27	1.98 : 1	2.08
96	11.33	0.24	2.02 : 1	2.21
108	11.18	0.22	2.08 : 1	2.34
120	11.30	0.20	2.27 : 1	2.46
132	11.20	0.20	2.61 : 1	2.78
144	11.15	0.18	2.55 : 1	2.77
156	11.75	0.17	2.17 : 1	2.75
168	11.77	0.16	2.17 : 1	2.77
180	11.85	0.14	2.17 : 1	2.80
192	11.95	0.14	2.22 : 1	3.02
204	11.89	0.13	2.17 : 1	2.94
216	11.87	0.12	2.14 : 1	2.95
228	11.91	0.12	2.20 : 1	3.00
240	11.84	0.11	2.20 : 1	3.03
252	11.88	0.10	2.20 : 1	3.01
264	11.80	0.10	2.20 : 1	3.92
276	11.81	0.09	2.17 : 1	3.84
288	11.83	0.09	2.15 : 1	3.80
300	11.82	0.08	2.10 : 1	3.80
312	11.83	0.08	2.05 : 1	4.73
324	11.85	0.08	2.05 : 1	5.29
336	11.87	0.07	2.05 : 1	4.66
348	11.84	0.07	2.02 : 1	4.68
360	11.87	0.07	1.99 : 1	4.72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-18 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณกรดแอซีติก น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	กรดโพรพิโอนิก (g/l)	กรดแอซีติก (g/l)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (g/l)	ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมด
0	0.00±0.00	0.00±0.00	43.30±0.00	0.00
12	0.82±0.42	2.96±0.16	42.47±0.19	1.92
24	1.09±0.34	3.07±0.14	40.39±1.77	6.72
36	1.50±0.42	3.24±0.17	38.98±0.82	9.98
48	1.81±0.17	3.36±0.13	36.95±0.38	14.67
60	2.29±0.27	3.55±0.15	34.95±0.80	19.28
72	8.28±0.47	5.94±0.30	34.53±0.44	20.25
84	10.61±0.62	7.41±0.53	33.47±0.15	22.70
96	13.76±0.70	8.66±0.33	33.23±0.33	23.26
108	17.27±0.29	10.07±0.48	29.58±0.85	31.69
120	18.60±0.05	10.06±0.40	24.86±0.26	42.59
132	18.70±0.51	10.11±0.48	21.85±0.43	49.54
144	20.73±0.36	11.32±0.51	16.40±0.50	62.12
156	22.50±0.15	12.02±0.50	13.54±0.89	68.73
168	24.72±0.69	12.91±0.65	13.27±1.25	69.35
180	24.79±0.30	12.94±0.56	10.29±1.45	76.24
192	27.91±0.41	13.59±0.69	9.89±1.17	77.16
204	27.74±0.37	13.52±0.69	9.87±1.29	77.21
216	27.72±0.33	13.58±0.67	8.51±1.18	80.35
228	27.67±0.32	13.55±0.67	7.05±1.25	83.72
240	26.91±0.34	12.95±0.49	7.01±1.08	83.81
252	26.84±0.38	12.92±0.48	6.72±0.50	84.48
264	26.84±0.40	12.93±0.48	6.95±0.09	83.95
276	26.68±0.36	12.68±0.30	6.56±0.11	84.85
288	26.65±0.39	12.67±0.31	6.54±0.36	84.90
300	26.65±0.35	12.67±0.30	6.50±0.38	84.99
312	26.64±0.34	12.66±0.29	6.86±0.09	84.16
324	26.55±0.32	12.63±0.29	6.90±0.12	84.06
336	25.48±2.24	12.09±0.51	6.69±0.20	84.55
348	24.99±0.76	12.04±0.22	6.58±0.13	84.80
360	24.84±2.31	12.23±0.53	6.48±0.12	85.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-19 อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติก และผลผลิตกรดโพรพโอนิกโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทิน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (g/l.h)	อัตราส่วนระหว่าง กรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก	ผลผลิตกรด โพรพิโอนิก (g_{PA}/g_{Sugar})
0	0.00	0.00 : 1	0.00
12	0.07	0.28 : 1	0.02
24	0.05	0.36 : 1	0.03
36	0.04	0.46 : 1	0.04
48	0.04	0.54 : 1	0.05
60	0.04	0.64 : 1	0.07
72	0.11	1.39 : 1	0.24
84	0.13	1.43 : 1	0.32
96	0.14	1.59 : 1	0.41
108	0.16	1.72 : 1	0.58
120	0.16	1.85 : 1	0.75
132	0.14	1.85 : 1	0.86
144	0.14	1.83 : 1	1.26
156	0.14	1.87 : 1	1.66
168	0.15	1.91 : 1	1.86
180	0.14	1.92 : 1	2.41
192	0.15	2.05 : 1	2.82
204	0.14	2.05 : 1	2.81
216	0.13	2.04 : 1	3.26
228	0.12	2.04 : 1	3.92
240	0.11	2.08 : 1	3.84
252	0.11	2.08 : 1	3.99
264	0.10	2.08 : 1	3.86
276	0.10	2.10 : 1	4.07
288	0.09	2.10 : 1	4.07
300	0.09	2.10 : 1	4.10
312	0.09	2.10 : 1	3.88
324	0.08	2.10 : 1	3.85
336	0.12	2.11 : 1	3.81
348	0.12	2.08 : 1	3.80
360	0.13	2.03 : 1	3.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ข้อมูลทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยการออกแบบการทดลอง แบบ Plackett-Burman Design (PBD) ที่เวลา 144 ชั่วโมง

ANOVA

Propionic acid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	610.313	14	43.594	5.231	.000
Within Groups	250.017	30	8.334		
Total	860.331	44			

Duncan[a]

Propionic acid

Run	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
7.00	3	0.7900				
13.00	3	1.4700				
15.00	3	5.6300	5.6300			
8.00	3	6.5800	6.5800	6.5800		
14.00	3	6.7900	6.7900	6.7900		
4.00	3		7.8967	7.8967	7.8967	
10.00	3		7.9467	7.9467	7.9467	
2.00	3		7.9600	7.9600	7.9600	
9.00	3		7.9600	7.9600	7.9600	
11.00	3		7.9600	7.9600	7.9600	
12.00	3		10.5600	10.5600	10.5600	
5.00	3			12.0733	12.0733	
1.00	3			12.1667	12.1667	
6.00	3				12.5567	
3.00	3					17.6767
Sig.		.050	.084	.051	.100	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

Acetic acid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	282.544	14	20.182	98.868	.000
Within Groups	6.124	30	.204		
Total	288.667	44			

Duncan[a]

Acetic acid

Run	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
7.00	3	.0000							
13.00	3	.0000							
15.00	3		1.0333						
14.00	3		1.4000	1.4000					
5.00	3			1.9000					
1.00	3			2.0500					
8.00	3				3.4867				
10.00	3					4.8333			
4.00	3					5.0000	5.0000		
2.00	3						5.6733	5.6733	
9.00	3						5.6733	5.6733	
11.00	3						5.6733	5.6733	
12.00	3							6.2900	
6.00	3								7.1200
3.00	3								7.6600
Sig.		1.000	.328	.105	1.000	.655	.104	.136	.154

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

Total sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3027.931	14	216.281	556150.673	.000
Within Groups	.012	30	.000		
Total	3027.943	44			

Duncan[a]

Total sugar

Run	N	Subset for alpha = 0.05											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
15.00	3	2.3267											
10.00	3		2.9500										
4.00	3			2.9900									
8.00	3				3.0900								
13.00	3					4.3100							
2.00	3						6.8100						
9.00	3						6.8100						
11.00	3						6.8100						
7.00	3							7.9700					
6.00	3								13.0400				
12.00	3								13.0400				
3.00	3									14.1900			
1.00	3										17.6400		
5.00	3											20.2300	
14.00	3												33.3600
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

ANOVA

Propionic acid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4107.101	19	216.163	52.374	.000
Within Groups	165.091	40	4.127		
Total	4272.191	59			

Duncan[a]

Propionic acid

Run	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
13.00	3	.9133						
7.00	3		5.3133					
3.00	3		6.2467					
4.00	3		8.4333					
1.00	3			12.2133				
5.00	3			12.6200				
10.00	3			14.2867				
14.00	3			15.1200				
9.00	3				19.1733			
2.00	3				19.8533	19.8533		
11.00	3					22.8933	22.8933	
12.00	3						24.4333	24.4333
8.00	3						25.1367	25.1367
15.00	3						26.0800	26.0800
16.00	3						26.0800	26.0800
17.00	3						26.0800	26.0800
18.00	3						26.0800	26.0800
19.00	3						26.0800	26.0800
20.00	3						26.0800	26.0800
6.00	3							27.7500

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sig.		1.000	.082	.117	.684	.074	.109	.096

ANOVA

Acetic acid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	847.957	19	44.629	158.185	.000
Within Groups	11.285	40	.282		
Total	859.242	59			

Duncan[a]

Acetic acid

Run	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
13.00	3	2.9733							
3.00	3	3.4500	3.4500						
4.00	3		4.1367						
14.00	3			7.7300					
1.00	3			7.8200					
2.00	3			7.9067					
7.00	3			8.6767	8.6767				
9.00	3				9.2933	9.2933			
15.00	3					9.7167			
16.00	3					9.7167			
17.00	3					9.7167			
18.00	3					9.7167			
19.00	3					9.7167			
20.00	3					9.7167			
5.00	3						11.4800		
10.00	3						11.5033		
8.00	3							15.1200	
12.00	3							15.2267	
11.00	3							15.6000	
6.00	3								17.0933

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sig.		.278	.121	.051	.163	.407	.957	.304	1.000

ANOVA

Total sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13002.298	19	684.331	6843314.874	.000
Within Groups	.004	40	.000		
Total	13002.302	59			

Duncan[a]

Total sugar

Run	**N**	**Subset for alpha = 0.05**														
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**
7.00	3	3.28														
1.00	3		4.84													
4.00	3			6.81												
5.00	3				6.93											
3.00	3					7.49										
16.00	3						18.10									
17.00	3						18.10									
18.00	3						18.10									
19.00	3						18.10									
20.00	3						18.10									
15.00	3						18.11									
12.00	3							20.26								
9.00	3								20.83							
10.00	3									26.02						
14.00	3										26.45					
6.00	3											35.68				
8.00	3												38.04			
2.00	3													42.44		
11.00	3														53.73	
7.00	3															54.13
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.292	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษายีห้อของยีสต์สกัดที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

ANOVA

Propionic acid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	290.276	3	96.759	19.698	.000
Within Groups	39.297	8	4.912		
Total	329.574	11			

Duncan[a]

Propionic acid

Type of yeast extract	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
CW-V (Thailand)	3	12.4567	
21VP (Thailand)	3		21.7133
HIMAX IG20 (Thailand)	3		22.8733
Himedia (India)	3		25.5033
Sig.		1.000	.079

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 โดยการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระและแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

4.1 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Free cell	21.5533	3	.58106	.33548
	Immobilization	25.6533	3	.71276	.41151

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Free cell & Immobilization	3	-.858	.344

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	Free cell - Immobilization	-4.10000	1.24744	.72021	-7.19881	-1.00119	-5.693	2	.029

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรต่อชั่วมง)

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Free cell	.10367	3	.004726	.002728
	Immobilization	.11833	3	.003055	.001764

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Free cell & Immobilization	3	.600	.590

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	Free cell - Immobilization	-.014667	.003786	.002186	-.024071	-.005262	-6.710	2	.021

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมกรดโพรพิโอนิกต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด)

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Free cell	1.1533	3	.03055	.01764
	Immobilization	2.1933	3	.05686	.03283

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Free cell & Immobilization	3	-.902	.284

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	Free cell - Immobilization	-1.04000	.08544	.04933	-1.25224	-.82776	-21.083	2	.002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Free cell	58.6533	3	1.12340	.64860
	Immobilization	75.0667	3	5.14016	2.96767

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Free cell & Immobilization	3	-.959	.183

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	Free cell - Immobilization	-16.41333	6.22580	3.59447	-31.87909	-.94758	-4.566	2	.045

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

ANOVA

Propionic acid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3741.566	15	249.438	227.629	.000
Within Groups	35.066	32	1.096		
Total	3776.632	47			

Duncan[a]

Propionic acid

Time	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0.00	3	.0000							
24.00	3		2.6967						
48.00	3			6.9833					
72.00	3				11.9267				
96.00	3					14.3267			
120.00	3					14.8667			
144.00	3						17.1767		
168.00	3							21.3233	
192.00	3							22.9733	
216.00	3								25.6533
240.00	3								25.6633
360.00	3								26.2933
288.00	3								26.4033
336.00	3								26.4433
312.00	3								26.4533
264.00	3								26.6833
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.532	1.000	.062	.305

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 โดยการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระและแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร

5.1 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Free cell	26.8967	3	.65744	.37958
	Immobilization	27.9167	3	.41501	.23961

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Free cell & Immobilization	3	.265	.829

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	Free cell - Immobilization	-1.02000	.67801	.39145	-2.70427	.66427	-2.606	2	.121

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Free cell	.14000	3	.003606	.002082
	Immobilization	.14533	3	.002517	.001453

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Free cell & Immobilization	3	.165	.894

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	Free cell - Immobilization	-.005333	.004041	.002333	-.015373	.004706	-2.286	2	.150

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมกรดโพรพิโอนิกต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด)

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Free cell	3.01600	3	.072298	.041741
	Immobilization	2.82233	3	.042004	.024251

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Free cell & Immobilization	3	.255	.836

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	Free cell - Immobilization	.193667	.073759	.042585	.010440	.376893	4.548	2	.045

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 ร้อยละการใช้น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Free cell	78.7133	3	1.30539	.75367
	Immobilization	77.1667	3	2.69214	1.55431

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Free cell & Immobilization	3	-.167	.893

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	freecell - immobilization	1.54667	3.18210	1.83718	-6.35810	9.45143	.842	2	.488

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ปริมาณกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* TISTR 422 โดยการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระและแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร

6.1 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ

ANOVA

Propionic acid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4628.657	30	154.289	284.004	.000
Within Groups	33.682	62	.543		
Total	4662.339	92			

6.2 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา

ANOVA

Propionic acid

	Sum of Squares	**df**	**Mean Square**	**F**	**Sig.**
Between Groups	9182.569	30	306.086	627.843	.000
Within Groups	30.226	62	.488		
Total	9212.795	92			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.3 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ

Duncan[a]

Propionic acid

Time	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.00	3	.0000								
12.00	3		3.1067							
24.00	3			5.3767						
36.00	3				13.7433					
48.00	3					18.4733				
60.00	3						21.6567			
72.00	3						22.2000	22.2000		
84.00	3						22.5233	22.5233	22.5233	
96.00	3						22.8533	22.8533	22.8533	
108.00	3							23.3633	23.3633	
120.00	3								23.5467	
216.00	3									25.9533
300.00	3									25.9533
324.00	3									25.9633
312.00	3									26.0167
252.00	3									26.0267
336.00	3									26.0333
156.00	3									26.0500
180.00	3									26.0500
168.00	3									26.1033
348.00	3									26.1167
204.00	3									26.1200
228.00	3									26.2233
276.00	3									26.2433
264.00	3									26.2733
288.00	3									26.3233
360.00	3									26.3233
144.00	3									26.3267
240.00	3									26.3400
132.00	3									26.3933
192.00	3									26.8067
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.073	.081	.126	.254

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.4 การเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพกทินจากใบกรุงเขมา

Duncan[a]

Propionic acid

Time	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
.00	3	.0000						
12.00	3	.8167	.8167					
24.00	3	1.0933	1.0933	1.0933				
36.00	3		1.5000	1.5000				
48.00	3		1.8133	1.8133				
60.00	3			2.2900				
72.00	3				8.2533			
84.00	3					10.6033		
96.00	3						13.7633	
108.00	3							17.2733
120.00	3							
132.00	3							
144.00	3							
156.00	3							
168.00	3							
180.00	3							
360.00	3							
348.00	3							
336.00	3							
324.00	3							
312.00	3							
288.00	3							
300.00	3							
276.00	3							
252.00	3							
264.00	3							
240.00	3							
192.00	3							
228.00	3							
216.00	3							
204.00	3							
Sig.		.074	.116	.058	1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Duncan[a]

Propionic acid (ต่อ)

Time	N	Subset for alpha = 0.05						
		8	9	10	11	12	13	14
.00	3							
12.00	3							
24.00	3							
36.00	3							
48.00	3							
60.00	3							
72.00	3							
84.00	3							
96.00	3							
108.00	3							
120.00	3	18.6033						
132.00	3	18.7000						
144.00	3		20.7333					
156.00	3			22.4967				
168.00	3				24.7167			
180.00	3				24.7867			
360.00	3				24.8433			
348.00	3				24.9833			
336.00	3				25.1433	25.1433		
324.00	3					26.2200	26.2200	
312.00	3						26.6400	26.6400
288.00	3						26.6500	26.6500
300.00	3						26.6500	26.6500
276.00	3						26.6733	26.6733
252.00	3						26.8367	26.8367
264.00	3						26.8433	26.8433
240.00	3						26.9133	26.9133
192.00	3						26.9167	26.9167
228.00	3							27.6700
216.00	3							27.7233
204.00	3							27.7400
Sig.		.866	1.000	1.000	.514	.064	.310	.112

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวจิรนันท์ โพธิสาร
วัน เดือน ปีเกิด	27 กันยายน พ.ศ. 2528
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2551 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	Jiranan Potisarn and Sukjai Choojun. 2013. The production of propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 using yeast autolysate as an alternative source by Plackett-Burman design. **Burapha University International Conference 2013 Global Change: Human and Social Impacts**. Thailand. Poster presentation (STP358-59)
	Jiranan Potisarn and Sukjai Choojun. 2013. Essential factor screening for propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 422 using a Plackett-Burman design. **The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference**. Thailand. Poster presentation (P-05-032)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้