สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

นางสาว กนกวรรณ เจนธรรมาภรณ์
นางสาว นันทนัช ปรีดีดิลก
นางสาว บงกชรัตน์ เนาวกูล

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67280
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549
b.....
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on Effect of Carbon Sources for Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

Ms. Kanokwan Janetummaporn

Ms. Nantanach Preedeedilok

Ms. Bongkochrat Naowakul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965
นักศึกษา	นางสาวกนกวรรณ เจนธรรมาภรณ์ รหัสประจำตัว 45050177
	นางสาวนันทนัช ปรีดีดิลก รหัสประจำตัว 45050201
	นางสาวบงกชรัตน์ เนาวกูล รหัสประจำตัว 45050207
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต	
กรรมการ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ รศ. สุขใจ ชูจันทร์	

.....

(รศ.ตร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

นักศึกษา นางสาวกนกวรรณ เจนธรรมาภรณ์
นางสาวนันทนัช ปรีดีดิลก
นางสาวบงกชรัตน์ เนาวกูล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยแหล่งคาร์บอน 4 ชนิด คือ น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทราย ทำการหมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณสูงสุด คือ 8.3337 และ 7.9811 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรด คือ 0.5519 และ 0.5474 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และอัตราการผลิตกรด คือ 2.0069 และ 2.1304 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 192 และ 120 ของระยะเวลาการหมักตามลำดับ จากนั้นศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด โดยสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณสูงสุด คือ 7.01 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรด คือ 0.3394 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ 2.0624 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 312 ของระยะเวลาการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Study on Effect of Carbon Sources for Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965
Name	Ms. Kanokwan Janetunmaporn
	Ms. Nantanach Preedeedilok
	Ms. Bongkochrat Naowakul
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Assoc.Prof. Sukjai Choojun

ABSTRACT

A study about suitable carbon sources for propionic acid, producing by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 from four carbon sources that are lactose, glucose, sucrose and cane-sugar. It was fermented in stationary flask at temperature 30°C. This experiment found that sucrose and cane-sugar which are suitable carbon source, because they could produce maximum propionic acid are 8.3337 and 7.9811 g/l. The yields of propionic acid are 0.5519 and 0.5474 g/g substrate and the productivity of propionic acid are 2.0069 and 2.1304 g/l/h, at the hundred ninty-second and the hundred twentieth hours of fermentation respectively. Suitable concentration of carbon sources for propionic acid producing by sucrose and cane-sugar were studied. The different concentration are 10, 20 and 30 g/l. The result of the experiment found that cane-sugar at 30 g/l concentration is the maximum propionic acid that is 7.01 g/l, the yield of propionic acid is 0.3394 g/g substrate and the productivity of propionic acid is 2.0624 g/l/h at the three hundred-twelfth hours of fermentation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษ ในหัวข้อเรื่องการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนทั้งชนิด และปริมาณเพื่อใช้สำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีได้หากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ และช่วยปรับปรุงข้อบกพร่องที่เกิดขึ้น จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต และ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ ที่ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และตรวจสอบแก้ไขข้อมูลต่างๆ ในโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณพี่ปริญญาโท ทั้งพี่เดียร์ พี่แตงโม และพี่อิ๋ว ที่คอยให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และตอบข้อซักถามต่างๆ ในการทำการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อนๆที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และช่วยคิดแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างทำการทดลอง ทำให้การทำโครงงานพิเศษเป็นไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดาของผู้จัดทำที่คอยเป็นกำลังใจ และสนับสนุนกำลังทรัพย์ในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่มีความสนใจในงานที่เกี่ยวข้อง หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

นางสาว กนกวรรณ เจนธรรมาภรณ์
นางสาว นันทนัช ปรีดีดิลก
นางสาว บงกชรัตน์ เนาวกูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....ฉ
สารบัญรูป.....ช

บทที่ 1 บทนำ
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ.....1
1.2 วัตถุประสงค์.....1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ.....2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน.....2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ
2.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก.....3
2.2 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก.....5
2.3 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก.....7
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก.....10
2.5 การผลิดกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ Propionibacteria สายพันธุ์ต่างๆ.....12
2.6 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก.....13
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิดกรดโพรพิโอนิก.....16
2.8 เครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).....20

บทที่ 3 วิธีดำเนินการ
3.1 อุปกรณ์.....27
3.2 สารเคมี.....28
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในทดลอง.....28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....29
3.5 การศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก.....29
3.6 การวิเคราะห์ผล.....30
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....30

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล
4.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก.....31
4.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต.....36
กรดโพรพิโอนิก

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....44

เอกสารอ้างอิง.....46
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....50
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์.....52
ภาคผนวก ค ตารางผลการทดลอง.....64
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ทางสถิติ.....74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก....4

2.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ Propionibacteria สายพันธุ์ต่างๆ....12

2.3 ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรนที่เหมาะสมสำหรับตัวทำละลายแต่ละชนิด....25

4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก....33
โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

4.2 ผลของน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิต....38
กรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก....3

2.2 สูตรโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิก....3

2.3 เชื้อ *Propionibacterium freudenreichii*....11

2.4 เชื้อ *Propionibacterium acnes*....11

2.5 การย้อมแกรมของเชื้อ *Propionibacterium* sp....12

2.6 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสและแลคเตทโดยเชื้อ Propionibacteria....14

2.7 การสร้างซัคซิเนต และโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์....15

2.8 วิถีอะคริเลตของการสร้างโพรพิโอเนต....16

2.9 เครื่อง High – performance liquid chromatography (HPLC)....21

4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน....32

4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน....32

4.3 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน....34

4.4 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน....35

4.5 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด - ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน....35

4.6 การเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน....37

4.7 น้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน....37

4.8 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน....40

4.9 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทราย....41
ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.10 ค่าความเป็นกรด – ด่างที่เปลี่ยนแปลง เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทราย.....42
ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

4.11 น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป และค่า.....42
ความเป็นกรด - ด่างของน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดที่สามารถผลิตได้ทั้งขบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตเพื่อการค้านิยมผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้ขบวนการทางเคมี เนื่องจากได้ผลผลิตสูงตามความต้องการ และมีระยะเวลาในการผลิตที่เร็วกว่ากระบวนการทางชีวภาพ แต่กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้มีราคาค่อนข้างแพง เนื่องจากกระบวนการที่ใช้ในการทำให้กรดบริสุทธิ์นั้นมีความยุ่งยากซับซ้อน ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีความเป็นพิษ และสามารถใช้กับอุตสาหกรรมประเภทอาหารได้ อีกทั้งค่าใช้จ่ายในการผลิตก็ไม่สูงนัก การผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล Propionibacteria (Lind, 2004)

แต่การผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพก็มีข้อจำกัด ซึ่งเป็นผลมาจากการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกระบวนการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่น้อย (E.H.Himmi และคณะ, 2000) เช่น การหมักแบบกะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียงร้อยละ 1 ถึง 3 ซึ่งใช้เวลาในการหมักนาน 7 ถึง 14 วัน (Schuppert และคณะ, 1992) ดังนั้นจึงได้มีการคิดหาวิธีต่างๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้การตรึงเซลล์ (Yang และคณะ, 1994) การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะ (Martinez และคณะ, 2002) การใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (Quesada-Chanto และคณะ, 1994) และการคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโพรพิโอนิก (Quesada-Chanto, 1994)

การทดลองนี้เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการคิดค้นสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยศึกษาจากผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทราย เพื่อเป็นแนวทางในการหาแหล่งคาร์บอนที่ดีและเหมาะสมสำหรับการเพิ่มผลผลิตของกรดโพรพิโอนิก

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์

1.2.2 ศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ได้แก่

1) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

2) ศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ได้แก่ ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของเซลล์ กรดโพรพิโอนิก กรดแลคติก และกรดอะซิติก

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

1.4.1.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1.4.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

1.4.2 การศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

1.4.2.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

1.4.2.2 ศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

1.4.3 การวิเคราะห์ผล

1.4.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อใช้เป็นแนวทางการศึกษาและพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.5.2 ทราบถึงผลผลิตกรดโพรพิโอนิกที่ได้จากกระบวนการหมักอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรีย (Prescott และคณะ, 1959) ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ (Himmi และคณะ, 2000) อาหารสัตว์ (Schuppert, 1992) และนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการทำพลาสติกในรูปของ cellulose propionate (Barbirato และคณะ, 1997) ในอุตสาหกรรมน้ำหอมในรูปของ ethyl propionate ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวทำละลาย (Czaczyk และคณะ, 1995) นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Lind, 2004) และเป็นสารที่ช่วยเพิ่มกลิ่นรสของอาหาร (Yang, 1994)

กรดโพรพิโอนิกมีสูตรโมเลกุล คือ CH_3CH_2COOH มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.1 และมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยในอุตสาหกรรมอาหารนั้นจะใช้กรดโพรพิโอนิกที่อยู่ในรูปของเกลือ ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 3 รูปแบบ คือ เกลือโซเดียม แคลเซียม และโพแทสเซียม สูตรโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิกดังแสดงในรูปที่ 2.2

รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก
ที่มา : www.firehouse.com/mz/images/2003/9/12_organic3.gif

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

รูปที่ 2.2 สูตรโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิก
ที่มา : ศิวาพร, 2524

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ	กรดโพรพิโอนิก
น้ำหนักโมเลกุล	74.08
Conversion factor	1 พีพีเอ็มเท่ากับ 3.02 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตรเท่ากับ 0.33 พีพีเอ็ม ที่ 25 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	(-20) ถึง (-22) องศาเซลเซียส
จุดเดือด	141.1 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น	0.992 ถึง 0.994
การละลายน้ำ	สามารถละลายน้ำได้
ค่าพีเอช	2.9
การละลายในสารละลาย	สามารถละลายได้ในเอทธานอล ไดเอธิลอีเทอร์และ คลอโรฟอร์ม
ความดันบรรยากาศ	2.55
ความดันไอ	0.32 ถึง 0.4 กิโลปาสคาล
อัตราการระเหย	ไม่ระเหย
อุณหภูมิวิกฤติ	339 องศาเซลเซียส
ค่าความเป็นกรด	กรดอ่อน pKa 4.87
ความดันวิกฤติ	5,370 กิโลปาสคาล
ความคงตัว	มีความคงตัว
การกัดกร่อนเหล็ก	สามารถกัดกร่อน เหล็กกล้า นิกเกิล โครเมียม และ ตะกั่ว
สภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง	อุณหภูมิเกิน 50 องศาเซลเซียส
วัตถุที่ควรหลีกเลี่ยง	1. สารออกซิไดซ์ 2. Reactive metal 3. Reducing agent 4. กรดแก่

ที่มา : www.absoluteastronomy.com/encyclopedia/p/pr/propionic_acid.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก

2.2.1 การใช้ประโยชน์จากกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิกเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อรา สามารถพบได้ตามธรรมชาติในอาหารประเภทหมักดอง ในเหงื่อของคน และในกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง กรดโพรพิโอนิกสามารถละลายได้ดีในน้ำ เอทธานอล และอีเทอร์ ส่วนเกลือโพรพิโอเนตสามารถละลายน้ำได้ร้อยละ 30 แต่ไม่ละลายในไขมัน (Lind, 2004)

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ซึ่งไม่แตกตัวจึงมีประโยชน์ในการทำลายจุลินทรีย์ โดยจะไปละลายสารภายในเยื่อหุ้มเซลล์ มีการตั้งสมมุติฐานว่ากรดทำลายจุลินทรีย์ได้โดยไปรบกวนการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะไปยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ ทำให้สภาพภายในของเซลล์นั้นมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่มีผลช่วยในการยับยั้งการเจริญและทำให้จุลินทรีย์ตายได้ในที่สุด พีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของโพรพิโอนิกให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 3.4 ถึง 4.5 โดยที่พีเอช 4 จะมีโมเลกุลของกรดและเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 88 ในขณะที่พีเอชเท่ากับ 6 จะมีโมเลกุลที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 6.7 กรดที่ไม่แตกตัวทำให้เกิดการยับยั้งการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์สารประกอบนี้ให้ส่งผลในการป้องกันได้ดีในอาหารที่เป็นกรดต่ำ ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นจะใช้กรดโพรพิโอนิกที่อยู่ในรูปของเกลือ คือ เกลือโซเดียม แคลเซียม และโพแทสเซียม โดยเกลือโซเดียมจะละลายได้ดีกว่าเกลือแคลเซียม ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมปังจะนิยมใช้กรดโพรพิโอนิกในรูปของเกลือแคลเซียม เนื่องจากจะเป็นการเพิ่มแคลเซียมไปในตัวด้วย (ศิวาพร, 2524)

กรดโพรพิโอนิกจะมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น เมื่อแอนไอออนไปรบกวนการแตกตัวของกรด อย่างไรก็ตามการทำลายจุลินทรีย์ของกรดก็มีข้อจำกัด ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นด้วย เช่น กรดอินทรีย์ไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากได้ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อช่วยในการเจริญได้ ความต้านทานกรดของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันมาก การนำกรดอินทรีย์มาใช้ในอาหารอาจทำให้เกิดจุลินทรีย์ชนิดทนกรดได้เพิ่มขึ้น

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพมากในการทำลายเชื้อรา นิยมใช้เป็นสารป้องกันการเน่าเสียและช่วยในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร ช่วงพีเอชที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ 3.5 ถึง 4.5 แต่ในประเทศไทยอนุญาตให้ใช้กรดโพรพิโอนิกได้ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

กรดโพรพิโอนิกมีความปลอดภัยในการใช้ในอาหาร จึงไม่ได้กำหนดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในอาหาร ยกเว้น ในขนมปัง โรล และเนยแข็ง ซึ่งกำหนดความเข้มข้นสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารได้ดังนี้ คือ แป้งที่ใช้ในขนมปังขาว และโรล ความเข้มข้นสูงสุดคือร้อยละ 0.32 สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ทำจากข้าวสาลีทั้งหมด คือ ร้อยละ 0.38 สำหรับผลิตภัณฑ์เนย คือร้อยละ 0.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

กุลยา (2533) รายงานว่าการใช้แคลเซียมโพรพิโอเนต และโซเดียมโพรพิโอเนตปริมาณร้อยละ 0.2 ถึง 0.4 กับขนมปัง จะสามารถป้องกันเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเมือกได้ การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของโซเดียมโพรพิโอเนตจะให้ผลที่พีเอช 3.5 ถึง 4.5 ดีกว่าที่พีเอชสูง

Racker และคณะ (1972) รายงานว่ากรดโพรพิโอนิกร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 26.8 และ 29.6 ได้ตลอดการทดลอง 42 สัปดาห์

Vandegraft และคณะ (1975) ได้ทำการทดลองใช้กรดโพรพิโอนิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้กับเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 28 พบว่าตลอดการทดลองทั้ง 29 สัปดาห์ จะไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* กับ *Aspergillus ochraceus* และสารอะฟลาทอกซิน B_1 กับสารโอคร่าทอกซิน

Buchanan and Ayres (1976) รายงานว่าการใช้กรดโพรพิโอนิก 0.1 กรัมต่อ 100 มิลลิกรัมของอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* และการสร้างอะฟลาทอกซินได้บางส่วน แต่ถ้าเพิ่มเป็น 0.2 กรัม จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการสร้างอะฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ ในระยะเวลา 7 วัน

2.2.2 โทษของกรดโพรพิโอนิก

อันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ

กรดโพรพิโอนิกทำให้เกิดอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ โดยความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดในอากาศ จะทำให้คัดจมูก เจ็บคอ ไอ เสียงแหบ หายใจติดขัด ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรเคลื่อนย้ายผู้ป่วยออกจากที่ซึ่งมีกรดโพรพิโอนิกและนำผู้ป่วยไปยังที่ที่มีอากาศปลอดโปร่ง แล้วนำส่งแพทย์

อันตรายต่อผิวหนัง

อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อผิวหนังจะมีความรุนแรงระดับปานกลางถึงรุนแรงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดและลักษณะการสัมผัส หากสัมผัสกรดโดยตรงจะทำให้ผิวเกิดรอยแดงและเจ็บ ถ้ารุนแรงจะทำให้ผิวไหม้เกิดแผลพุพองและเนื้อเยื่อถูกทำลาย บาดแผลจะจางลงหลังจาก 40 นาที ผิวที่แดงอาจเกิดการบวมและเนื้อเยื่อตาย (necrosis) และจะหายดีใน 3 วัน การสัมผัสกรดอาจส่งผลอย่างรุนแรงหากไม่ทำการล้างกรดออกจากผิวหนัง อาจทำให้เกิดบาดแผลถาวร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ จากการศึกษาพบว่ากรดโพรพิโอนิกสามารถซึมผ่านผิวหนัง ทำให้เกิดอันตรายได้ ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรล้างบริเวณผิวหนังที่โดนกรดด้วยน้ำสะอาดทันที ถ้ากรดมีความเข้มข้นสูงและบาดแผลมีอาการหนัก ควรนำส่งแพทย์

อันตรายต่อตา

อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อตาหากถูกไอของกรดที่มีความเจือจางเข้าตา ทำให้เกิดอาการตาแดงและเจ็บ ถ้าถูกกรดที่มีความเข้มข้นเข้าตาโดยตรง ทำให้กระจกตาไหม้ โดยระดับความรุนแรงขึ้นกับความเข้มข้นของกรด ถ้ารุนแรงมากอาจส่งผลถาวรและทำให้ตาบอด ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรล้างบริเวณผิวหนังที่โดนกรดด้วยน้ำสะอาดทันที แล้วนำส่งแพทย์โดยทันที

อันตรายต่อระบบทางเดินอาหาร

อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อระบบทางเดินอาหารถ้าบริโภคกรดที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้ปาก ลำคอและกระเพาะได้รับบาดเจ็บ กรดโพรพิโอนิกไม่สะสมในร่างกาย ในธรรมชาติกรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตจากการแตกตัวของกรดไขมันและโซ่ข้างของคลอเรสเตอรอลในร่างกาย โดยร่างกายจะทำการดูดซึมอย่างรวดเร็วผ่านทางเดินอาหาร และถูกขับออกจากร่างกายอย่างรวดเร็วผ่านทางลมหายใจ ปัสสาวะ และอุจจาระ ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรนำผู้ป่วยล้างปากด้วยน้ำ อย่าชักนำให้ผู้ป่วยอาเจียน ให้ดื่มน้ำ 240 ถึง 300 มิลลิลิตร หรือดื่มนมแล้วล้างปากผู้ป่วยทันที (ที่มา : www.msds.pcd.go.th.IsearchName.asp?VID=742)

2.3 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ 2 วิธี

1. กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี

การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยวิธีสังเคราะห์ทางเคมีเป็นวิธีที่นิยมใช้ผลิตในทางการค้าอยู่ในปัจจุบันเพราะเป็นกระบวนการผลิตที่ใช้เวลาในการผลิตสั้นและได้ผลผลิตตามต้องการ

2. กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล Propionibacteria แต่ข้อจำกัดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพนี้เป็นผลมาจากการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกระบวนการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่น้อย ตัวอย่างเช่น การหมักแบบกะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียงร้อยละ 1 ถึง 3 ซึ่งใช้เวลาในการหมัก 7 ถึง 14 วัน (Schuppert และคณะ, 1992) จึงได้มีการคิดหาวิธีต่างๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีต่างๆ เช่น การใช้การตรึงเซลล์ (Yang และคณะ, 1994) การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะ (Martinez และคณะ, 2002) การใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (Quesada-Chanto และคณะ, 1994) การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโพรพิโอนิก (Quesada-Chanto, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Champange และคณะ (1989) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium shermanii* สายพันธุ์ B-123 ที่ถูกตรึงอยู่ในแคลเซียมแอลจิเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วยหางนมและแลคเตทในการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าเชื้อ B-123 จะใช้แลคเตทในการเจริญได้ดีกว่าแลคโตสที่มีอยู่ในหางนม เนื่องจากหางนมที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักนี้ได้มาจากการผลิตเนยแข็งที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อแลคโตบาซิลลัส (Lactobacillus) ซึ่งมีพีเอชค่อนข้างไปทางกรดจึงต้องทำให้เป็นกลางด้วยการเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ก่อนที่จะทำการหมักด้วยเชื้อ B-123 และพบว่าอัตราการหมักจะสูงขึ้นเมื่อปรับพีเอชของหางนมด้วย แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และความเข้มข้นของแลคเตทที่ใช้อยู่ระหว่าง ร้อยละ 1 ถึง 2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักกรดโพรพิโอนิก คือ 37 องศาเซลเซียส โดยที่อัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติกจะสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสูงขึ้น

Woskow และ Glatz (1991) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคโตสจากหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P9 และ P200910 ในสภาพการหมักแบบกะและกึ่งต่อเนื่อง พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P200910 ให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 47 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าผลผลิตที่ได้จากสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ P9 และจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกสูงสุดโดยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาพการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

Lewis และ Yang (1992) ศึกษากระบวนการหมักกรดโพรพิโอนิกโดยใช้แลคโตส กลูโคส และแลคเตทเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* spp. *shermanii* ในสภาพการหมักแบบกะ การเติมกลีเซอรอลจำนวน 20 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อผลิตกรดนั้น พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ใช้เวลาในการหมักสั้นกว่า *P. shermanii* ถึง 2 เท่า คือ 54 ชั่วโมงและ 110 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่ได้พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ให้ผลผลิตที่สูงกว่าเชื้อ *P. shermanii* คือ 12 กรัมต่อลิตร และ 9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในทำนองเดียวกันการเติมกลูโคสจำนวน 20 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากเชื้อ *P. acidipropionici* ก็สูงกว่าเช่นกัน คือ 8.7 กรัมต่อลิตร และ 6.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบแหล่งของธาตุคาร์บอนจากทั้ง 2 แหล่งพบว่าการใช้กลีเซอรอลจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าการใช้กลูโคส คือ 12 กรัมต่อลิตร และ 8.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้ทำการทดลองศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *P. acidipropionici* ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกและวิตามินบี12 จากซูโครส พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ 12 กรัม ธาตุโคบอลต์ 0.75 มิลลิกรัม 5,6-dimethykbenzimidazol 0.3 มิลลิกรัม และ $FeSO_4.7H_2O$ 1.5 มิลลิกรัม นั้นมีความจำเป็นที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม สำหรับในการผลิตเพื่อให้ได้กรดโพรพิโอนิกนั้นจะต้องทำในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ที่พี-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และในการผลิตวิตามินบี12 นั้นทำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีอากาศที่พีเอช 6.5

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคเตทจาก corn steep liquor (CSL) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P200910 เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแอลจิเนตและเชื้ออิสระในสภาพการหมักแบบกะ กึ่งกะ และต่อเนื่อง พบว่าการหมักแบบกะจะแสดงผลผลิตของกรดสูงสุดภายในเวลา 36 ชั่วโมง การใช้แลคเตทเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าการใช้กลูโคส และเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตจะให้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าเชื้ออิสระ ส่วนการหมักแบบกึ่งกะใช้เวลาในการหมักนาน 250 ชั่วโมง ความเข้มข้นสูงสุดของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้กลูโคสจะสูงกว่าการใช้แลคเตท คือ 57 และ 45.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในการหมักแบบต่อเนื่อง การใช้กลูโคสจะให้ผลผลิตของกรดโดยเชื้อที่ถูกตรึงสูงกว่าการใช้แลคเตท

Barbirato และคณะ (1997) เปรียบเทียบการเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิก 3 ชนิด คือ *Propionibacterium acidipropionici* สายพันธุ์ ATCC 25562 *P. acnes* ATCC 6919 และ *Clostridium propionicum* ATCC 25522 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ กลีเซอรอล กลูโคส และกรดแลคติกเพื่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่า *P. acidipropionici* สายพันธุ์ ATCC 25562 ให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุดโดยใช้เวลาในการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียอีก 2 สายพันธุ์ และพบอีกว่าการใช้กลีเซอรอลเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ ATCC 25562 จะได้ผลผลิตของกรดที่สูงกว่าการใช้กลูโคสและกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน

Ramsay และคณะ (1998) ได้ศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพเพื่อเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสเป็นกรดโพรพิโอนิก ในการศึกษาใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ hemicellulose hydrolysate ร้อยละ60 (โดยปริมาตร) เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และสารสกัดยีสต์ 2.5 กรัมต่อลิตร การเกิดกรดจะเกิดควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของเชื้อ มีอัตราการเจริญจำเพาะคือ 0.1 และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกคือ 0.23 กรัมต่อลิตรชั่วโมง การเจริญและการผลิตกรดจะถูกยับยั้งเมื่อมีความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิก 2 กรัมต่อลิตร สุดท้ายได้กรดโพรพิโอนิก 18 กรัมต่อลิตร

Himmi และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งอาหารโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* จะได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ และได้ผลิตผลพลอยได้คือกรดอะซิติก n-propanol และกรดซัคซินิก จากการทดลองนี้พบว่าเมื่อใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานจะผลิตกรดโพรพิโอนิกได้มากที่สุด *P. acidipropionici* มีความสามารถในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้สารตั้งต้นได้เร็วกว่า 0.64 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดสูงกว่า 0.42 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ได้จะมากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นถึง 2 เท่า ส่วนเชื้อ *P. freudenreichii* เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการใช้กลีเซอรอลกับการสร้างผลผลิต แสดงให้เห็นว่าเมแทบอไลท์ของเชื้อ *P. freudenreichii* นั้นปรับตัวเพื่อนำไปใช้ในการสร้างสารประกอบตัวอื่นได้ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีเยี่ยมสำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

Vandana และคณะ (2000) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ด้วยวิธีการหมักแบบกึ่งกะ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้แลคโตสเป็นสับสเตรท พีเอช 6.5 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเริ่มต้นของแลคโตสที่ใช้คือ 47.7 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 20.75 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราการผลิตได้ 0.23 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Martinez และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยในสภาพการหมักแบบกึ่งกะโดยเชื้อ *P. acidipropionici* มีการเติมกลูโคสหรือแลคเตทหรือสารผสมระหว่างกลูโคสและแลคเตท กลูโคสและเลคเตทจะถูกใช้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การใช้แลคเตทและกลูโคสร่วมกันจะเพิ่มอัตราการผลิตโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) แล้วยังเป็นการเพิ่มส่วนของธาตุคาร์บอนสำหรับที่จะนำไปใช้ในการผลิตชีวมวล ผลผลิตของโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) เท่ากับ 7.6 เมื่อใช้แลคเตทและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) เท่ากับ 1.34 เมื่อใช้แลคเตทอย่างเดียว และ 1.85 เมื่อใช้กลูโคสอย่างเดียว ปริมาณธาตุคาร์บอนที่เก็บเกี่ยวได้ในชีวมวลมีค่าเท่ากับ 0.09 เมื่อใช้กลูโคส 0.12 เมื่อใช้แลคเตท และ 0.21 เมื่อใช้แลคเตทและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

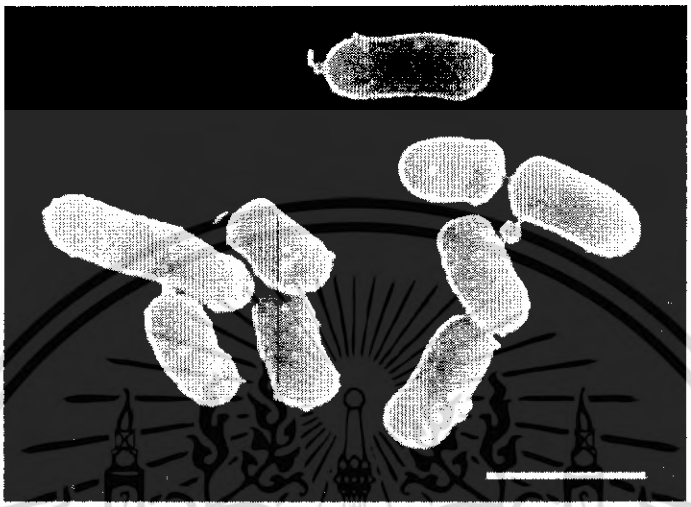
เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดโพรพิโอนิกอยู่ในสกุล Propionibacteria ซึ่งเรียกว่าเป็น propionic acid bacteria (Quesada-Chanto, 1994) พบครั้งแรกโดยแยกได้จาก Swiss cheese ที่ได้จากกระบวนการหมักจะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะทำให้เกิดลักษณะที่เป็นรูพรุนในเนยแข็ง

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียพวกนี้คือ ลักษณะแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีรูปร่างหลายแบบได้แก่ รูปร่างกลม ท่อนยาว หรือท่อนไม้กระบอง การเรียงตัวของเซลล์อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ มีการเจริญแบบแฟคคัลเททีฟแอนแอโรบ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส สามารถหมักได้กรดโพรพิโอนิก ซัคซินิก อะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์ มีความต้องการทางอาหารที่ซับซ้อน เจริญเติบโตช้า

แหล่งที่พบแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมหรือกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นม มีอยู่ทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ คือ *Propionibacterium freudenreichii P. jensenii P. theonii P. acidipropionici P. coccoides* และ *P. cyclohexanicum* ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสำคัญมากทางด้านอุตสาหกรรมต่างๆ และใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง อุตสาหกรรมการผลิตวิตามินบี12 การผลิตกรดโพรพิโอนิก การผลิตสารประกอบพวกเตตระไพโรล อุตสาหกรรมการทำขนมปัง ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมักหญ้าสำหรับใช้เลี้ยงสัตว์ และใช้ในการเตรียมยาบางชนิด



รูปที่ 2.3 เชื้อ *Propionibacterium freudenreichii*

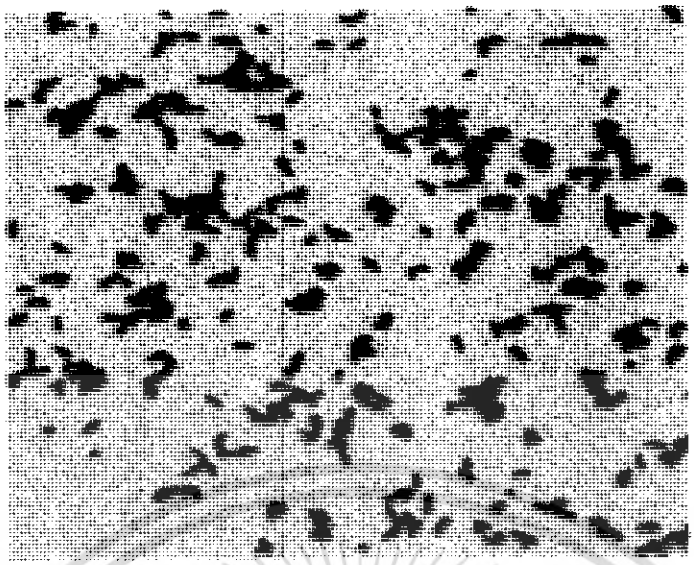
ที่มา : www.bio-pro.de/.../ ulm/aknebakterium_338x261.jpg

ส่วนกลุ่มที่สองคือ กลุ่มที่เจริญอยู่บนผิวหนังของมนุษย์หรือกลุ่มที่ทำให้เกิดสิวกลุ่มนี้ไม่ค่อยมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม (Lewis และคณะ, 1992)

รูปที่ 2.4 เชื้อ *Propionibacterium acnes*

ที่มา : www.pwsz.krosno.pl/. ../propioni.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 การย้อมแกรมของเชื้อ *Propionibacterium* sp.

2.5 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ Propionibacteria สายพันธุ์ต่างๆ

ปัจจัยหลักของการผลิตกรดโพรพิโอนิกขึ้นอยู่กับที่สายพันธุ์ของเชื้อดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ Propionibacteria สายพันธุ์ต่างๆ

Species	Strain reference	Propionic acid (70 h) g/l	pH (40)
Propionibacterium acidipropionici	ATCC 4965	9.8	4.65
	CNRZ 287	7.5	4.67
	CNRZ 721	2.0	5.67
	CNRZ 733	0.0	4.40
P. theonii	ATCC 4871	8.0	4.62
P. jensenii	ATCC 4870	0.0	5.82
	CNRZ 83	2.0	5.10
	ATCC 4867	0.0	5.10
	CNRZ 731	0.0	4.11
P. freudenreichii subsp. *freudenreichii*	NCIB 5959	0.0	5.82
	CNRZ 89	3.1	5.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Species	Strain reference	Propionic acid (70 h) g/l	pH (40)
P. freudenreichii subsp. *freudenreichii*	CNRZ 726	3.0	5.36
	CNRZ 727	3.2	5.10
	CNRZ 728	3.2	5.24
	CNRZ 729	3.2	5.31
P. freudenreichii subsp. *shermanii*	NCIB	3.7	5.15
	CNRZ	2.3	5.18
	SO-STANDA	6.0	4.51
	2908-STANDA	6.2	4.45
	7916-STANDA	0.6	5.90
	PSI-BOLL	0.8	5.20

ที่มา : Colomban และคณะ (1993)

2.6 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก

Virtanen (1923) ทดลองทำการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวตโดย Embden-Mayerhof pathway จากนั้นไพรูเวตจะเกิดปฏิกิริยาแยกได้ 2 ทาง คือ ทางที่หนึ่งจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นกรดอะซิติก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทางที่สองจะถูกรีดิวส์ไปเป็นกรดโพรพิโอนิก

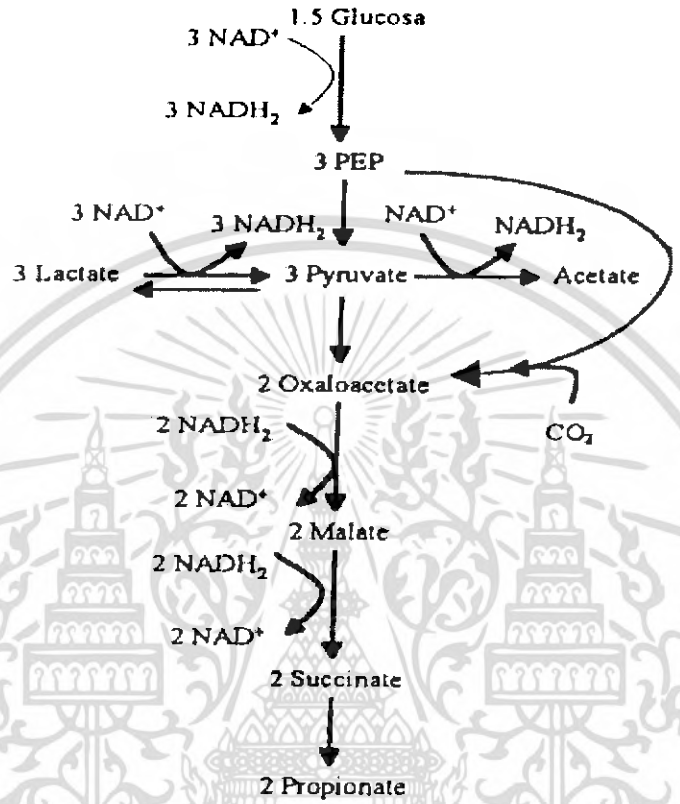
Van Niel (1928) ทำการศึกษาข้อแตกต่างของแบคทีเรียโพรพิโอนิกแต่ละสายพันธุ์ พบว่าการเปลี่ยนกลูโคส แลคเตท หรือไพรูเวตไปเป็นกรดโพรพิโอนิกนั้นจะมีอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติกอยู่ระหว่าง 1.6 ถึง 1.8 ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์

Wood และ Werkman (1940) ทำการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถเปลี่ยนกรดซัคซินิกไปเป็นกรดโพรพิโอนิก และคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณโมลเท่ากับโมลของซัคซินิกที่ใช้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ และได้กรดอะซิติกปริมาณเล็กน้อย และไม่พบผลผลิตอื่น

ในกระบวนการหมักโดยทั่วไปมักจะเกิดคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตผลสุดท้ายเสมอ สำหรับสิ่งมีชีวิตนั้นการสร้างซัคซิเนต (succinate) และโพรพิโอเนต (propionate) โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ การผลิตกรดโพรพิโอนิกสามารถเกิดขึ้นได้หลายวิถีด้วยกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ถูกใช้ไปในการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลผลิตโดยเชื้อ Propionibacteria โดยเริ่มจากสารตัวกลางที่สำคัญคือ ไพรูเวต (pyruvate) ออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) มาเลต (malate) และโพรพิโอเนต ตามลำดับ ดังรูป 2.6

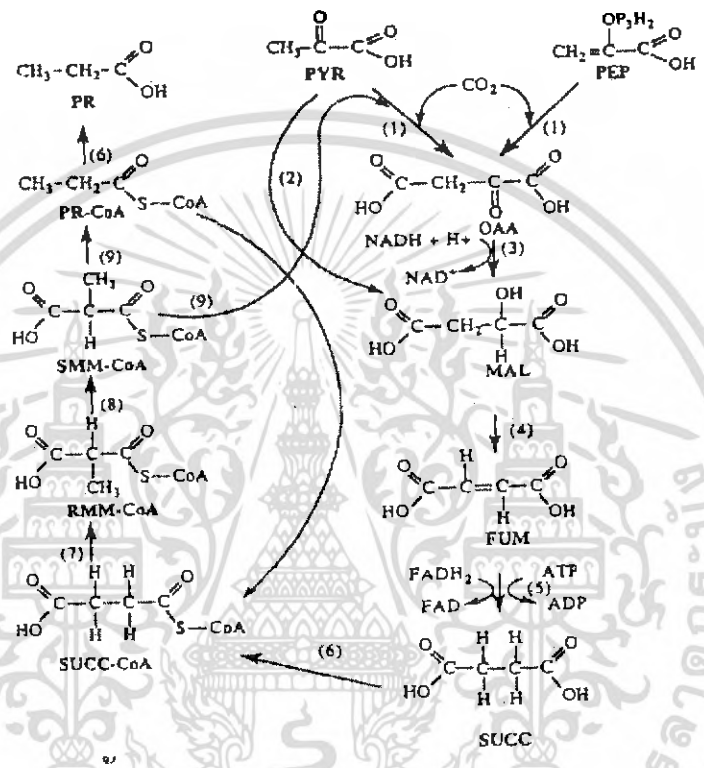


รูปที่ 2.6 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสและแลคเตทโดยเชื้อ Propionibacteria
ที่มา : Papoutsakis และ Meyer (1985)

การสร้างซัคซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ได้แสดงในรูปที่ 2.7 การสร้างจะเริ่มต้นจากการสร้างออกซาโลอะซิเตตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้กลับไพรูเวต หรือให้กับฟอสโฟอีนอลไพรูเวต (PEP) จะถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอล-มาเลต (L-malate) โดยการทำงานของเอนไซม์มาลิกดีไฮโดรจีเนส (malic dehydrogenase) กรดมาลิก(malic acid) ที่ได้จะถูกดึงน้ำออกโดยเอนไซม์ฟูมาเรส (fumarase) ทำให้ได้กรดฟูมาริก (fumaric acid) ซึ่งปฏิกิริยานี้ผันกลับได้ จากนั้นฟูมาเรสจะถูกเปลี่ยนให้เป็นซัคซิเนตโดยเอนไซม์ฟูมาเรตรีดักเทส (fumarate reductase) ซัคซิเนตเป็นตัวกลางในกระบวนการ โดยซัคซิเนตจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โคเอทรานสเฟอเรส (CoA transferase) ได้ซัคซินิลโคเอ (succinyl CoA) ปฏิกิริยาต่อไปนี้ซัคซินิลโคเอจะเปลี่ยนไปเป็น อาร์-เมททิล มาโลนิลโคเอ (R-methyl malonyl CoA) โดยเอนไซม์ อาร์-เมททิล มาโลนิลมิวเทส (R-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

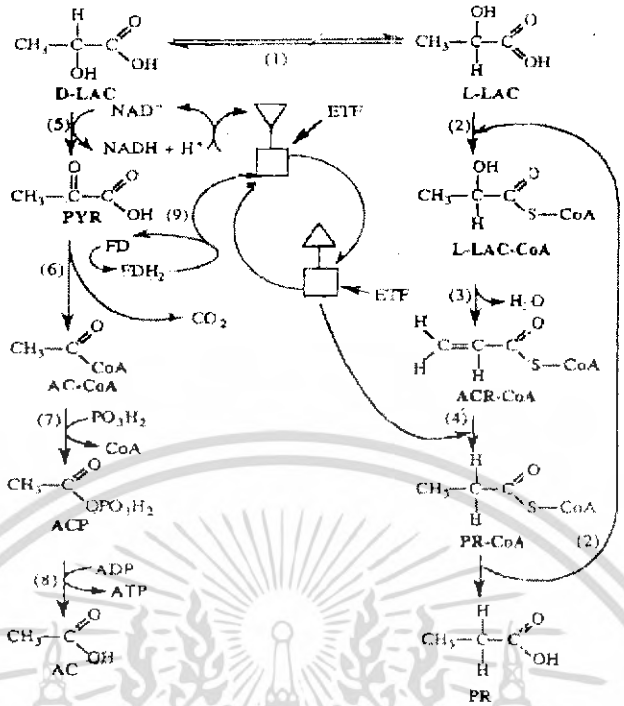
methyl malonylmutase) หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนอาร์-เมททิลมาโลนิลโคเอไปเป็นเอส-เมททิลมาโลนิลโคเอ (S-methyl malonyl CoA) คาร์บอนของเอส-เมททิลมาโลนิลโคเอ จะถูกย้ายออกไปรวมกลับไพรูเวต ทำให้เกิดการสร้างออกซาโลอะซิเตต เมื่อคาร์บอนเคลื่อนย้ายออกไปจะทำให้ได้โพรพิโอนิลโคเอ (propionyl CoA) จะถูกย้ายโคเอ (CoA) ออกจากโมเลกุล ทำให้โคเอที่จะนำไปใช้กับซัคซิเนตตัวต่อไปและทำให้ได้กรดโพรพิโอนิก (propionic acid)



รูปที่ 2.7 การสร้างซัคซิเนต และโพรพิโอเนต โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์
ที่มา : Papoutsakis และ Meyer (1985)

วิถีอะครีเลต (Acrylate) ของการสร้างโพรพิโอเนต รายละเอียดของวิถีนี้แสดงในรูปที่ 2.8 กรดโพรพิโอนิกจะถูกสร้างขึ้นตามลำดับโดยเริ่มต้นจากการเปลี่ยนรูปของแอล-แลคเตท (L-lactate) ไปเป็นแอล-แลคติลโคเอ (L-lactyl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์โคเอทรานสเฟอเรส (CoA transferase) แอล-แลคติลโคเอจะเปลี่ยนรูปกลายไปเป็น อะคริลิลโคเอ (acrylyl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีไฮดราเทส อะคริลิลโคเอ (dehydratase acrylyl CoA) จะเปลี่ยนไปเป็นโพรพิโอนิลโคเอโดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) โพรพิโอนิลโคเอจะย้ายโมเลกุลโคเอไปสู่แอล-แลคเตทเพื่อสร้างแอล-แลคติลโคเอ และเกิดเป็นกรดโพรพิโอนิกอิสระ การสร้างอะซิเตต (acetate) และคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดควบคู่กับการสร้างโพรพิโอเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 วิถีอะครีเลตของการสร้างโพรพิโอเนต
ที่มา : Papoutsakis และ Meyer (1985)

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

2.7.1 แหล่งคาร์บอน

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

แบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก ดังสมการ

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

และยังสามารถเปลี่ยนกรดแลคติกไปเป็นกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติกดังสมการ

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

(Tyree และคณะ, 1991)

Lewis และ Yang (1992) ทำการทดลองพบว่าในการหมักแบบเบ็ดเสร็จ *P. acidipropionici* ในอาหารที่มีแลคเตทที่พีเอช 6.6 จะเจริญได้น้อยกว่าในอาหารที่มีกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lewis และ Yang (1992) ได้ศึกษาผลของสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ที่ถูกตรึง โดยใช้น้ำตาลแลคโตส กลูโคส และแลคเตทเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นที่เท่ากัน พบว่าแลคเตทจะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่า

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาการเปลี่ยนน้ำตาลหรือกากน้ำตาลไปเป็นกรดโพรพิโอนิกของ *P. acidipropionici* ในกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จที่อัตราการเจือจาง 0.1 ต่อชั่วโมง ได้กรดโพรพิโอนิก 30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิต 0.36 ถึง 0.45 กรัมกรดโพรพิโอนิกต่อกรัมซูโครส และคิดเป็นอัตราการเกิดผลผลิตได้ 3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในการศึกษาความคงตัวของเซลล์ที่ถูกตรึงโดยทำการหมักแบบเบ็ดเสร็จใช้ *P. acidipropionici* P200910 พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกในรอบที่สิบจะมีค่าร้อยละ 50 ถึง 70 ของรอบที่หนึ่งโดยใช้อาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

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

Yang และ Huang (1995) ได้ทำการศึกษาโดยทดลองทำการหมักแบบ recycle batch จากเชื้อ *P .acidipropionici* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกจะได้ร้อยละ 90 ของผลผลิตทางทฤษฎี

Barbirato และคณะ (1997) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับกลูโคสและกรดแลคติก โดยเชื้อ 3 สายพันธุ์ คือ *Propionibacterium acidipropionici P. acnes* และ *Clostridium propionicium* ทำการหมักแบบกะ ใช้กลีเซอรอลเป็นสับสเตรทเริ่มต้นปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ผลผลิตส่วนใหญ่ที่ได้ คือกรดโพรพิโอนิก (0.844 โมลต่อโมล) และได้ผลิตผลพลอยได้ คือ กรดซัคซินิก (0.055 โมลต่อโมล) กรดอะซิติก (0.023 โมลต่อโมล) กรดฟอร์มิก (0.020 โมลต่อโมล) และ n-propanol (0.036 โมลต่อโมล) พบว่าเมื่อใช้กลูโคสและกรดแลคติกเป็นสับสเตรทจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกต่ำ คือร้อยละ 17 และร้อยละ 13 ตามลำดับซึ่งจะต่ำกว่าใช้กลีเซอรอลเป็นสับสเตรท นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นจะส่งผลให้อัตราการผลิตกรดสูงขึ้น (0.36 กรัมต่อลิตรชั่วโมง) และได้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกคือ 42 กรัมต่อลิตร

Himmi และคณะ (2000) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลและกลูโคส โดยเชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* ทำการหมักแบบกะในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ได้กรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ และได้ผลิตผลพลอยได้คือ กรดอะซิติก กรดซัคซินิก และ n-propanol

Ko และ Chu (2004) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการตรึงเซลล์ เพื่อศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยศึกษาจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ กลูโคส ฟรุคโตส ซอร์บิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67280

แลคโตส มอลโทส เด็กซ์แตรน และซูโครส พบว่าแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

2.7.2 แหล่งไนโตรเจน

สมใจ (2527)ได้ทำการทดลองศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium* sp. Arl AKU 1251 พบว่าสารสกัดยีสต์มีผลต่อการเจริญของเชื้อมากโดยใน complete medium ที่ขาดสารสกัดยีสต์ เชื้อจะเจริญได้น้อยในขณะที่ขาด pancreatic digest of casein หรือ acid hydrolysate of casein เชื้อยังคงมีอัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกับ complete medium

Prescott และ Dunn (1959) พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่ออัตราการหมักและอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติก *Propionibacterium shermanii* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด สารสกัดยีสต์ เนื้อสัตว์ แต่สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

Colomban และคณะ (1993) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้แหล่งไนโตรเจนได้แก่ สารสกัดยีสต์ ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด โปรตีนเวย์เข้มข้น พบว่าเมื่อใช้สารสกัดยีสต์ผลิตกรดโพรพิโอนิกจะได้ปริมาณสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ

Yang และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในหางนมหรือเวย์ โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนคือ สารสกัดยีสต์ และ ทริปทิเคสซอยบรอท พบว่าจะได้ปริมาณกรดสูงสุดเมื่อใช้สารสกัดยีสต์ และทริปทิเคสซอย บรอทเติมลงไปในเวย์ปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

Yang และ Huang (1995) ศึกษาการหมักแบบเบ็ดเสร็จของ *P.acidipropionici* พบว่าเมื่อเพิ่มสารสกัดยีสต์ร้อยละ 1 ลงในอาหารจะได้อัตราการผลิต 0.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าอาหารที่ไม่เติมสารสกัดยีสต์

2.7.3 พีเอชของอาหาร

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

Lewis และ Yang (1992) ได้มีการศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิดกรดโพรพิโอนิก พบว่าเมื่อใช้แลคเตทเป็นสารที่ใช้ในการหมักซึ่งมีพีเอชเริ่มต้น 6.0 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับแลคโตสและกลูโคสที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Colomban และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยทำการศึกษาที่พีเอช 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 โดยเชื้อที่ใช้ศึกษาคือ *Propionibacterium acidipropionici P. jensenii P.theonii P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* และ*P. freudenreichii* subsp. *shermanii* พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ที่ทำการหมักโดยใช้พีเอชเริ่มต้น 6.5 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 6.5 จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด

2.7.4 อุณหภูมิ

โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญอยู่ระหว่าง 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส (Cavin และคณะ, 1985) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของ *Propionibacterium jensenii* คือ 30 องศาเซลเซียส (Colomban และคณะ, 1993) การผลิตกรดโพรพินิกจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิไปถึง 37 องศาเซลเซียส แต่อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติกจะลดลง(Chanpagne และคณะ, 1989)

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

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้ทำการทดลองศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตวิตามินบี 12

Yang และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 โดยใช้อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

2.7.5 การให้อากาศ

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

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ดีที่สุดในสภาวะไม่มีอากาศเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตกรดอะซิติก การผลิตวิตามินบี 12 จะเพิ่มมากขึ้น

2.7.6 ปัจจัยอื่นๆ

แหล่งเกลือแร่

Gebgardt และคณะ (1970) ศึกษาพบว่าโคบอลท์มีอิทธิพลต่อการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโคบอลท์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเชื้อ *P. shermanii* ร้อยละ 55 ถึง 60 ของน้ำหนักแห้ง แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโคบอลท์การเจริญของเชื้อจะลดลง

Quesada – Chanto และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาพบว่าเหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญของ *P. shermanii* โดยเมื่อเติม $FeSO_4.2H_2O$ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารจะเป็นความเข้มข้นปริมาณที่เหมาะสมในการเจริญ

แหล่งวิตามิน

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

2.8 High – Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC เป็นวิธีการหนึ่งของการแยกทางโครมาโทกราฟี ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นของเหลวพาสารละลายตัวอย่างไหลผ่านเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ที่เป็นอนุภาคเล็กซึ่งบรรจุอัดแน่นในท่อ Stainless ที่เรียกว่าคอลัมน์ (column) ทำให้เกิดการแยกสารประกอบจากสารละลายตัวอย่างเข้าสู่เครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) การไหลของเฟสเคลื่อนที่นี้ต้องอาศัยแรงดันมาพอสมควร จึงจะสามารถส่งผ่านไปทั้งระบบได้ ส่วนที่เป็นหลักในการสร้างแรงดันคือปั๊ม (pump) นั่นเอง

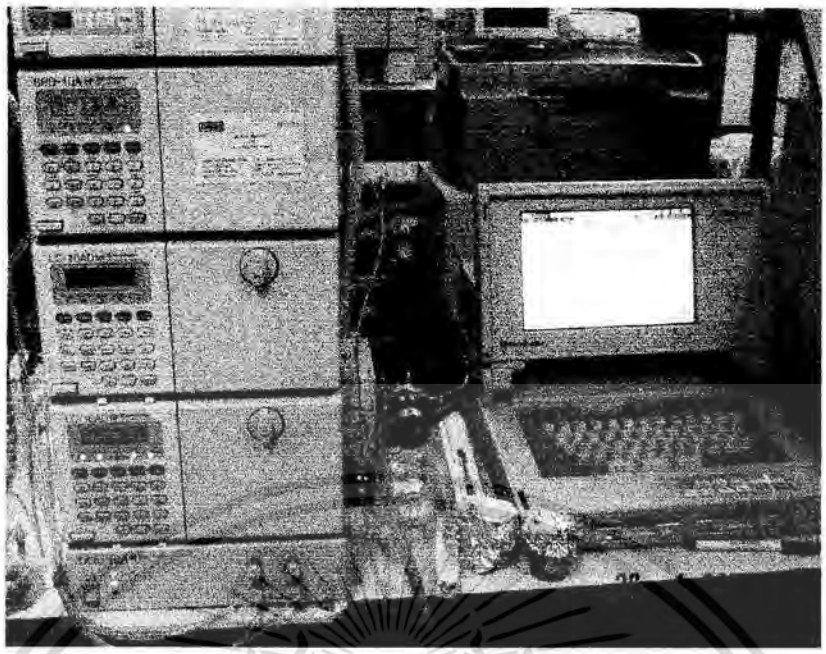
ดังนั้นคำว่า HPLC จึงมีความหมายได้ว่า

High Performance Liquid Chromatography

High Pressure Liquid Chromatography

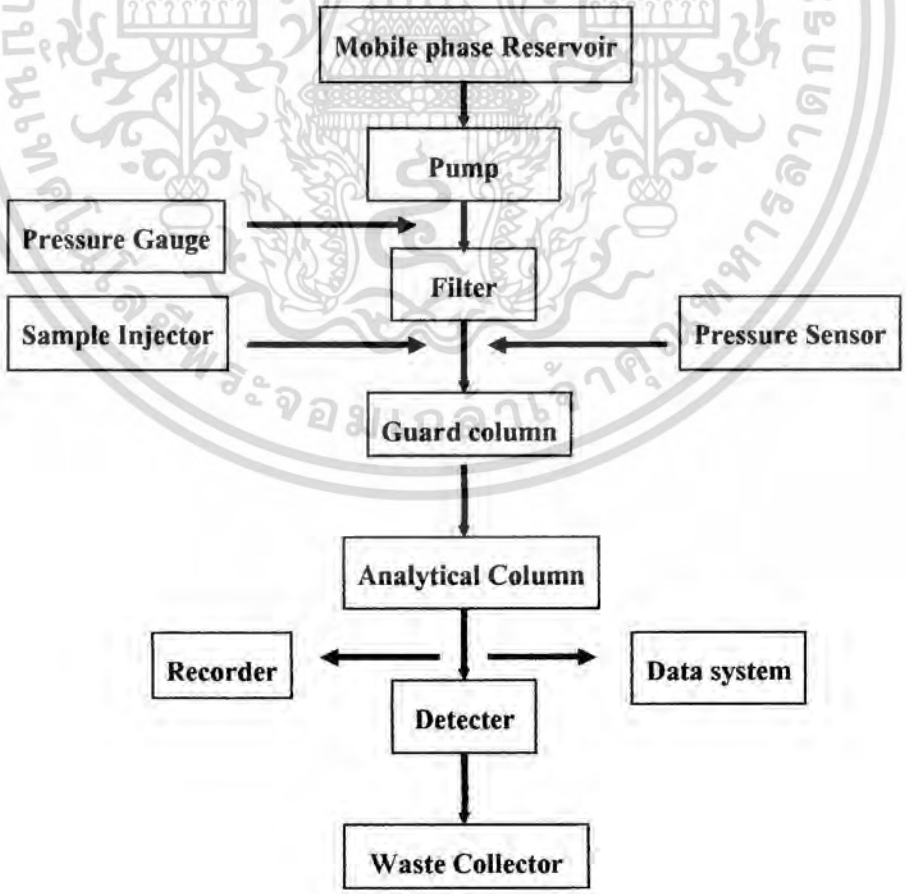
High Speed Liquid Chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 เครื่อง High – performance liquid chromatography (HPLC)

2.8.1 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase reservoires)

ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ ควรเป็นขวดแก้วเพื่อจะได้ไม่เกิดปฏิกิริยาทางเคมีใดๆ กับเฟสเคลื่อนที่ ในปัจจุบันขวดที่ใส่เฟสเคลื่อนที่นี้จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่อาจละลายอยู่ จุดประสงค์ของการไล่อากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ก็คือ ต้องการกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่กับเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหาขณะทำการทดลองอยู่

สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ และสารละลายของเกลือชนิดต่างๆ ที่ถูกปรับ pH ให้มีค่าที่เหมาะสมกับการแยก ในกรณีที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ ควรบรรจุในขวดแก้วสีชา เพื่อลดความเข้มของแสงที่จะทำให้แบคทีเรีย หรือจุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำเจริญเติบโตได้ดี

คุณสมบัติที่ดีของเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ใน HPLC คือ

1. มีความบริสุทธิ์สูง
2. ละลายสารตัวอย่างได้ดี
3. มีความหนืดต่ำ
4. ปราศจากผง ฝุ่น และอนุภาคที่จะทำให้ระบบอุดตัน
5. เหมาะสมกับเครื่องวัดสัญญาณ (Detector)
6. ไม่ทำปฏิกิริยากับเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase)
7. ปัจจัยอื่นๆ ที่ควรคำนึงถึง คือ ความเป็นพิษ จุดเดือด การติดไฟ และราคา

2. ระบบของปั๊ม (Pumping system)

ทำหน้าที่สูบดันเฟสเคลื่อนที่เข้าคอลัมน์ในอัตราเร็วที่กำหนดได้อย่างแม่นยำ ความดันของระบบจะขึ้นอยู่กับอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ หากถ้ากำหนดให้มีอัตราเร็วในการไหลของเฟสเคลื่อนที่สูง ความดันของปั๊มก็จะมีค่าสูง โดยปกติความดันที่ใช้ใน HPLC ไม่ควรเกิน 400 บาร์ แต่หากขณะอ่านผลจากเครื่องโครมาโทแกรม (chromatogram) ความดันของปั๊มเกิดลดลงอย่างมากจนเกือบ 0 บาร์ แสดงว่าต้องมีการรั่ว (Leak) ในเครื่องให้ตรวจสอบและแก้ไข และในทางตรงกันข้ามถ้าความดันมีค่าสูงเกิน 400 บาร์ แสดงว่ามีสิ่งอุดตันในระบบ ต้องตรวจสอบและแก้ไข โดยระบบปั๊มมี 2 ชนิด ได้แก่

2.1 Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่ ปั๊มประเภทนี้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

(1) Syringe pump เป็นปั๊มที่มีลักษณะเป็นกระบอกสูบ

(2) Reciprocating pump เป็นปั๊มที่มีลักษณะเป็นแบบชักลูกสูบ

2.2 Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลักการเลือก Pumping system

- ปั๊มและส่วนประกอบต้องทำด้วยวัสดุที่ทนต่อการสึกกร่อนด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ และสะดวกต่อการบำรุงรักษา
- ปั๊มเฟสเคลื่อนที่ในปริมาตรมากๆ ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีขัดข้อง
- สามารถให้ความดันได้ถึง 4,000 ถึง 6,000 psi เพื่อปั๊มผ่านคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กได้ อย่างน้อยต้องให้ความดันถึง 500 psi
- สามารถให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงถึง 3 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นอย่างน้อยและคงที่
- ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต้องไม่เกินร้อยละ 1 ถึง 2
- ควรมีปริมาตรภายในต่ำเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

3. หน่วยฉีดสารตัวอย่าง (Injection Unit)

การฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์ต้องมีความเที่ยงตรง และแม่นยำสูง ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ต้องไม่เกินขีดจำกัด หรือทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง

โดยทั่วไปแล้ว Injector มีให้เลือกใช้ทั้งชนิด Manual และ Auto

4. คอลัมน์ (Column)

ในส่วนของคอลัมน์ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Guard column และ Analysis column

4.1 Guard column โดยปกติส่วนมากที่ใช้มีขนาด 5.0 เซนติเมตร x 4.6 มิลลิเมตร วัสดุที่บรรจุภายในเป็นประเภทเดียวกับคอลัมน์ที่ใช้แยก แต่มีอนุภาคใหญ่กว่าหรือเท่ากันกับคอลัมน์ ทำหน้าที่กรอง Particle ช่วยยืดอายุการใช้งานของ Analytical column

4.2 Seperating Column โดยมากทำด้วย Stainless Steel ซึ่งทนต่อความดันสูงๆ ได้ดี ผิวด้านในเรียบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากันตลอด โดยปกติที่ใช้งานทั่วไปมีขนาดดังนี้

เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก	6.35	มิลลิเมตร (1/4 นิ้ว)
เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน	4.6	มิลลิเมตร
ความยาว	10 ถึง 100	เซนติเมตร
ขนาดของ Particle	5.50	ไมโครเมตร

แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

4.2.1 คอลัมน์สำหรับงานวิเคราะห์ (Analytical column) เป็นคอลัมน์ที่ใช้สำหรับงานวิเคราะห์ทางคุณภาพและทางปริมาณ

4.2.2 คอลัมน์สำหรับเตรียมตัวอย่าง (Preparative column) เป็นคอลัมน์ที่ใช้แยกสารผสมออกจากกัน แล้วเก็บแต่ละส่วนที่แยกออกจากกันได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เครื่องตรวจวัด (Detector) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

5.1 Solute property หรือ selective detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น

(1) UV – VIS Detectors

หลักการ คือ อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง นิยมใช้กันมากใน HPLC เพราะเครื่องตรวจนี้มีลักษณะที่พิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหล และอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างจะมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

- Fixed wavelength UV detector
- Variable UV detector
- Photodiode array detector (PDA)

(2) Fluorescent Detector

มีสภาพไวสูงและมีความเฉพาะเจาะจง เนื่องจากมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวีจากแหล่งกำเนิด โดยผ่านเครื่องกรองแสง หรือ โมโนโครเมเตอร์ เพื่อให้แสงที่มีความยาวคลื่นตามที่ต้องการผ่านเข้าไปยัง flow cell ที่ใส่สารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์ สารตัวอย่างจะให้ฟลูออเรสเซนต์ออกมาซึ่งมีความยาวคลื่นเฉพาะจะผ่านไปยังฟิลเตอร์หรือโมโนโครเมเตอร์เพื่อตัดแสงที่ไม่ต้องการออก จากนั้นจึงให้แสงผ่านเขาไปยังดีเทคเตอร์ซึ่งเป็นโฟโตเซลล์

5.2 Bulk property หรือ general detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมกับของตัวถูกละลาย

(1) เครื่องดิฟเฟอเรนเชียล รีแฟรกโตมิเตอร์ (Differential refractometers)

ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดรรชนีหักเห (refractive index, RI) อย่างต่อเนื่องระหว่างเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายอยู่ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ ให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด ตราบที่ตัวถูกละลายมีค่าดรรชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่ โดยเครื่องวัด RI มีอยู่ 3 ชนิด คือ

- เครื่อง Fresnel refractometer
- เครื่อง Deflection refractometer
- เครื่อง Interferometric refractometer

6. เครื่องบันทึกข้อมูล และประมวลผล (Recorder and Data procession)

ปัจจุบันการบันทึกข้อมูล และประมวลผลต่างๆ สามารถทำได้โดยใช้โปรแกรมที่บริษัทผู้ผลิตเครื่องมือเป็นผู้สร้างขึ้น และระบบการทำงานของเครื่องมือทั้งหมดถูกควบคุมได้ด้วยคอมพิวเตอร์ ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง และเที่ยงตรงมากขึ้น ข้อมูลที่ถูกบันทึกไว้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน่วยความจำของเครื่องคอมพิวเตอร์ทำให้ผู้วิเคราะห์มีความสะดวก และง่ายในการนำข้อมูลมาประมวลผล และเก็บผลนั้นไว้ได้โดยไม่สิ้นเปลืองกระดาษบันทึกผล

2.8.2 ขั้นตอนในการใช้ HPLC

1. การเตรียมสารละลายที่จะใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่

เตรียมสารละลายของเฟสเคลื่อนที่ให้มีความเข้มข้นและปริมาณตามที่ต้องการ ซึ่งขึ้นอยู่กับเรื่องที่จะทำการทดลอง และต้องกรองเฟสเคลื่อนที่ด้วยแผ่นเมมเบรนขนาด 0.2 หรือ 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปใช้ด้วยชุดกรอง ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรนต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของตัวทำละลายด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรนที่เหมาะสมกับตัวทำละลายแต่ละชนิด

ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรน	ตัวทำละลายที่เหมาะสม
Cellulose	ใช้ได้กับสารละลาย Aqueous
Nitrocellulose	ใช้ได้กับสารละลาย Aqueous
Nylon 66 R	ใช้ได้ทั้งสารละลาย Aqueous และ non Aqueous แต่ไม่เหมาะสมกับกรด หรือเบสแก่

ในกรณีที่ไม่ได้ติดตั้ง Online degasser ให้นำสารละลายที่กรองแล้วนี้ ไปทำการไล่ฟองอากาศออกด้วยการ Purge ด้วย Helium gas หรือนำไปเข้าเครื่อง Ultrasonic bath เป็นเวลา 15 ถึง 30 นาที ก่อนใช้งาน

2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ตัวอย่างที่จะนำเข้าไปฉีดในระบบต้องสะอาดเพียงพอ คือปราศจากสิ่งปนเปื้อนที่จะไปลดหรือทำลายประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ และจะต้องไม่มีตะกอนหรือฝุ่นผง ดังนั้นตัวอย่างต้องผ่านขั้นตอนในการเตรียมที่เหมาะสมเพื่อขจัดมลทินออไป วิธีกำจัดสิ่งปนเปื้อนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

- Liquid – Liquid Extraction
- Solid – Phase Extraction
- Supercritical Fluid Extraction

เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างนั้นๆแล้ว ก่อนฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ควรกรองตัวอย่างด้วย syringe membrane filter ขนาด 0.20 ไมโครเมตร ก่อน

หมายเหตุ เฟสเคลื่อนที่และตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างควรเป็นเกรด HPLC เพื่อผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และอายุการใช้งานของคอลัมน์ที่ยาวนาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เลือกคอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่ (Column selection and Mobile phase selection)

เมื่อต้องการอ่านผลการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ต้องศึกษาคุณสมบัติของสารตัวอย่างเพื่อเลือกคอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่ให้ถูกต้อง ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดในการทำปฏิบัติการทดลอง การเลือกขึ้นอยู่กับชนิด และคุณสมบัติของตัวอย่างว่าเป็นประเภทใด

ปัจจุบันคอลัมน์ที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทต่างๆ คือ bond– phase column ที่มีหมู่ฟังก์ชันนอลได้หลายชนิด มีทั้งที่เป็นมีขั้ว เช่น cyano หรือ amino (ทำให้เกิดการวิเคราะห์แบบ normal phase) และไม่มีขั้ว เช่น octadecyl (ทำให้เกิดการวิเคราะห์แบบ reverse phase) โดยคอลัมน์ที่นิยมใช้มากกว่า คือ reverse phase column ชนิด C_8 หรือ C_{18} ซึ่งสามารถแยกได้ทั้งสารตัวอย่างที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ในกรณีของตัวอย่างที่มีขั้วจะใช้หลักการของ ion – pair เมื่อต้องการให้เกิดการแยก สามารถใช้วิธีปรับเปลี่ยนค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่หรือความเข้มข้นของ pairing ion ในกรณีของสารตัวอย่างไม่มีขั้วสามารถทำให้เกิดการแยกได้โดยปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่

4. การอ่านผล

ควรทำการศึกษาวิธีการใช้เครื่อง HPLC อย่างละเอียดก่อนทำการอ่านผลผ่านเครื่องโครมาโทแกรม และเมื่ออ่านผลเสร็จแล้วต้องทำการบันทึกข้อมูลไว้ในโฟลเดอร์ ที่จำเพาะของการเก็บข้อมูล และเป็นของแต่ละผู้วิเคราะห์ ไม่ควรปะปนกัน เพื่อความสะดวกในการเรียกข้อมูลมาทำการประเมินและแปลผล

(ที่มา : www.2sat.psu.ac.th/centrallab/instr%2HPLC.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการ

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กับเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) การปริมาณน้ำตาล ดูในภาคผนวก

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

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

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของบริษัท Eppendorf

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของบริษัท Memmert

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200S

เครื่องวัดพีเอช ของบริษัท Cyberscan 2000

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo

ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina flow) ของบริษัท Microflow รุ่น Model ABS1200

ตู้อบอุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส ของบริษัท WTB binder รุ่น FD53

ตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ของบริษัท WTB binder รุ่น ED53

ตู้อบอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ของบริษัท AsteII Hearson

โถดูดความชื้น (desicator)

ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX^{R}

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^{R}

กระบอกตวง (cyclinder) ของบริษัท PYREX^{R}

บีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท PYREX^{R}

ปิเปตต์ (pipette)

คิวเวต (แก้ว)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)

ทริปทิเคส ซอย บรอท (trypticase soy broth)

เปปโตน (peptone)

แลคโตส (lactose)

ดี-กลูโคส (D-glucose)

ซูโครส (sucrose)

น้ำตาลทราย (cane-sugar)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)

อาหารสังเคราะห์ MRS

วุ้น (agar)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ใช้ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโพรพิโอนิก จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในทดลอง

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อจำนวน 1 ลูป แล้วลาก (streak) ลงบนอาหารวุ้นเอียง (nutrient slant agar) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันจุกสำลีที่ปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว (MRS broth) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

สารสกัดยีสต์	10	กรัมต่อลิตร
ทริปทิเคส ซอย บรอท	5	กรัมต่อลิตร
แลคโตส	20	กรัมต่อลิตร
Minor element ซึ่งประกอบด้วย		
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.20	กรัมต่อลิตร

ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5-7 แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อโดยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5 การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

3.5.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

โดยใช้สูตรอาหารที่ทำให้เชื้อผลิตกรดโพรพิโอนิกได้จากข้อ 3.4 โดยผันแปรชนิดของแหล่งคาร์บอน ดังนี้

สูตรที่ 1 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 ซึ่งใช้แลคโตส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 โดยเปลี่ยนสารอาหารจากแลคโตส 20 กรัมต่อลิตร เป็นกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 โดยเปลี่ยนสารอาหารจากแลคโตส 20 กรัมต่อลิตร เป็นซูโครส 20 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 โดยเปลี่ยนสารอาหารจากแลคโตส 20 กรัมต่อลิตร เป็นน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร

เตรียมอาหารแต่ละสูตรใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปริมาตรอาหารรวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรฟลาสก์ (ปริมาตรอาหาร 190 มิลลิลิตร รวมกับหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง (stationary flask) เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณชีวมวลตามวิธีของ AOAC.,2000 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก และกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC และวัดปริมาณน้ำตาล โดยวิธีการวิเคราะห์ของ Dubois (1956)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 ศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

เลือกแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุดจากข้อ 3.5.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ดังนี้

สูตรที่ 1 : สูตรอาหารที่เลือกจากข้อ 3.5.1 ใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 2 : สูตรอาหารที่เลือกจากข้อ 3.5.1 ใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 : สูตรอาหารที่เลือกจากข้อ 3.5.1 ใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร

ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 5.0 แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อโดยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยเตรียมอาหารแต่ละสูตรใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปริมาตรอาหารรวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรฟลาสก์ (ปริมาตรอาหาร 190 มิลลิลิตร รวมกับหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง (stationary flask) เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณชีวมวลตามวิธีของ AOAC.,2000 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก และกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC และวัดปริมาณน้ำตาล โดยวิธีการวิเคราะห์ของ Dubois (1956)

3.6 การวิเคราะห์ผล

1. วัดชีวมวลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2. วัดชีวมวลโดยวัดน้ำหนักแห้ง โดยนำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำใส่โถดูดความชื้น (desicator) ทิ้งให้เย็น วัดน้ำหนักของชีวมวลที่ได้

3. การวัดปริมาณกรดโพรพิโอนิก กรดแลคติก และกรดอะซิติก ด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) นำน้ำหมักไปกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใช้ Inersil C8-3 column ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3.0) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส (ตรวจหาจากส่วนใสของตัวอย่าง จากการปั่นเหวี่ยงจาก ข้อ 2)

4. การวัดปริมาณน้ำตาล โดยวิธีการวิเคราะห์ของ Dubois (1956)

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

แต่ละการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างอิสระโดยสมบูรณ์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติใช้ของ SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) การเปรียบเทียบใช้การทดสอบของ LSD (Least significant differences) สำหรับการเปรียบเทียบจำนวนมากทดสอบที่ $P \leq 0.05$ ในการพิจารณาว่ามีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

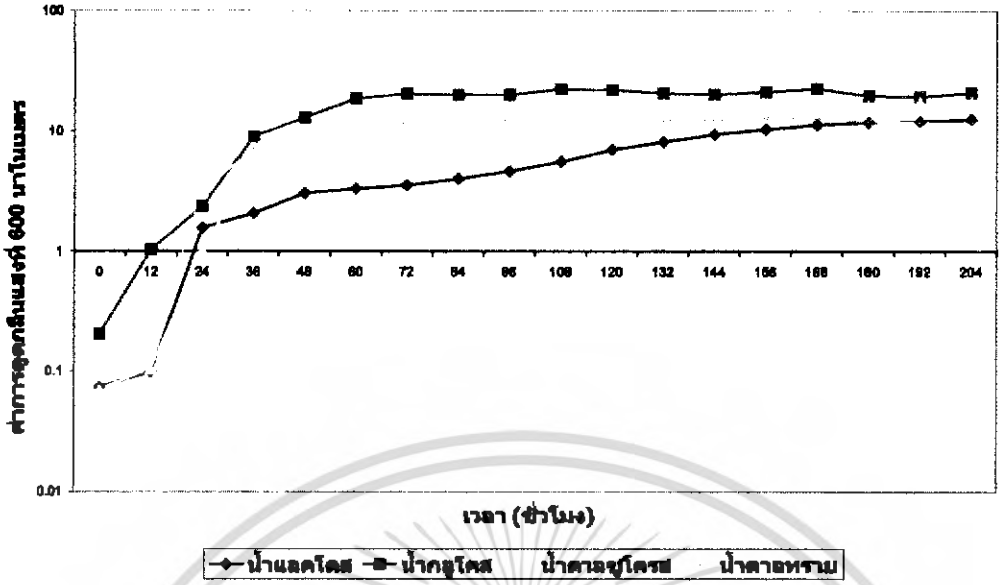
4.1.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่ต่างกัน 4 ชนิด คือ น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทราย พบว่าในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทราย เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน โดยมีช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด (maximum log) ณ ชั่วโมงที่ 60 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 18.603, 12.126 และ 11.132 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และเมื่อนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์จะมีค่าเท่ากับ 0.0177, 0.0128 และ 0.0119 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ส่วนในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 48 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 3.51 ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และเมื่อนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์จะมีค่าเท่ากับ 0.0064 กรัม ดังแสดงในรูปที่ 4.2 หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วงที่มีการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) โดยเก็บเชื้อครั้งสุดท้าย ณ ชั่วโมงที่ 204 ซึ่งจะสังเกตได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักแห้งของเซลล์

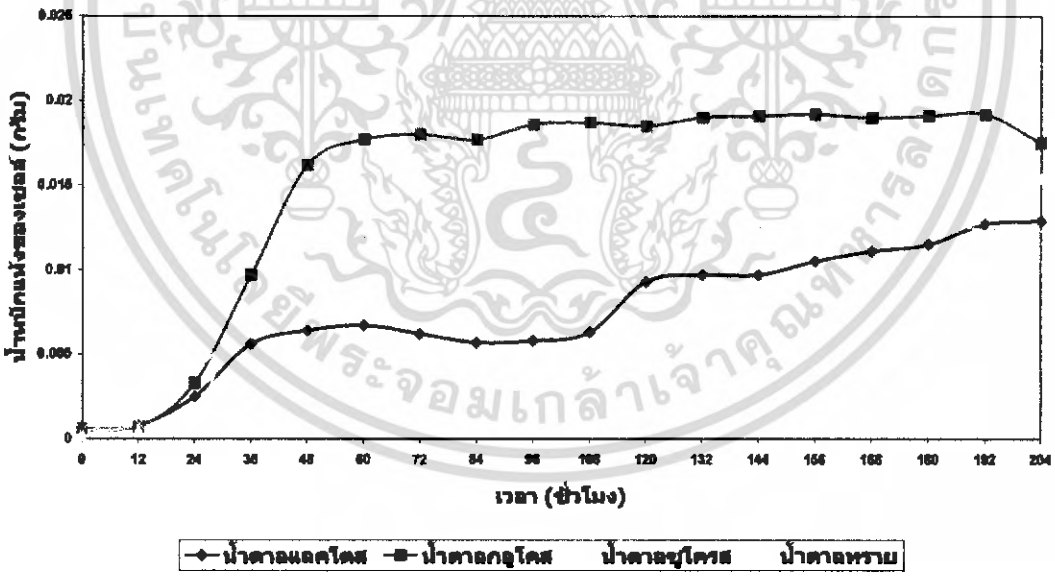
4.1.2 การศึกษาปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

การศึกษาปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่ต่างกัน 4 ชนิดคือ น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทราย พบว่า น้ำตาลซูโครสสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุด คือ 8.33 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 192 คำนวณเป็นผลได้ (yield) และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ ได้เท่ากับ 0.5519 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 2.0069 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังในตารางที่ 4.1 รองลงมาคือน้ำตาลทรายผลิตกรดได้ 7.98 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน



รูปที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

120 คำนวณเป็นผลได้และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.5474 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 2.1304 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังในตารางที่ 4.1 ในขณะที่น้ำตาลกลูโคสผลิตกรดได้ 6.41 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 180 คำนวณเป็นผลได้และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.4471 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.0637 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังในตารางที่ 4.1 และน้ำตาลแลคโตสผลิตกรดได้ 3.27 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 คำนวณเป็นผลได้และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.3459 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.0761 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ดังในตารางที่ 4.1 เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าน้ำตาลแลคโตสให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลผลิตกรดที่ได้จากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทราย และน้ำตาลกลูโคสให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลผลิตกรดที่ได้จากน้ำตาลซูโครส ส่วนน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายซึ่งให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกปริมาณสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4.3 เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงนำน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดมาทำการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่อไป

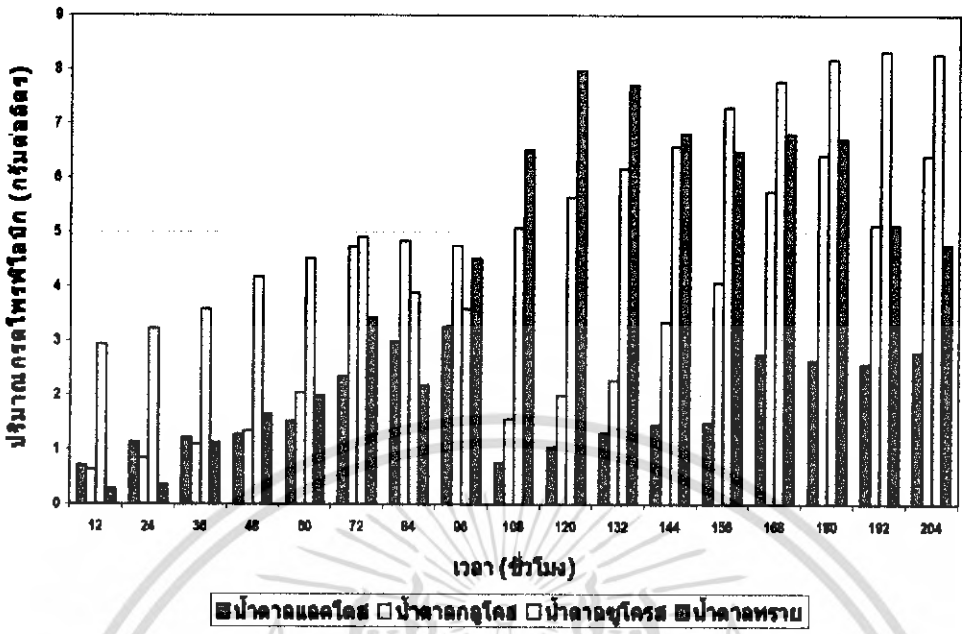
ตารางที่ 4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

แหล่งคาร์บอน	ชั่วโมง	พีเอช	ผลผลิตกรด (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของกรด (กรัมต่อกรัมสับสเตรท)	อัตราการผลิตกรด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
แลคโตส	96	4.79	3.2727	0..3459	1.0761
กลูโคส	180	3.87	6.4167	0.4471	1.0637
ซูโครส	192	3.95	8.3337	0.5519	2.0069
น้ำตาลทราย	120	4.06	7.9811	0.5474	2.1304

4.1.3 การศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

ในอาหารสังเคราะห์ 4 สูตรที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบต่างกัน 4 ชนิดคือ น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทราย โดยในแต่ละสูตรจะมีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และในระหว่างกระบวนการหมักเชื้อจะใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโต ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นน้ำตาลลดลง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสลดลงเหลือ 5.70 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 71.50 ของปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



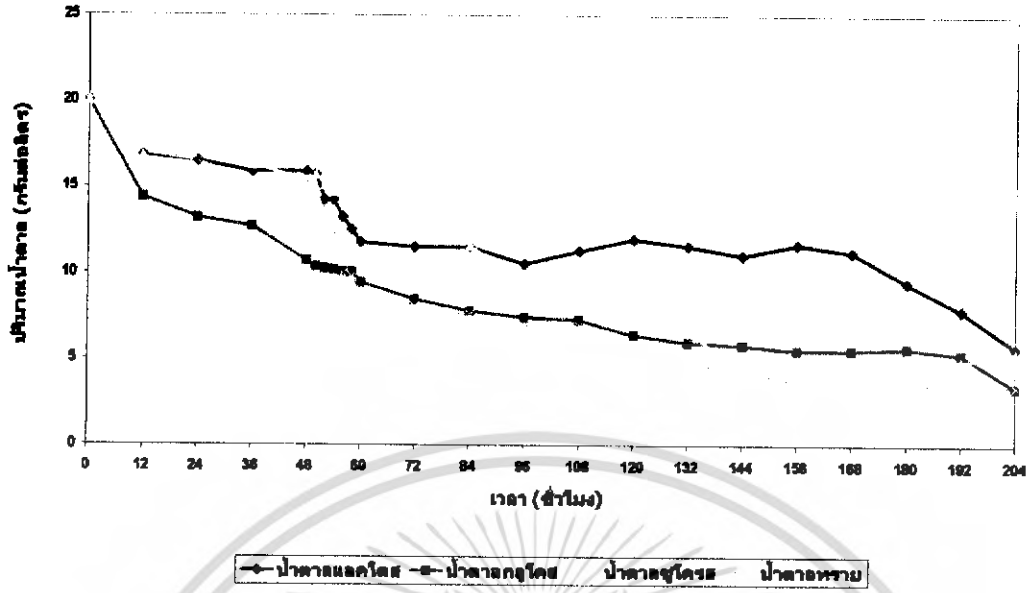
รูปที่ 4.3 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

น้ำตาลที่ถูกใช้ไป น้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 3.40 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 83.00 ของปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป น้ำตาลซูโครสลดลงเหลือ 5.43 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 72.82 ของปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป และน้ำตาลทรายลดลงเหลือ 3.45 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.75 ของปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ดังแสดงในรูปที่ 4.4

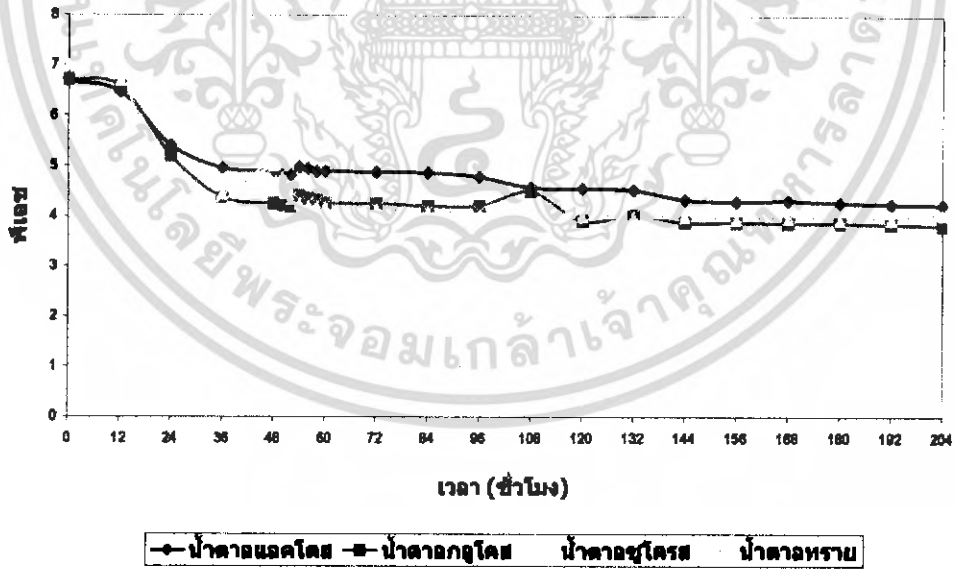
4.1.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

จากการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด– ด่างในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 4 สูตรจะมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกัน คือ ในชั่วโมงที่ 0 (เริ่มกระบวนการหมัก) ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำตาลแลคโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทรายคือ 6.69, 6.72, 7.0 และ 6.97 ตามลำดับ โดยค่าความเป็นกรด – ด่างจะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 60 และหลังจากนั้นค่าความเป็นกรด – ด่าง จะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงความเป็นกรด – ด่าง ระหว่าง 4 ถึง 4.8 ดังแสดงในรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด - ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

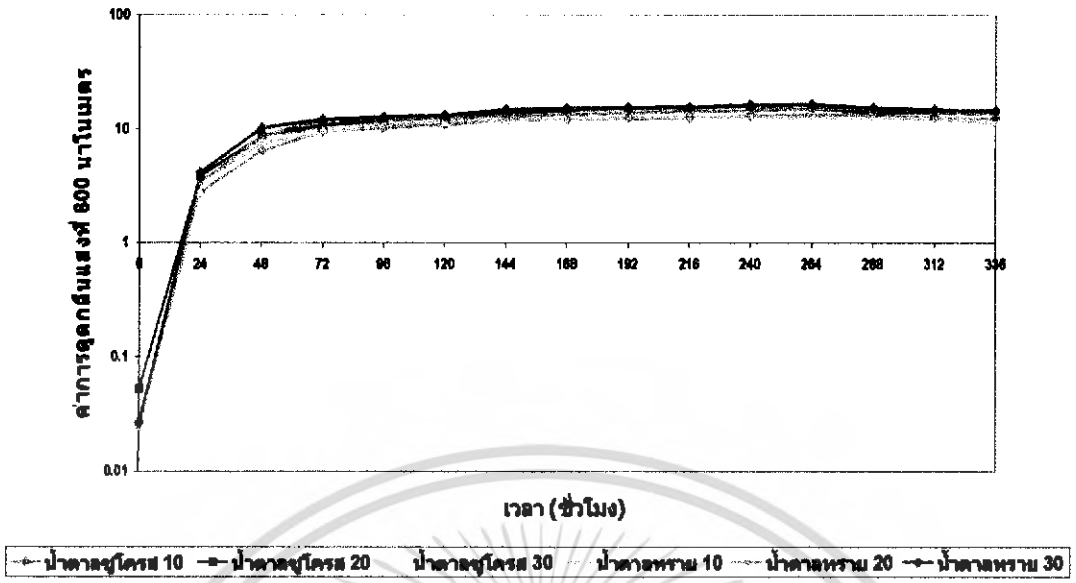
4.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรความเข้มข้นที่ 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 6 สูตรจะมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน โดยมีช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด (maximum log) ณ ชั่วโมงที่ 72 โดยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 9.405 และเมื่อนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์จะมีค่าเท่ากับ 0.0093 น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 10.765 และเมื่อนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์จะมีค่าเท่ากับ 0.0099 น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 9.87 และเมื่อนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์จะมีค่าเท่ากับ 0.0101 น้ำตาลทรายความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 9.265 เมื่อนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์จะมีค่าเท่ากับ 0.0096 น้ำตาลทรายความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 11.883 เมื่อนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์จะมีค่าเท่ากับ 0.0113 และน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 12.090 เมื่อนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์จะมีค่าเท่ากับ 0.0123 หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วงที่มีการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) โดยเก็บเชื้อครั้งสุดท้าย ณ ชั่วโมงที่ 336 ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7 โดยสังเกตได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักแห้งของเซลล์

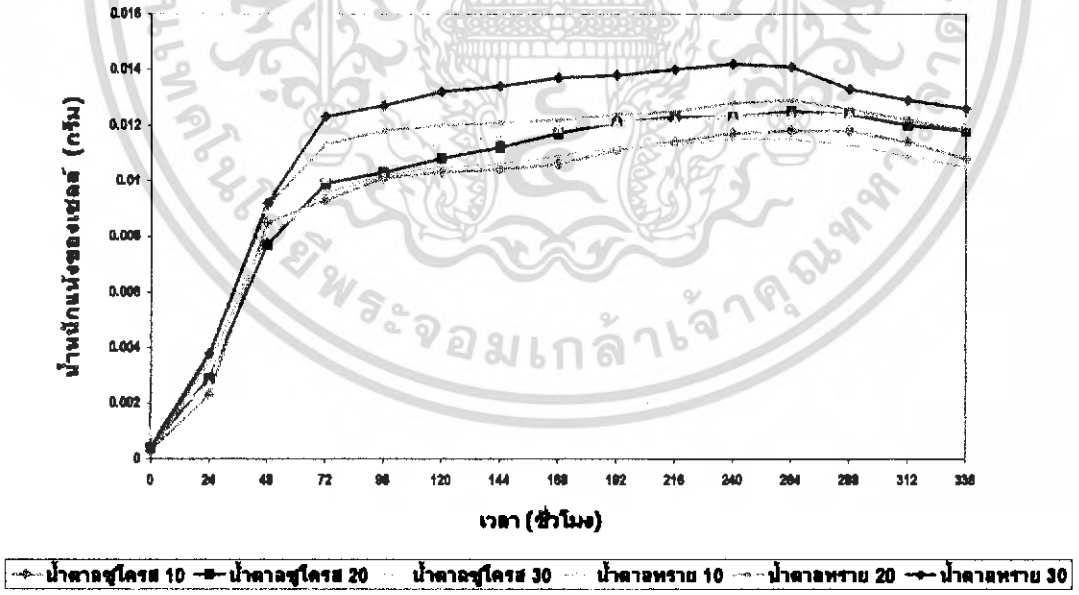
4.2.2 การศึกษาปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษาปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 5.07 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 264 คำนวณเป็นผลได้ (yield) และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.5645 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.8265 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC4965 เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.7 น้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรผลิตกรดได้ 5.75 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 336 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.4101 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.8563 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรผลิตกรดได้ 6.57 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 336 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.3106 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.9259 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 น้ำตาลทรายความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรผลิตกรดได้ 5.94 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 312 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.6279 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.6747 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 น้ำตาลทรายความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรผลิตกรดได้ 6.08 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 336 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.3797 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.7606 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรผลิตกรดได้ 7.01 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 312 คำนวณเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.3394 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 2.0624 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตกรดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลผลิตกรดที่ได้จากน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรจะให้ผลผลิตกรดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลผลิตกรดที่ได้จากน้ำตาลทรายความเข้มข้น 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาคผนวก ง

ตารางที่ 4.2 ผลของน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

แหล่งคาร์บอน	ชั่วโมง	พีเอช	ผลผลิตกรด (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของกรด (กรัมต่อกรัมสับสเตรท)	อัตราการผลิตกรด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร	264	3.86	5.07	0.5645	1.8265
ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร	336	3.7	5.75	0.4101	1.8653
ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร	336	3.62	6.57	0.3106	1.9259
น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร	312	3.78	5.94	0.6279	1.6747

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

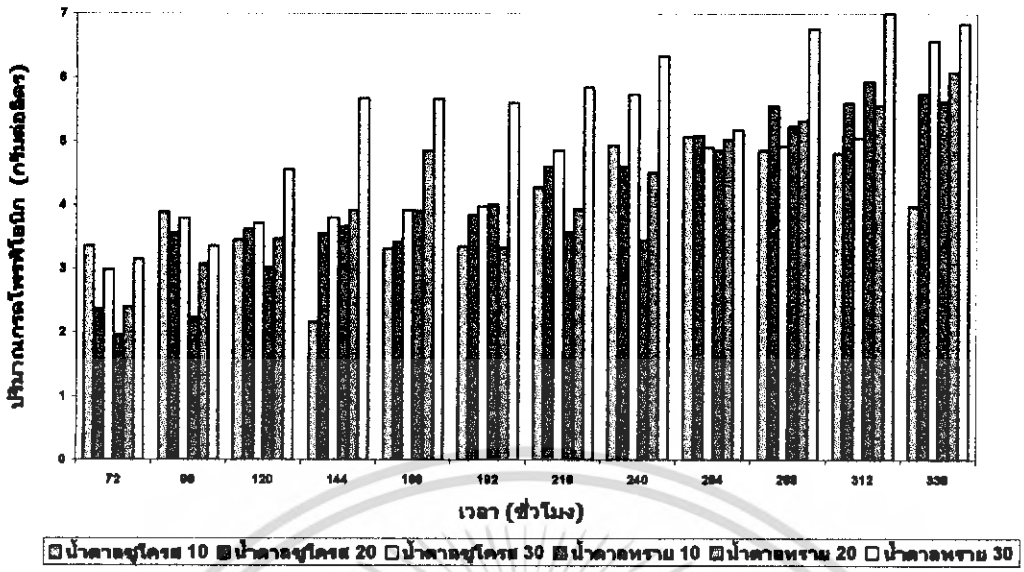
แหล่งคาร์บอน	ชั่วโมง	พีเอช	ผลผลิตกรด (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของกรด (กรัมต่อกรัมสับสเตรท)	อัตราการผลิตกรด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร	336	3.67	6.08	0.3797	1.7606
น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร	312	3.68	7.01	0.3394	2.0624

จากตารางที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จะพบว่าน้ำตาลทรายความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่า คือ 5.94 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายความเข้มข้น20 กรัมต่อลิตร จะพบว่าน้ำตาลทรายความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่า คือ 6.08 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร จะพบว่าน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่า คือ 7.01 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ น้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรยังมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุด คือ 2.0624 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดโพรพิโอนิก ดังแสดงในรูปที่ 4.8

เนื่องจากก่อนหน้านี้ยังไม่มีการทดลองใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจึงไม่มีบทความสนับสนุน แต่มีบทความที่เกี่ยวข้องกับการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆ

Lewis และ Yang (1992) ได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* โดยใช้น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลกลูโคส และกรดแลคติก พบว่า yield ของกรดโพรพิโอนิกจะเท่ากับ 0.385 และ 0.389 กรัมต่อกรัม เมื่อใช้น้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลกลูโคสตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้จะใกล้เคียงกับผลได้ของกรด (yield) ที่คำนวณได้ เมื่อใช้น้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 0.3394 กรัมต่อกรัม และสอดคล้องกับการทดลองของ Himmi และคณะ (2000) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P.acidipropionici* และ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* โดยใช้กลีเซอรอลและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่าเมื่อใช้เชื้อ *P. acidipropionici* จะมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะน้อยกว่าอัตราการผลิตกรดเมื่อใช้น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร จากการทดลองนี้ คือ 2.0624 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC4965 เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

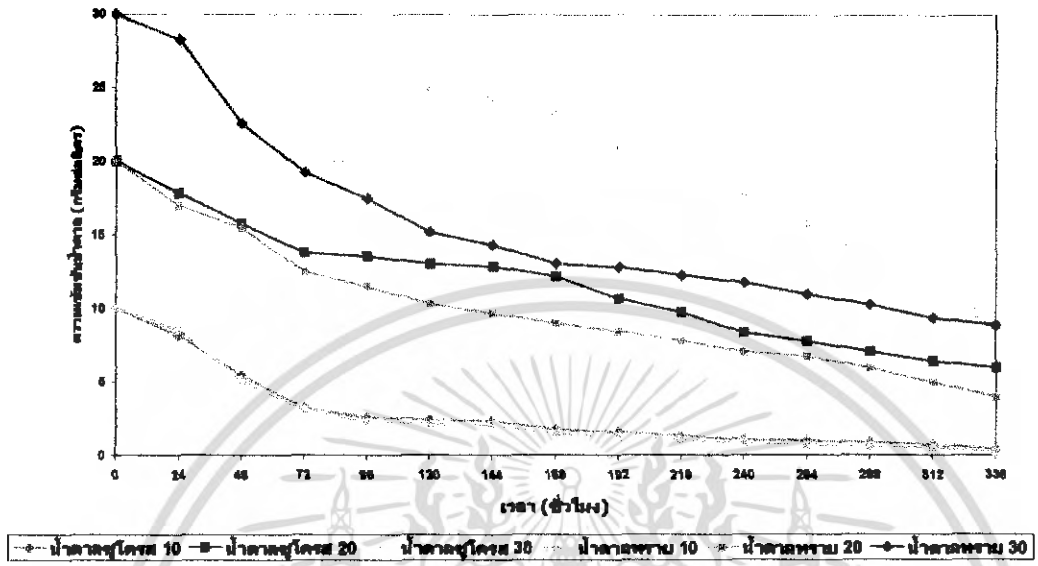
Barbirato และ Chedaille (1997) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลีเซอรอลเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนที่เคยมีการใช้ทดลองมาก่อน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และกรดแลคติก พบว่าการใช้กลีเซรอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงถึง 13.6 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ คือ 7.01 กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากกลีเซอรอลมีราคาสูงกว่าน้ำตาลทราย จึงทำให้มีต้นทุนการผลิตที่สูงกว่า ดังนั้นหากมีการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้สามารถผลิตกรดได้สูงขึ้น การใช้น้ำตาลทรายก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

4.2.3 การศึกษาปริมาณน้ำตาลน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

จากการทดลองจะใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำซูโครสและน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน โดยน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดจะมีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร โดยในระหว่างกระบวนการหมักเชื้อจะใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโต ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นน้ำตาลลดลง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะพบว่าสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตรเหลือน้ำตาลอยู่เพียง 0.42 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 95.80 ของปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตรเหลือน้ำตาล 5.98 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 70.10 ของปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรเหลือน้ำตาล 8.85 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 70.50 ของปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตรเหลือน้ำตาล 0.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คิดเป็นร้อยละ 97.80 ของปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตรเหลือน้ำตาล 3.99 คิดเป็นร้อยละ 80.05 ของปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป และน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตรเหลือน้ำตาล 8.87 คิดเป็นร้อยละ 70.43 ของปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ดังแสดงในรูปที่ 4.9



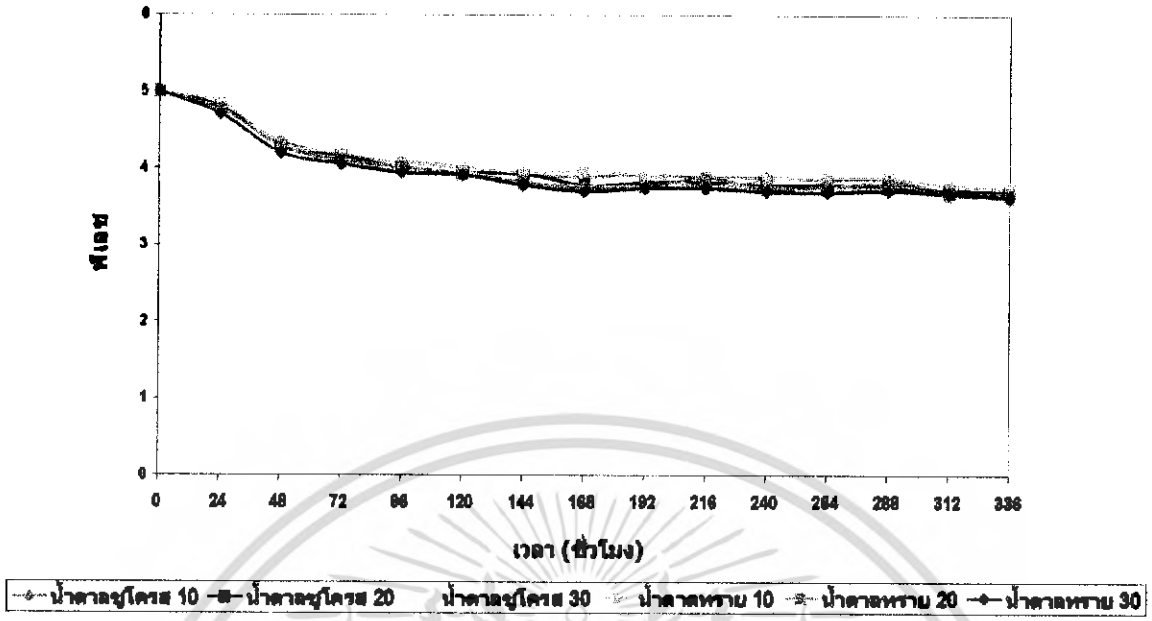
รูปที่ 4.9 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

4.2.4 การศึกษาค่าความเป็นกรด – ด่างที่เปลี่ยนแปลงในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

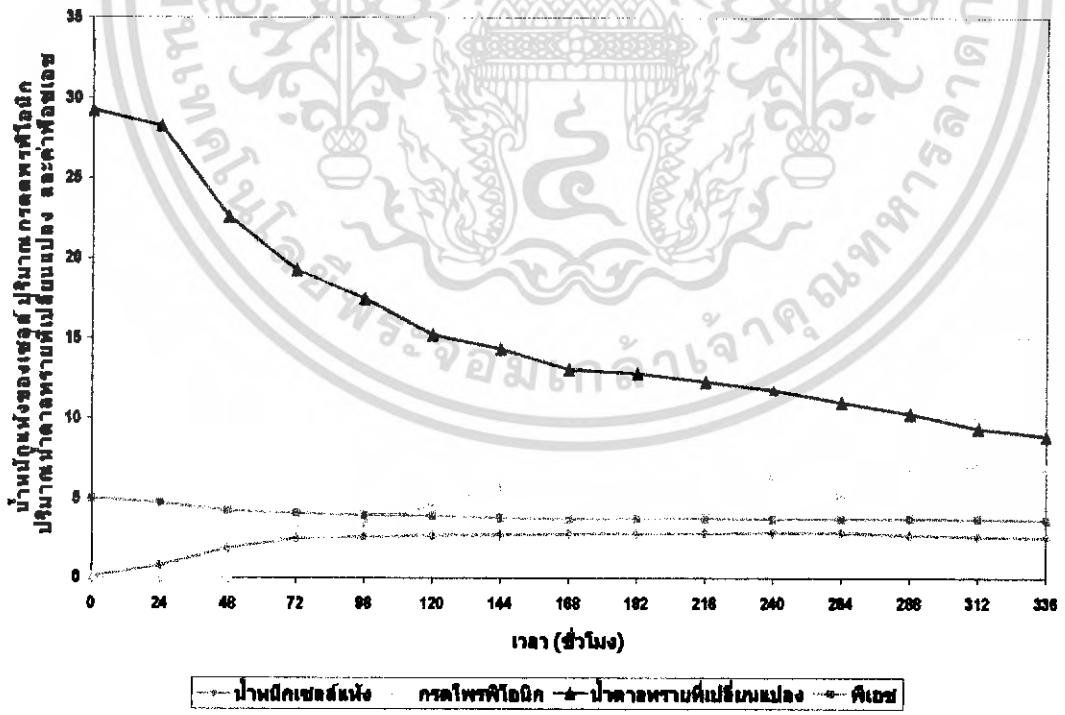
จากการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่างในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 6 สูตรจะมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกัน คือ ในชั่วโมงที่ 0 (เริ่มต้นกระบวนการหมัก) ค่าความเป็นกรด – ด่างของน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทราย คือ 5.0 โดยค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 144 และหลังจากนั้นค่าความเป็นกรด – ด่างจะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยค่าความเป็นกรด - ด่างจะอยู่ในช่วงระหว่าง 3.6 ถึง 3.9 ดังแสดงในรูปที่ 4.10

เมื่อนำค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปและการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด – ด่างที่ได้จากการศึกษาในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ผลิตกรดโพรพินิกปริมาณสูงสุดนั้นมาแสดงผล ค่าต่างๆ ที่ได้ จะมีความสัมพันธ์กัน ดังแสดงในรูปที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ค่าความเป็นกรด – ด่างที่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายที่มีความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.11 น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป และค่าความเป็นกรด - ด่างของน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.11 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อจะมีช่วงการเจริญเติบโตสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 72 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 2.58 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดโพรพิโอนิกปริมาณสูงสุด ณ ที่ชั่วโมง 312 เท่ากับ 7.01 กรัมต่อลิตร มีค่าความเป็นกรด - ด่างลดลง เท่ากับ 3.68 และมีปริมาณน้ำตาลที่คงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 9.35 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propioni - bacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่ต่างกัน 4 ชนิด คือ น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทราย พบว่าน้ำตาลซูโครสให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกปริมาณสูงสุด คือ 8.33 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 192 คำนวณเป็นผลได้ (yield) และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ ได้เท่ากับ 0.5519 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 2.0069 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ รองลงมาคือ น้ำตาลทรายให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 7.98 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 120 คำนวณเป็นเป็นผลได้และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.5474 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 2.1304 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่น้ำตาลกลูโคสผลิตกรดได้ 6.41 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 180 คำนวณเป็นเป็นผลได้และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.4471 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.0637 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และน้ำตาลแลคโตสผลิตกรดได้ 3.27 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 96 คำนวณเป็นเป็นผลได้และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.3459 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.0761 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากการทดลองจะพบว่าน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายให้ผลผลิตกรดปริมาณใกล้เคียงกัน แต่การใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้มีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการใช้น้ำตาลซูโครส จึงนำปริมาณกรดที่ผลิตได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อดูความแตกต่าง พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ดังนั้นจึงนำแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดมาศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะ-สมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่า น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 5.07 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 264 คำนวณเป็นเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.5645 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.8265 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิดรผลิตกรดได้ 5.75 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 336 คำนวณเป็นเป็นผลได้และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.4101 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.8563 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรผลิตกรดได้ 6.57 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 336 คำนวณเป็นเป็นผลได้และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.3106 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.9259 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ น้ำตาลทรายความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิดรผลิตกรดได้ 5.94 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 312 คำนวณเป็นเป็นผลได้และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.6279 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 1.6747 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ น้ำตาลทรายความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรผลิตกรดได้ 6.08 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 336 คำนวณเป็นเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.3797 กรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัมสับสเตรท และ 1.7606 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรผลิตกรดได้ 7.01 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 312 คำนวณเป็นเป็นผลได้ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.3394 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และ 2.0624 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าในการทดลองนี้ น้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

จากการทดลองจะพบว่าแนวโน้มของการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่สูงขึ้น เชื้ออาจจะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกในปริมาณสูงขึ้นกว่าเดิมด้วย ดังนั้นในการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิ-โอนิกให้ได้ปริมาณสูงสุดครั้งต่อไป ควรทำการศึกษาโดยใช้น้ำตาลทรายความเข้มข้น 40 และ 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อทำการวิเคราะห์ว่าแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นใดที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดโพรพิโอนิก เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษา และพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กุลยา จันทร์อรุณ. 2533. **เคมีอาหาร.** กรุงเทพฯ :หน่วยศึกษานิเทศก์.

ศิวาพร ศิวเวช. 2529. **วัตถุเจือปนในอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ภัสสัตยางกูร. 2527. **การศึกษาวิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ และการนำไปปรับใช้ในการผลิตสารเมทาบอไลท์จากแบคทีเรียโพรพิโอนิก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

AOAC. 2000. **Official Methods of Analysis.** 17 th ed. Washington DC: Association of official Analytical chemists.

Barbirato, F., and Chedaille, B.A. 1997. Propionic acid fermentation from glycerol : comparison with conventional. **Appl. Microbiol.** 47: 441-446.

Buchanan, R.L. Jr., and Ayres, J.C. 1975. Effect of initial pH on aflatoxin production. **Appl Microbiol.** 30(6): 1050–1051.

Cabo, M.L., and Braber, Koenraad, PM.FJ. 2002. Apparent antifungal activity of serveral lactic acid bacteria againt *Penicillium* discolor is due to acetic acid in the medium. **J. Food Protection.** 65: 1309-1316.

Cavin, J.F., Saint, C. et Divis, C. 1985. Continuous production of Emmental cheese flavors and propionic acid starters by immobilized cells of propionic acid bacteria. **Biotechnol.** 7: 821-826.

Champange, C.P., Baillargeon-cote, C., and Goulet. 1989. Whey fermentation by immobilization cell of *Propionibacterium theonii*. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 175-184.

Colomban, A., Roger, L., and Boyacval, P. 1993. Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentaion, utilization and cell recycling. **Biotechnol. Bioeng.** 42: 1091-1098.

Crespo, J.P., Almeida, J.S., Moura, M.J., and Carrondo, M.J.T. 1990. Modelling of immobilized Cell Reactor for Propionic Acid Fermentation. **Biotechnology Bioengineering.** 36: 705-716.

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

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Reber, P.A., and Smith, F. 1956. Colorimatric method for determination of sugar and related substance. **Anal. Chem.** 28: 350-356.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Gebgardt, A.G., Kucheras, R.V., Laska, D.V., and Vogrin, A.G. 1970. The relation between nitrogen metabolism and the cobamide-synthetic capacity of *Propionibacterium shermanii*. **Mikrobiologiia**. 3: 447-452.

Goswami, V., and Srivastava, A.K. 2001. Propionic acid production in an in situ cell retention bioreactor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 676-680.

Helena, L., Hans, J., and Johan, S. 2004. Antifungal effect of dairy Propionibacteria contribu of organic acid. **International J. Food Microbiol.** xx : xxx-xxx.

Higgins, C., and Brinkhaus, F. 1999. Efficacy of several organic acid against molds. **Appl. Poultry Sci.** 8: 480-487.

Himmi, E.H., Borics, A., and Hassani, L. 2000. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53: 435-440.

Hsu, S.T., and Yang, S.T. 1991. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici* : effect of pH. **Biotechnol. Bioeng.** 38: 571-578.

Kiatpapan, P., and Murooka, Y. 2002. Genetic Manipulation System in Propionibacteria. **J. Biosci. Bioeng.** 93: 1-8.

Ko, C.S., and Chu, I.M. 2004. Immobilized cells biocatalyst for the production of S-acetylthio-2-methylpropanic acid. **Enzyme Microb. Technol.** 35: 619-623.

Lee, I.H., Fredrickson, A.G., and Tsuchiya, H.M. 1974. Diauxic growth of and *Propionibacterium shermanii*. **Appl. Microbiol.** 28: 831-835.

Lewis, P.V., and Yang, S.T. 1992. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* : effect of growth substrate. **Appl. Microbiol Biotecnol.** 37: 437-442.

Martinez, R., and Mayra de la Torre. 2002. Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose. **Biotechnol. Letter.** 24: 427-431.

Menon, A., and Shemin, D. 1967. Concurrent decrease of enzymatic activities concerned with the synthesis of coenzyme B12 and of propionic acid in Propionibacteria. **Arch. Biochem. Biophys.** 121: 304-310.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Paik., H.D., and Glatz, H.D. 1994. Propionic acid production by immobilized cell of a propionate-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42: 22-27.

Papoutsakis, E. T., and Meyer, C. L. 1985. Equations and calculations of product yields and preferred pathways for butanediol and mixed-acid fermentations. **J. Biotechol. Bioengin.** 27: 50–66.

Prescott, S.C., and Dunn, C.G. 1959. **Industrial Microbiology.** 3rd ed. New York: McGraw Hill Co.,Inc.

Quesada-Chanto, A., Afschar , A. S., and Wagner, F. 1994b. Optimization of *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilization of sucrose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42: 16–21

Racker, C.H., and Werkman, G.J. 1972. The utilization of agricultural by-products in the production of propionic acid by fermentation. **J. Agric. Res.** 49: 1017-1020.

Ramsay, J.A., Hassan, M.C., and Ramsay, B.A. 1998. Biological conversion of hemicellulose to propionic acid. **Enzyme and Microbial Technology.** 22: 292-295.

Schuppert. B., Cshinj. B., and Trosch. W. 1992. Batch and continuous production of propionic acid from whey permeate by *Propionibacterium acidipropionici* in a three-electrode amperometric culture system. **App. Microbiol. And Biotechnol.** 37: 549-554.

Seshadri, N., and Mukhopadhyay , S.N. 1993. Influence of environment of parameters on propionic acid upsteam bioprocessing by *Propionibacterium acidipropionici*. **J. Biotech.** 29: 321-328.

Shaposhnikov, V.N., and Vorob'eva, L.I. 1963. Development of Propionibacteria and the synthesis of vitamin B12 on synthetic and natural media. **Mikrobiologiia.** 32: 204-208.

Thompson, R.C. 1943. The B-vitamin requirement of the Propionibacteria. **J. Bacteriol.** 46: 99-104.

Tittsler, R.P. 1940. The influence of hydrogen ion concentration upon the growth of Propionibacteria. **J. Bacteriol.** 39: 95-96.

Tyree, R.W., Clausen, E.C., and Gaddy, J.L. 1991. The product of propionic acid from sugars by fermentation through lactic acid as intermediate. **J. Chem. Tach. Biotechnol.** 50: 157-166.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Van Niel, C.B. 1928. **The Propionic Acid Bacteria.** The Netherlands: N.V. Uitgeversaak, J. W. Boissevain & Co.

Vandana, G., and Srivastava ,A.K. 2000. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. **J. Biochem. Eng.** 4:121-128.

Vandegraft, E.E., Rusul, G., and Elmer, H. 1975. Food additives and plant components control growth and aflatoxin production by toxigenic aspergilli. **Mycopathologia.** 101: 13-23.

Virtanen, H.R., and Kotake, Y. 1923. The Metabolism of Amino Acids and Proteins. **Biochemistry.** 4: 225-242.

Wood, H. G., and Werkman, C. H. 1940. The relationship of bacterial utilization of CO_2 to succinic acid formation. **J. Biochem.** 34: 129–138.

Woskow, S.A., and Glatz, B.A. 1991. Propionic acid production by a propionic acid-tolerant of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation . **Appl Environ. Microbiol.** 57: 281-288 .

Yang, S.T., and Huang, Y. 1994. A novel recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose. **Biotech. Bioeng.** 45: 379-386.

www.absoluteastronomy.com/encyclopedia/p/pr/propionic_acid.html

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

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

www.msds.pcd.go.th.IsearchName.asp?VID=742

www.pwsz.krosno.pl/. ../propioni.jpg

www.2sat.psu.ac.th/centrallab/instr%2HPLC.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

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

วิธีการ

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

1.2 อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

สารสกัดเนื้อ (meat extract)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมซิเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . 4 H_2O$)	0.05	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

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

2. สารเคมี

สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 3

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลแลคโตส วิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dubois,1956)

อุปกรณ์

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

สารเคมี

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

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

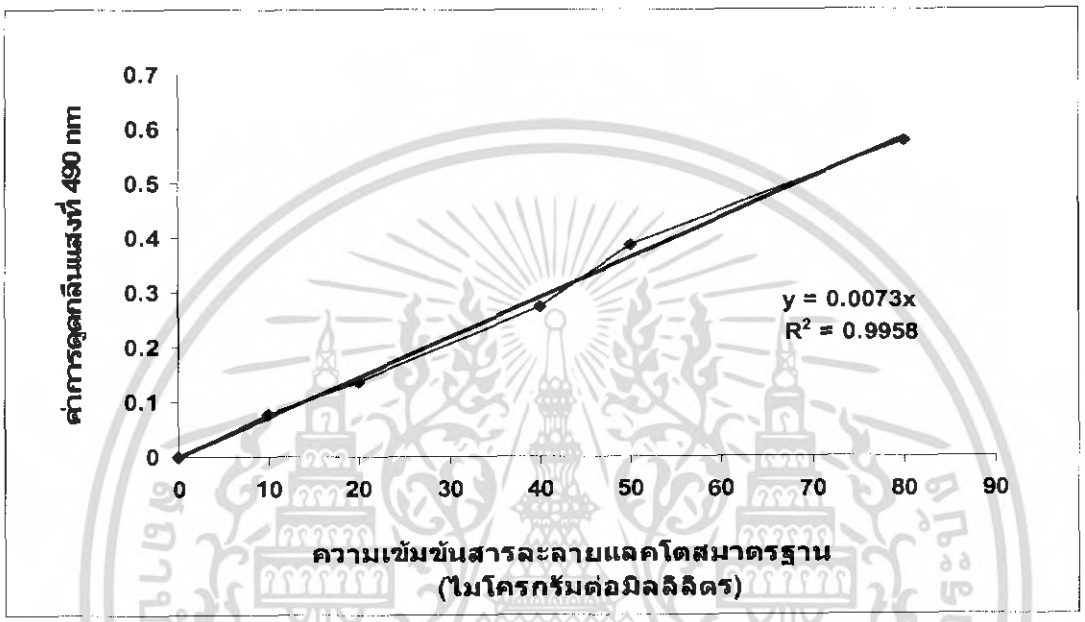
วิธีการ

ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 95% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นรีบเติมกรดซัลฟิวริกปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว (ปล่อยลงตรงๆ ที่ผิวหน้า) แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ทำการเขย่า แล้วบ่มในอ่างน้ำที่ 25 ถึง

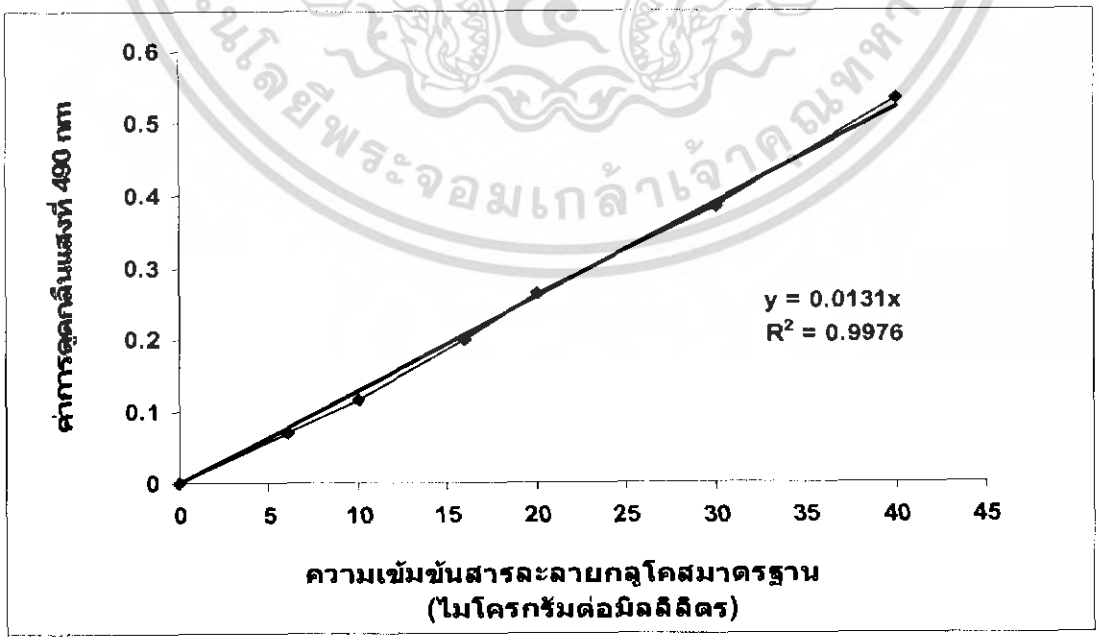
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30 องศาเซลเซียส นาน 10 ถึง 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่าง

ความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร x อัตราการเจือจาง / ความชันกราฟมาตรฐาน x 1,000

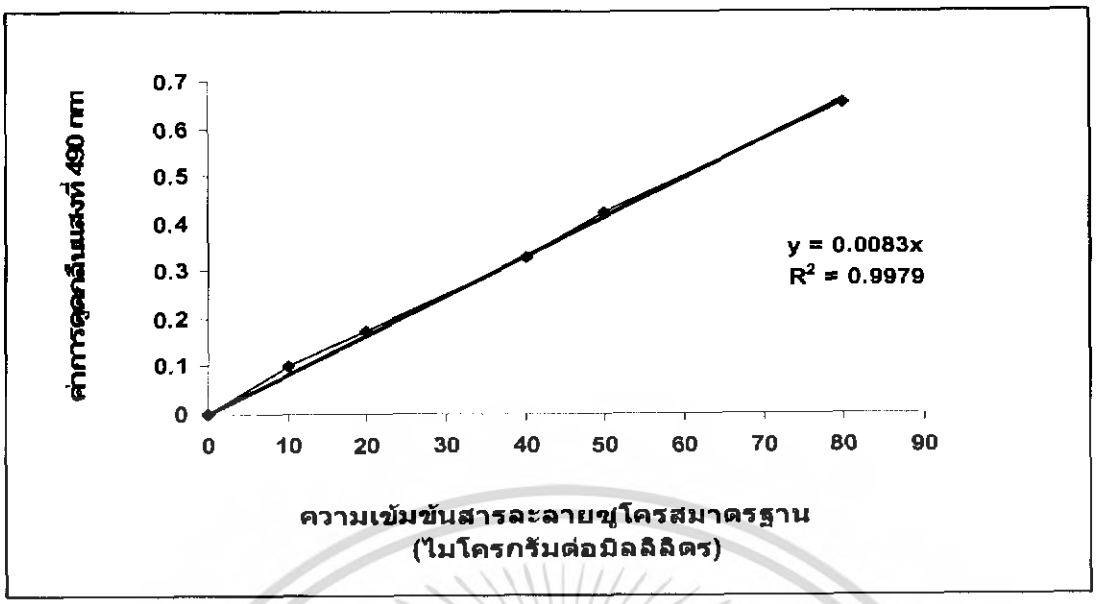


รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตส

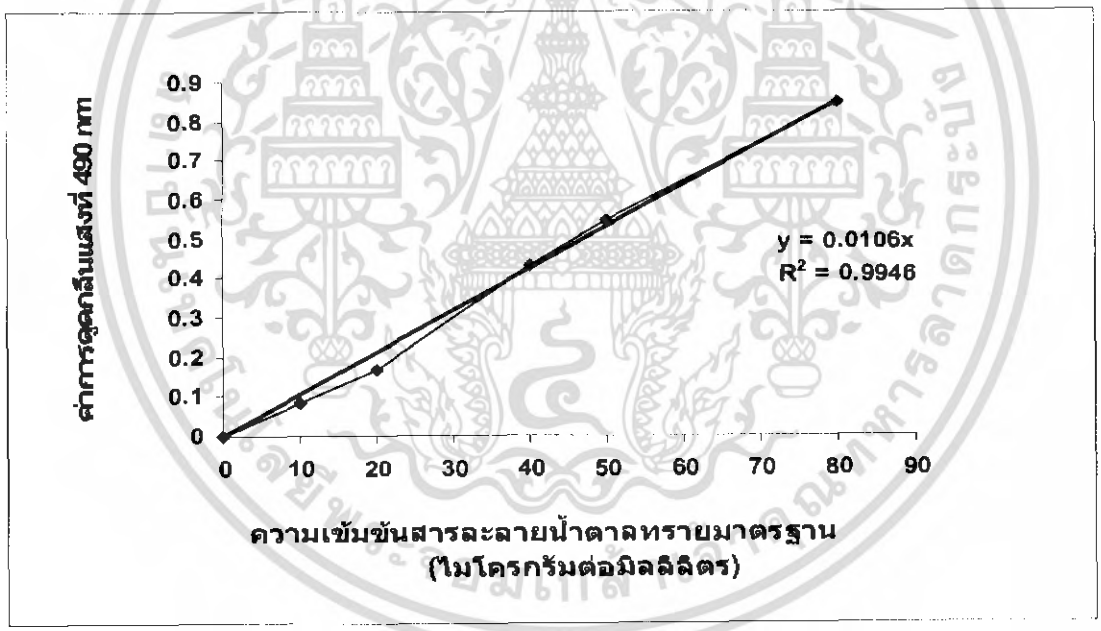


รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทราย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.1 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

1. Power เครื่องทุกเครื่องของ HPLC
2. ยก Sinker ใส่ในขวดของ Mobile phase
3. เปิด Drain ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ให้สังเกตว่าในสายของ Sinker มีฟองอากาศอยู่รึเปล่า ถ้ายังมีอยู่ให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
5. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจน Pump หยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน
6. ปิด Drain valve ที่ Pump
7. ตั้ง Flower rate , P_{max} และ P_{min} ที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับ Pump (P_{max} ดูจาก Pressure maximum ของ Column)
8. ตั้งอุณหภูมิที่ต้องการไว้ที่ CTO (ถ้ามี)
9. ตั้ง Parameter ให้กับ Detector
10. สั่งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.2 ขั้นตอนการเปลี่ยน Mobile phase

1. ปิด Pump HPLC
2. เท Mobile Phase ใหม่ลงในบีกเกอร์
3. เปิด Drain ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ยก Sinker ออกจาก Mobile phase แล้วจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มี Mobile phase ใหม่อยู่
5. รอจน Pump ดูด Mobile phase ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20 ถึง 30 มิลลิลิตร
6. ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของ Sinker ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาดแล้วนำ Sinker จุ่มลงในขวดของ Mobile phase ใหม่
7. ในระหว่างขั้นตอนที่ 1 ถึง 6 ถ้า Pump หยุดทำงาน ให้กดปุ่ม Purge อีกครั้ง
8. ให้สังเกตว่าสายของ Sinker มีฟองอากาศอยู่หรือเปล่า ถ้ายังมีให้กด Purge ให้ Pump ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
9. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจน Pump หยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. ปิด Drain valve ที่ Pump แล้วสั่งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Note : การเปลี่ยน mobile phase ต้องคำนึงถึงด้วยว่า mobile phase เก่าและใหม่เข้ากันหรือเปล่า ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันได้ต้องใช้สารชนิดอื่นเป็นตัวเชื่อมกลาง โดย run mobile phase ตัวเชื่อมกลางอย่างน้อย 20 นาที

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

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

2.3 ขั้นตอนการฉีดตัวอย่าง

1. ตรวจดูให้แน่ใจว่า LC อยู่ในสถานะ Ready
2. ตรวจดูให้แน่ใจว่า Detector และ Autosampler อยู่ในสถานะ Ready
3. รอจน Baseline ค่อนข้างนิ่ง
4. ถ้าต้องการให้เครื่องคำนวณ Slope ให้เลือกกด S
5. ถ้า Baseline นิ่งอยู่ที่ตำแหน่งสูงกว่าศูนย์เล็กน้อย สามารถสั่งศูนย์อัตโนมัติกด Z
6. ทำการฉีด (Inject) สารตัวอย่าง

- Rhecdyne Manual Injector

ล้าง syringe ให้สะอาดด้วย solvent 5 ครั้ง

↓

ล้าง syringe ด้วย sample ที่ inject 3 ครั้ง

↓

ดูด sample โดยไม่ให้มีฟองอากาศใน syringe แล้ว

Set ปริมาตรให้ได้ตามที่จะฉีดเข้าระบบ HPLC

↓

แทงเข็มเข้าไปใน injector ให้สุด โดย injector ต้องอยู่ที่ตำแหน่ง INJECT

↓

ปิด injector ไปที่ตำแหน่ง LOAD

↓

ฉีด sample เข้าไปใน sample loop ของ injector

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

↓

เมื่อ HPLC system พร้อม ให้บิด injector มาตำแหน่ง INJECT

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

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอประมาณ 5 ถึง 10 วินาที แล้วดึง syringe ออกจาก injector

↓

ล้าง needle port ด้วยน้ำกลั่น 5 ถึง 10 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยอากาศ 10 ถึง 20 มิลลิลิตร โดยใช้ syringe พลาสติก ขนาด 5 ถึง 25 มิลลิลิตร ที่ต่อด้วย needle port cleaner

↓

ล้างด้วย syringe ที่ใช้ฉีด sample ด้วย solvent 20 ถึง 30 ครั้ง

2.4 ขั้นตอนการปิดเครื่อง

1. หลังจาก inject sample สุดท้ายเสร็จแล้ว ให้ Run mobile phase ต่ออีกประมาณ 30 นาที
2. สั่ง OFF pump
3. ปิด Power ของ HPLC units แล้วยก Sinker ให้พ้น Mobile Phase

Note : กรณีที่จะหยุดใช้ เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

2.5 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

1. Run Mobile Phase ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run Moblie Phase ที่ใช้เก็บ Colume 30 นาที
3. ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

Note :

1. การเปลี่ยน mobile phase ที่ใช้งานมาเป็น mobile phase ที่ใช้เก็บ colume ต้องระวังการผสมกันระหว่าง mobile phase ทั้ง 2 ว่า สามารถผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันได้ดีต้องมี mobile phase ขั้นกลางอย่างละ 30 นาที

2. การล้างใช้ flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที หรือน้อยกว่า ขึ้นกับชนิดของ colum

ตัวอย่าง การล้างเครื่อง โดยมี mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็น buffer solution และ mobile phase ที่เก็บ colume เป็น 70% MeOH

Buffer solution 30 นาที

↓

น้ำกลั่น HPLC 30นาที

↓

70% MeOH 30 นาที

↓

ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)

1. Run Mobile Phase ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run Mobile Phase ที่ใช้เก็บ colume 1 ชม.
3. หยุด Pump แล้ว ถอด colume ออกจากระบบแล้วต่อ pipe เปล่าแทนที่ และปิด colume ด้วย plug ให้แน่น
4. เปลี่ยน mobile phase เป็น 70% MeOH แล้ว run เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชม.
5. off pump แล้วปิดเครื่องทุก unit
6. ยก sinker ออกจากขวด mobile phase แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

2.7 ขั้นตอนการใช้งาน C-R7A

1. กดปุ่มเปิด Power ที่เครื่อง C-R7A ในกรณีที่มี 2 Drive ให้ใส่แผ่น System disk ใน Drive 1 และแผ่นเก็บข้อมูลใน Drive 2 ในกรณีที่มี Board สำหรับเชื่อม HPLC กับ C-R7A ให้ทำการเชื่อมสัญญาณระหว่างเครื่องทั้งสองโดยพิมพ์ OPEN TRS 7 และ ENTER หลังจากปรากฏหน้าจอ

2. กด WIN 1 จะปรากฏหน้าจอ Menu ของ WIN 1 เลือกข้อ 2 ตามด้วย ENTER จะปรากฏ

เลือก L เพื่อเรียก Analysis File ในกรณีเคยสร้าง File เก็บไว้

E ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูก Load ขึ้นมาใช้งาน

R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่าใน Analysis File ที่ Load ขึ้นมาใช้งานอยู่

A ในกรณีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File กับทุกๆ ครั้งของการฉีด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 วิธีสร้าง Analysis File ใหม่

1. เลือก E จะปรากฏหน้าจอของ Analysis File

แก้ไข Parameter ดังต่อไปนี้

WIDTH	5
DRIFT (uV/min)	0
และ T.DBL(min)	1000

2. กด EXIT เพื่อออกจากหน้าจอจะปรากฏคำถาม

กด Y

```
Save FILE?          Y : yes   N: no
```

จะปรากฏ

```
        Part    1:

File Name       2:
```

กำหนด Drive และชื่อ Analysis File ตามที่ต้องการตรงตำแหน่ง File Name ตามด้วย ENTER เช่น

```
        Part    1:

File Name       2: ALCOHOL
```

หลังจากการ save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN1

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

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

เลือก S เมื่อต้องการตั้งชื่อ File สำหรับ save จะปรากฏ

```
Directory Part          1:

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

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

```
Directory Part          1:

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

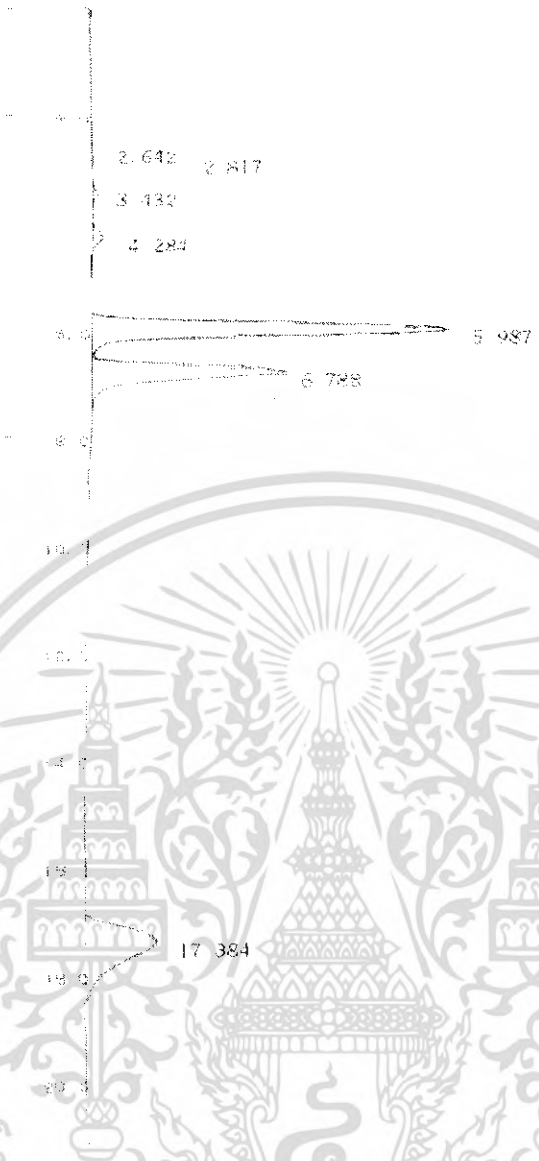
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C ยกเลิกการ Save ของChromatogram สุดท้าย

A เมื่อต้องการให้เครื่อง save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

4. เลือกข้อ 1 จากหน้าจอ Menu ของ WIN1 จากนั้นรอจนสังเกตเห็นเส้น Baseline ค่อนข้างเรียบจากนั้นทำการ Zero สัญญาณจาก Detector โดยปรับปุ่ม Zero ที่ Detector จนกว่าจะสามารถ Set 0 ที่ Detector ได้
5. ทำการ Test slope ของสัญญาณที่ส่งมาโดยการกด S ที่เครื่อง C-R7A เครื่องจะใช้เวลาในการทดสอบ ประมาณ 10 เท่าของค่า Width ที่ตั้งไว้ใน Analysis file หลังจากการทดสอบสิ้นสุดค่า Slope ที่ได้จะถูก Save ใน Analysis file อัตโนมัติถ้าต้องการแก้ไขให้กลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis file
6. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณและให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START ในกรณีที่เครื่อง C-R7A สามารถเชื่อมต่อและควบคุมการทำงานของ HPLC ได้จะสามารถขอดูค่าต่างๆของ เครื่อง HPLC ผ่านเครื่อง C-R7A ได้จากหน้า Menu ของ WIN1 โดยเลือกข้อ 7: LC Monitor ตามด้วย ENTER

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



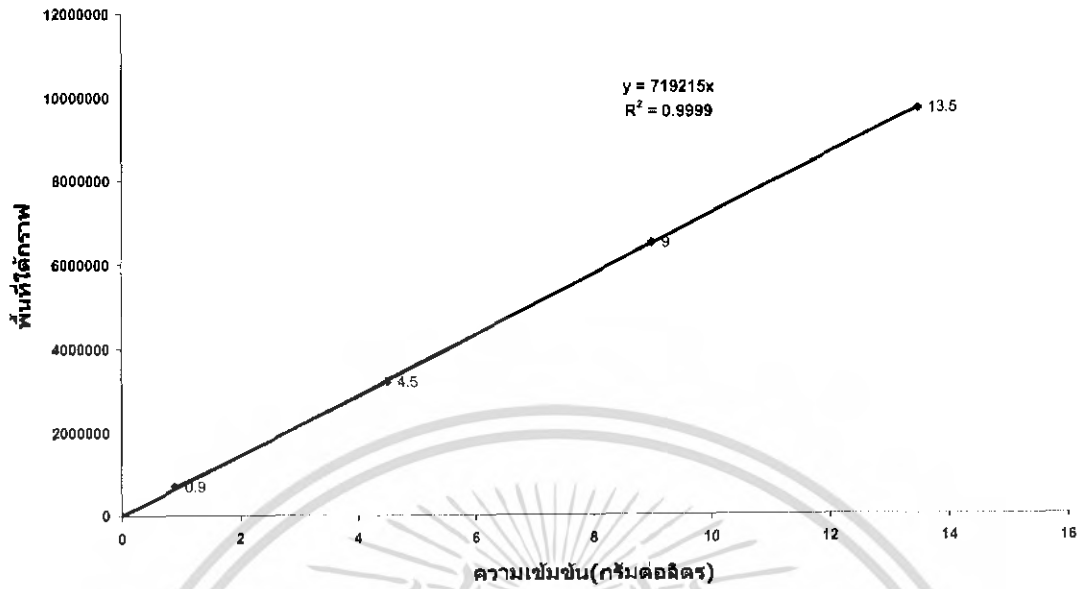
รูปที่ 5 โครมาโทแกรมแสดงค่า Retention time ของกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ได้แก่

retention time ของกรดแลคติก เท่ากับ 5.987 นาที

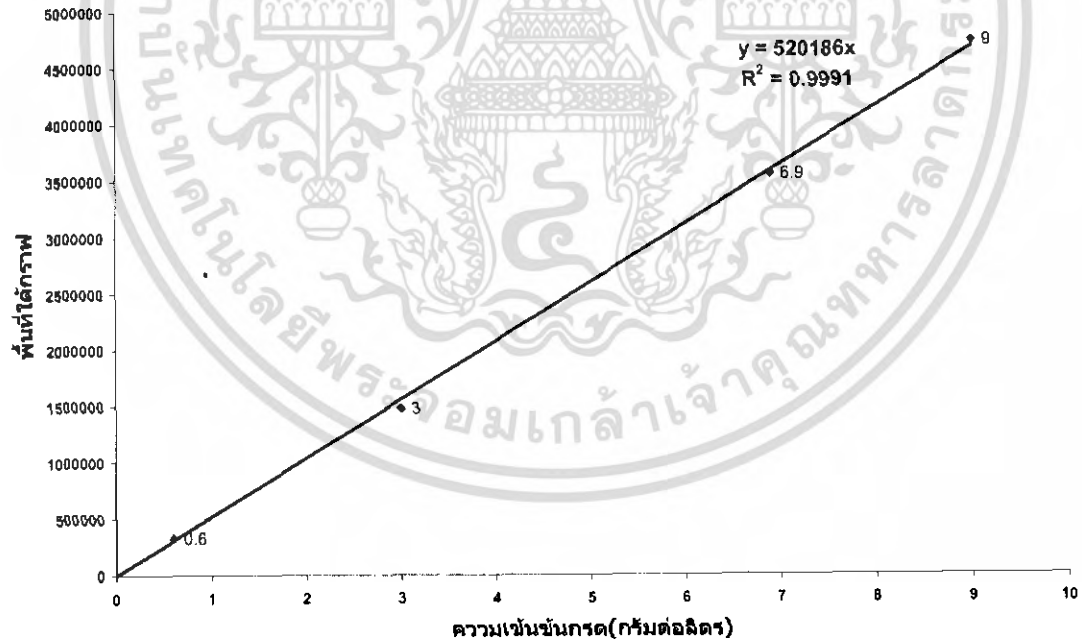
retention time ของกรดอะซิติก เท่ากับ 6.788 นาที

retention time ของกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 17.384 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

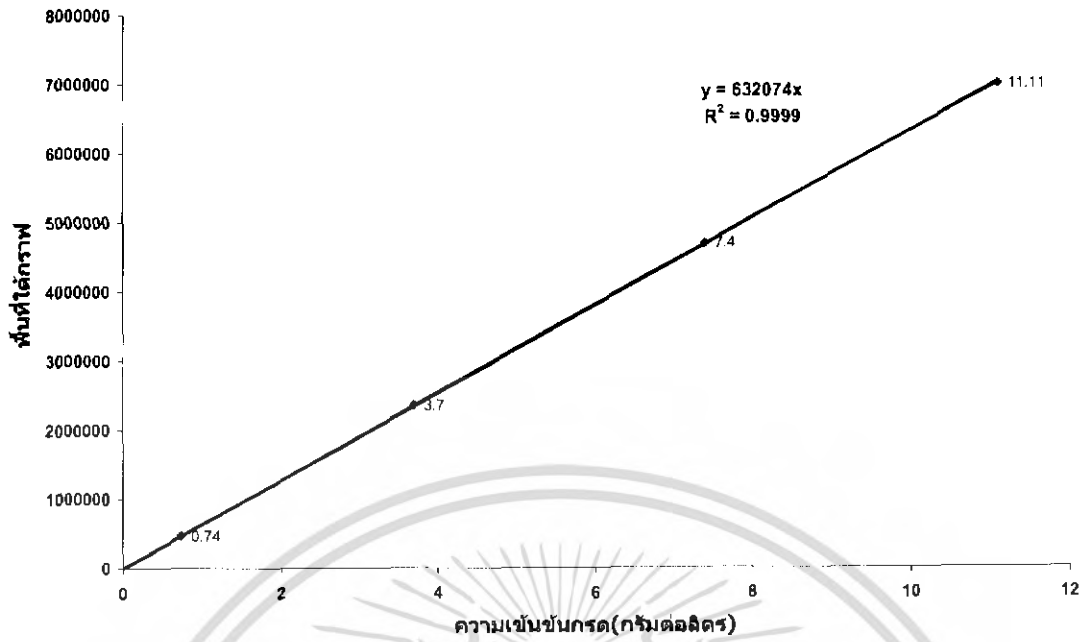


รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965



รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานของกรดอะซิติกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางผลการทดลอง

1. ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร			
	แลคโตส	กลูโคส	ซูโครส	น้ำตาลทราย
0	0.074	0.204	0.071	0.035
12	0.099	1.032	0.105	0.181
24	1.569	2.358	1.038	3.05
36	2.067	9.009	5.104	7.371
48	3.510	12.977	9.510	8.873
60	3.321	18.603	12.426	11.132
72	2.893	20.429	13.869	11.583
84	3.263	19.950	14.283	12.615
96	3.420	20.007	15.686	12.276
108	3.840	22.274	14.980	12.358
120	6.990	21.902	15.600	12.054
132	8.143	20.655	16.942	12.382
144	9.401	20.145	16.555	12.505
156	10.367	21.128	16.622	12.714
168	11.340	22.495	16.740	12.943
180	11.865	19.635	16.335	12.040
192	12.096	19.305	17.460	11.868
204	12.604	20.880	17.550	11.808

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 น้ำหนักแห้งของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

ชั่วโมงที่	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัม)			
	แลคโตส	กลูโคส	ซูโครส	น้ำตาลทราย
0	0.0005	0.0006	0.0002	0.0005
12	0.0008	0.0007	0.0005	0.0009
24	0.0025	0.0033	0.0015	0.0040
36	0.0056	0.0097	0.0087	0.0070
48	0.0064	0.0162	0.0110	0.0098
60	0.0067	0.0177	0.0128	0.0119
72	0.0062	0.0180	0.0145	0.0124
84	0.0057	0.0177	0.0149	0.0120
96	0.0058	0.0186	0.0152	0.0116
108	0.0063	0.0187	0.0153	0.0116
120	0.0093	0.0185	0.0156	0.0118
132	0.0097	0.0190	0.0161	0.0126
144	0.0097	0.0191	0.0163	0.0125
156	0.0105	0.0192	0.0165	0.0126
168	0.0111	0.019	0.0166	0.0125
180	0.0115	0.0191	0.0165	0.0127
192	0.0127	0.0192	0.0164	0.0124
204	0.0129	0.0175	0.0154	0.0123

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)			
	แลคโตส	กลูโคส	ซูโครส	น้ำตาลทราย
12	0.7084	0.6302	2.9376	0.2884
24	1.1335	0.8504	3.2236	0.3538
36	1.2265	1.1011	3.5834	1.1202
48	1.2763	1.3410	4.1804	1.6537
60	1.5269	2.0528	4.5260	1.9970
72	2.3569	4.7368	4.9163	3.4286
84	2.9886	4.8425	3.8957	2.1872
96	3.2727	4.7552	3.5886	4.5299
108	0.7649	1.5602	5.0822	6.5136
120	1.0451	2.0001	5.6423	7.9811
132	1.3089	2.2784	6.1731	7.7178
144	1.4563	3.3449	6.5811	6.8176
156	1.4977	4.0738	7.2977	6.4848
168	2.7511	5.7581	7.7785	6.8162
180	2.6468	6.4167	8.1858	6.7132
192	2.5807	5.1346	8.3337	5.1358
204	2.7976	6.4087	8.2854	4.7619

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง (กรัมต่อลิตร)			
	แลคโตส	กลูโคส	ซูโครส	น้ำตาลทราย
0	20.00	20.00	20.00	20.00
12	16.85	14.39	16.81	16.98
24	16.51	13.21	17.71	16.51
36	15.89	12.71	16.27	15.28
48	15.89	10.73	15.42	15.28
50	15.74	10.38	15.72	14.53
52	14.27	10.27	15.12	13.77
54	14.25	10.19	14.73	12.45
56	13.24	10.08	14.69	9.95
58	12.53	10.07	14.58	9.78
60	11.78	9.46	14.09	9.01
72	11.51	8.47	12.23	8.07
84	11.53	7.79	11.63	7.59
96	10.54	7.42	9.40	7.00
108	11.29	7.28	8.32	6.94
120	11.98	6.41	7.61	5.42
132	11.58	5.97	6.57	4.72
144	11.03	5.82	4.47	4.37
156	11.68	5.52	4.33	3.66
168	11.23	5.55	4.42	3.62
180	9.47	5.65	4.04	3.70
192	7.86	5.32	4.90	3.36
204	5.70	3.40	5.43	3.45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง			
	แลคโตส	กลูโคส	ซูโครส	น้ำตาลทราย
0	6.69	6.72	7.00	6.97
12	6.47	6.58	6.71	6.73
24	5.41	5.20	4.37	4.42
36	4.96	4.38	4.45	4.39
48	4.91	4.26	5.01	5.15
50	4.82	4.22	4.79	4.87
52	4.82	4.19	4.35	4.37
54	4.98	4.41	4.26	4.32
56	4.95	4.36	4.21	4.28
58	4.89	4.32	4.20	4.27
60	4.90	4.26	4.19	4.23
72	4.88	4.26	4.14	4.16
84	4.87	4.21	4.09	4.11
96	4.79	4.22	4.02	4.10
108	4.58	4.50	4.00	4.07
120	4.56	3.91	4.00	4.06
132	4.53	4.03	4.00	4.04
144	4.34	3.88	4.00	4.01
156	4.30	3.88	3.96	4.01
168	4.32	3.87	3.98	4.00
180	4.28	3.87	3.93	3.99
192	4.25	3.85	3.95	3.99
204	4.24	3.82	4.04	4.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก

ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร					
	S_{10}	S_{20}	S_{30}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
0	0.025	0.053	0.027	0.024	0.025	0.027
24	2.780	3.875	2.835	3.415	3.395	4.137
48	6.384	8.580	8.370	7.469	8.701	10.231
72	9.405	10.765	9.870	9.265	11.883	12.090
96	10.204	11.907	11.295	10.710	12.155	12.716
120	10.854	12.214	11.691	11.718	12.493	13.144
144	11.973	13.825	12.059	11.985	12.987	14.772
168	12.135	14.385	13.685	12.193	13.299	15.190
192	12.218	14.430	14.742	12.636	13.787	15.405
216	12.548	14.545	14.973	12.685	14.150	15.565
240	12.980	14.835	15.293	12.732	14.432	16.236
264	13.448	15.006	15.277	12.597	14.970	16.395
288	13.276	14.022	14.965	12.546	15.293	15.375
312	12.548	13.932	14.850	12.329	14.121	14.769
336	12.342	13.540	14.124	11.187	13.53	14.499

หมายเหตุ

S_{10} คือ น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร

S_{20} คือ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร

S_{30} คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

C_{10} คือ น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร

C_{20} คือ น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร

C_{30} คือ น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 น้ำหนักแห้งของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่วโมงที่	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัม)					
	S_{10}	S_{20}	S_{30}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
0	0.0003	0.0004	0.0009	0.0002	0.0002	0.0004
24	0.0023	0.0029	0.0027	0.0035	0.0037	0.0038
48	0.0085	0.0077	0.0090	0.0080	0.0091	0.0092
72	0.0093	0.0099	0.0101	0.0096	0.0113	0.0123
96	0.0101	0.0103	0.0112	0.0102	0.0118	0.0127
120	0.0103	0.0108	0.0113	0.0105	0.0120	0.0132
144	0.0104	0.0112	0.0116	0.0106	0.0121	0.0134
168	0.0106	0.0117	0.0119	0.0109	0.0122	0.0137
192	0.0111	0.0121	0.0121	0.0112	0.0124	0.0138
216	0.0114	0.0123	0.0122	0.0113	0.0125	0.0140
240	0.0117	0.0123	0.0123	0.0115	0.0128	0.0142
264	0.0118	0.0125	0.0124	0.0115	0.0129	0.0141
288	0.0118	0.0124	0.0124	0.0113	0.0126	0.0133
312	0.0114	0.0120	0.0123	0.0109	0.0122	0.0129
336	0.0108	0.0118	0.0121	0.0105	0.0118	0.0126

หมายเหตุ

S_{10} คือ น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร

S_{20} คือ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร

S_{30} คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

C_{10} คือ น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร

C_{20} คือ น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร

C_{30} คือ น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)					
	S_{10}	S_{20}	S_{30}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
72	3.36	2.37	2.99	1.96	2.40	3.15
96	3.89	3.55	3.79	2.23	3.07	3.36
120	3.45	3.62	3.71	3.02	3.47	4.56
144	2.16	3.55	3.80	3.66	3.92	5.67
168	3.32	3.42	3.92	3.91	4.86	5.66
192	3.35	3.84	3.97	4.01	3.33	5.60
216	4.28	4.60	4.86	3.57	3.94	5.85
240	4.94	4.61	5.74	3.45	4.51	6.34
264	5.07	5.10	4.90	4.86	5.03	5.18
288	4.86	5.56	4.93	3.23	5.32	6.77
312	4.81	5.6	5.05	5.63	5.56	7.01
336	3.98	5.75	6.57	3.77	6.08	6.84

หมายเหตุ

S_{10} คือ น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร

S_{20} คือ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร

S_{30} คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

C_{10} คือ น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร

C_{20} คือ น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร

C_{30} คือ น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลง (กรัมต่อลิตร)					
	S_{10}	S_{20}	S_{30}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
0	10.00	20.00	30.00	10.00	20.00	30.00
24	8.16	17.83	27.53	8.54	16.98	28.25
48	5.45	15.78	27.16	5.10	15.50	22.59
72	3.21	13.80	26.81	3.12	12.50	19.24
96	2.57	13.55	26.04	2.27	11.49	17.46
120	2.41	13.04	25.01	2.13	10.33	15.20
144	2.33	12.86	24.36	2.07	9.67	14.32
168	1.77	12.19	23.60	1.48	9.01	13.05
192	1.58	10.67	21.15	1.31	8.45	12.81
216	1.35	9.75	19.03	1.08	7.84	12.28
240	1.07	8.36	17.94	0.87	7.07	11.75
264	1.02	7.78	15.95	0.74	6.77	10.98
288	0.89	7.07	13.23	0.62	5.97	10.26
312	0.73	6.41	10.69	0.54	4.98	9.35
336	0.42	5.98	8.85	0.22	3.99	8.87

หมายเหตุ

S_{10} คือ น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร
S_{20} คือ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร
S_{30} คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร
C_{10} คือ น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร
C_{20} คือ น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร
C_{30} คือ น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง					
	S_{10}	S_{20}	S_{30}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
0	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
24	4.78	4.80	4.78	4.86	4.78	4.71
48	4.35	4.31	4.27	4.31	4.29	4.20
72	4.17	4.16	4.09	4.19	4.11	4.05
96	4.09	4.01	3.99	4.07	4.02	3.94
120	4.02	3.94	3.95	4.01	3.92	3.91
144	3.91	3.93	3.82	3.95	3.83	3.78
168	3.89	3.78	3.77	3.96	3.74	3.70
192	3.92	3.82	3.77	3.92	3.76	3.74
216	3.89	3.82	3.76	3.77	3.88	3.74
240	3.89	3.78	3.76	3.86	3.74	3.7
264	3.86	3.79	3.74	3.88	3.77	3.69
288	3.85	3.75	3.74	3.88	3.8	3.71
312	3.70	3.72	3.64	3.78	3.69	3.68
336	3.68	3.70	3.62	3.75	3.67	3.63

หมายเหตุ

S_{10} คือ น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร

S_{20} คือ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร

S_{30} คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

C_{10} คือ น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร

C_{20} คือ น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร

C_{30} คือ น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	117.225	3	39.075	9.878	.000
Within Groups	245.249	62	3.956		
Total	362.474	65			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: data

LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
sucrose	cane	1.15945	.68218	.094	-.2042	2.5231
	glucose	2.08654*	.69276	.004	.7017	3.4713
	lactose	3.64848*	.69276	.000	2.2637	5.0333
cane	sucrose	-1.15945	.68218	.094	-2.5231	.2042
	glucose	.92706	.69276	.186	-.4577	2.3119
	lactose	2.48904*	.69276	.001	1.1042	3.8737
glucose	sucrose	-2.08651*	.69276	.004	-3.4713	-.7017
	cane	-.92706	.69276	.186	-2.3119	.4577
	lactose	1.56198*	.70317	.030	.1564	2.9676
lactose	sucrose	-3.64848*	.69276	.000	-5.0333	-2.2637
	cane	-2.48904*	.69276	.001	-3.8738	-1.1042
	glucose	-1.56198*	.70317	.030	-2.9676	-.1564

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.635	5	3.927	3.199	.012
Within Groups	81.013	66	1.227		
Total	100.648	71			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: data

LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
sucrose10	sucrose20	.34167	.45230	.453	-1.2447	.5614
	sucrose30	-.56333	.45230	.217	-1.4664	.3397
	cane10	-.00083	.45230	.999	-.9093	.9022
	cane20	-.33500	.45230	.462	-1.2381	.5681
	cane30	-1.54333*	.45230	.001	-2.4464	-.6403
sucrose20	sucrose10	.34167	.45230	.453	-.5614	1.2447
	sucrose30	-.22167	.45230	.626	-1.1247	.6814
	cane10	.34083	.45230	.454	-.5622	1.2439
	cane20	.00667	.45230	.988	-.8964	.9097
	cane30	-1.20167*	.45230	.010	-2.1047	-.2986
sucrose30	sucrose10	.56333	.45230	.217	-.3397	1.4664
	sucrose20	.22167	.45230	.626	-.6814	1.1247
	cane10	.56250	.45230	.218	-.3406	1.4656
	cane20	.22833	.45230	.615	-.6747	1.1314
	cane30	.98000*	.45230	.034	-1.8831	-.0769

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
cane10	sucrose10	.00083	.45230	.999	-.9022	.9039
	sucrose20	.34083	.45230	.454	-1.2439	.5633
	sucrose30	.56250	.45230	.218	-1.4656	.3406
	cane20	-.33417	.45230	.463	-1.2372	.5689
	cane30	-1.54250*	.45230	.001	-2.4456	-.6394
cane20	sucrose10	-.33500	.45230	.462	-.5681	1.2381
	sucrose20	-.00667	.45230	.988	-.9097	.8964
	sucrose30	-.22833	.45230	.615	-1.1314	.6747
	cane10	.33417	.45230	.463	-.5689	1.2372
	cane30	-1.20833*	.45230	.010	-2.1114	-.3053
cane30	sucrose10	1.54333*	.45230	.001	.6403	2.4464
	sucrose20	1.20167*	.45230	.010	.2986	2.1047
	sucrose30	.98000*	.45230	.034	.0769	1.8831
	cane10	1.54250*	.45230	.001	.6394	2.4456
	cane20	1.20833*	.45230	.010	.3053	2.1114

*. The mean difference is significant at the .05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้