สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

นางสาวกัญชนิกา รุ่งเริงสุข
นางสาวบรรฑวรรณ แก้วกนก
นายบรรลือศักดิ์ สุขเจริญ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67285
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549
.b 11662861
.i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimization of Nitrogen Source for Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

Miss Kanchaniga Rungreangsuk

Miss Bantawan Kaewkanok

Mr. Banluesak Sukjaroen

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

นักศึกษา นางสาวกัญชนิกา รุ่งเริงสุข รหัสประจำตัว 45050181

นางสาวบรรฑวรรณ แก้วกนก รหัสประจำตัว 45050208

นายบรรลือศักดิ์ สุขเจริญ รหัสประจำตัว 45050209

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต	
กรรมการ รศ. สุขใจ ชูจันทร์	
กรรมการ ผศ. ลินจง ลุขลำภู	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

นักศึกษา นางสาวกัญชนิกา รุ่งเริงสุข
นางสาวบรรฑวรรณ แก้วกนก
นายบรรลือศักดิ์ สุขเจริญ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

ในการศึกษาชนิด และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยแหล่งไนโตรเจนที่นำมาศึกษามี 4 ชนิด คือ สารสกัดยีสต์ สารสกัดเนื้อ เปปโตน และโมโนโซเดียมกลูตาเมต ทำการหมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณสูงสุด คือ 4.99 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ 1.5942 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และอัตราการผลิต 0.2419 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 168 ของระยะเวลาการหมัก การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ ร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 2.0 จะผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณสูงสุด คือ 5.84 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ 0.5004 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และอัตราการผลิต 0.5761 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 264

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Optimization of Nitrogen Source for Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965	
Name	Miss Kanchaniga	Rungreangsuk
	Miss Bantawan	Kaewkanok
	Mr. Banluesak	Sukjaroen
Department	Applied Biology	
Program	Biotechnology	
Academic Year	2005	
Special Project Advisor	Associate Professor Sukjai Choojun	

ABSTRACT

The sort and concentration of nitrogen sources for producing propionic acid by *P. acidipropionici* ATCC 4965 were studied. The appropriate nitrogen sources are Peptone Yeast extract Beef extract and Monosodiumglutamate. At stationary state and temperature 30°C were used for fermentation. According to the experiment , Peptone is the best nitrogen source that could produced propionic acid 4.99 g/l at 168 hours of fermentation time. The propionic acid yield and productivity rate were 1.5942 g/g substrate and 0.2419 g/l/hr respectively. Because of Peptone gave the vast amount of propionic acid so the ratio of Peptone at 0.5 1.0 1.5 and 2.0 were studied. According to the experiment , the ratio of Peptone at 2.0 is the best concentration that could produced propionic acid 5.84 g/l at 264 hours of fermentation time. The propionic acid yield and productivity rate were 0.5004 g/g substrate and 0.5761 g/l/hr respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษ ในหัวข้อเรื่องการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนทั้งชนิด และปริมาณเพื่อใช้สำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีได้หากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ การตอบข้อซักถามของผู้จัดทำ และช่วยปรับปรุงข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทำการทดลอง "การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตโพรพิโอนิกโดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965" (Optimization of Nitrogen Source for Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965) จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ ในการเบิกเครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่างๆ

ขอขอบคุณแม่บ้าน และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่คอยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับเรื่องการเปิดและปิดห้องปฏิบัติการในวันที่มีการทำการทดลอง

ขอขอบคุณเพื่อนๆที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และช่วยกันคิดแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างทำการทดลอง ทำให้การทำโครงงานพิเศษเป็นไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนกำลังทรัพย์ในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่มีความสนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กัญชนิกา รุ่งเริงสุข
บรรฑวรรณ แก้วกนก
บรรลือศักดิ์ สุขเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก	3
2.2 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก	5
2.3 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิก	8
2.4 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ	9
2.5 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก	10
2.6 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก	13
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก	17
2.8 High – performance liquid chromatography (HPLC)	20
2.9 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC	21
2.10 ขั้นตอนในการใช้ HPLC	24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	27
3.1 อุปกรณ์	27
3.2 สารเคมี	28
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ	28
3.4 องค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้ในการทำโครงการพิเศษ	29
3.5 การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

3.6 การวิเคราะห์ผล 30
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ 31
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล
4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 32
4.2 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 34
4.3 การศึกษาปริมาณน้ำตาลแลคโตส ที่ใช้ไปในการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 36
4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 37
4.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มี เปปโตน ความเข้มข้นแตกต่างกัน 39
4.6 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มี เปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน 41
4.7 การศึกษาปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่นำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *P .acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตน ความเข้มข้นแตกต่างกัน 43
4.8 การศึกษาพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มี เปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน 44
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 47
เอกสารอ้างอิง 49
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี 53
ภาคผนวก ข. วิธีการวิเคราะห์ 56
ภาคผนวก ค. ตารางบันทึกผลการทดลอง 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1. คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก	4
2.2. การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ	9
2.3 ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรน ที่เหมาะสมกับตัวทำละลายแต่ละชนิด	25
4.1 แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965	36
4.2 ผลของความเข้มข้นของเปปโตนต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก	3
2.2	สูตรโมเลกุลของเกลือของกรดโพรพิโอนิก	3
2.3	สูตรโครงสร้างของแคลเซียมโพรพิโอเนต	4
2.4	สูตรโครงสร้างของโซเดียมโพรพิโอเนต	4
2.5	การย้อม แกรม ของเชื้อ *Propionibacterium* sp.	8
2.6	รูปเชื้อ *P. freudenreichii*	9
2.7	วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสโดยเชื้อ *Propionibacterium*	14
2.8	การสร้าง ซัคซิเนต และ โพรพิโอเนต โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์	15
2.9	กระบวนการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็นกรดโพรพิโอนิก	16
2.10	วิถีอะคริเลตของการสร้างโพรพิโอเนต	17
2.11	รูปเครื่อง High – performance liquid chromatography (HPLC)	20
4.1	แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	33
4.2	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	33
4.3	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	35
4.4	แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	37
4.5	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965	38
4.6	ปริมาณกรดต่างๆ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช เมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน	39
4.7	น้ำหนักเซลล์แห้งในการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มี เปปโตน ความเข้มข้นแตกต่างกัน	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

4.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน 41

4.9 แสดงผลผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเป่ปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน 42

4.10 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่นำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน 44

4.11 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 45

4.12 แสดงปริมาณกรดต่างๆ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช เมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 2.0 เป็นแหล่งไนโตรเจน 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตเพื่อการค้านิยมผลิตโดยกระบวนการทางเคมี เนื่องจากได้ผลผลิตสูงตามความต้องการและมีระยะเวลาในการผลิตที่เร็วกว่ากระบวนการทางชีวภาพ แต่กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้มีราคาค่อนข้างแพง เนื่องจากกระบวนการทำให้กรดบริสุทธิ์นั้นมีความยุ่งยากซับซ้อน ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพเนื่องจากผลิตภัณฑ์ไม่มีความเป็นพิษ และสามารถใช้กับอุตสาหกรรมประเภทอาหารได้ ค่าใช้จ่ายในการผลิตไม่สูงนัก การผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล Propionibacteria

แต่ข้อจำกัดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพนี้ เป็นผลมาจากการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกระบวนการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่น้อย ตัวอย่างเช่น การหมักแบบกะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียงร้อยละ 1 ถึง 3 ซึ่งใช้เวลาในการหมัก 7 ถึง 14 วัน จึงได้มีการคิดหาวิธีต่างๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้การตรึงเซลล์ การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะ การใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโพรพิโอนิก (Martinez, R. and Mayra de la Torre, 2002; Goswami, V., and Srivastava, A.K, 2001)

การทดลองนี้เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการคิดค้นสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้อาหารสังเคราะห์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

1.2.2 ศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก แล้วทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง กรดโพรพิโอนิก และน้ำตาลแลคโตส

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

การดำเนินงานวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1.4.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

1.4.1.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1.4.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

1.4.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

1.4.2.1 การศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

1.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง กรดโพรพิโอนิก และน้ำตาลแลคโตส

1.4.3 การวิเคราะห์ผล

1.4.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

1.5.2 ทราบถึงผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักอาหารสังเคราะห์ โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกจัดว่าเป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต โดยแบคทีเรีย (Prescott และคณะ,1959) กรดโพรพิโอนิกมีสูตรโมเลกุล คือ CH_3CH_2COOH มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.1 และมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิกดังแสดงในตารางที่ 2.1

สูตรโครงสร้าง : $C_3H_6O_2$

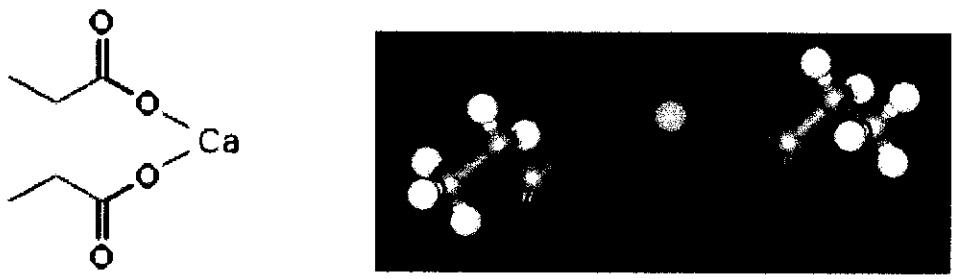
รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก
ที่มา : www.firehouse.com/mz/images/2003/9/12_organic3.gif

กรดโพรพิโอนิกที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนใหญ่นิยมใช้อยู่ในรูปของเกลือ ได้แก่ โซเดียมโพรพิโอเนต และแคลเซียมโพรพิโอเนต ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเกลือของกรดโพรพิโอนิกดังแสดงในรูปที่ 2.2

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

รูปที่ 2.2 สูตรโมเลกุลของเกลือของกรดโพรพิโอนิก
ที่มา : ศิวาพร, 2524

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของแคลเซียมโพรพิโอเนต

ที่มา : http://sci-toys.com/ingredients/calcium_propionate.gif

: http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/anderson/gifs/e282.gif

รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของโซเดียมโพรพิโอเนต

ที่มา : http://sci-toys.com/ingredients/sodium_propionate.gif

: http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/anderson/gifs/e281.gif

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ	กรดโพรพิโอนิก
น้ำหนักโมเลกุล	74.08
Conversion factor	1 พีพีเอ็มเท่ากับ 3.02 มิลลิกรัม ต่อลูกบาศก์เมตร 1 มิลลิกรัม ต่อลูกบาศก์เมตรเท่ากับ0.33 พีพีเอ็ม ที่25 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	-20 ถึง -22 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	141.1 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ	กรดโพรพิโอนิก
การละลายในสารละลาย	สามารถละลายได้ในเอทธานอลไดเอธิล อีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม
ความดันบรรยากาศ	2.55
ความดันไอ	0.32 ถึง 0.4 กิโลปาสคาล
อัตราการระเหย	ไม่ระเหย
อุณหภูมิวิกฤต	339 องศาเซลเซียส
ค่าความเป็นกรด	กรดอ่อน pKa 4.87
ความดันวิกฤต	5370 กิโลปาสคาล
ความคงตัว	มีความคงตัว
การกัดกร่อนเหล็ก	สามารถกัดกร่อน เหล็กกล้า นิกเกิล โครเมียม และ ตะกั่ว
สภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง	อุณหภูมิเกิน 50 องศาเซลเซียส
วัตถุที่ควรหลีกเลี่ยง	1.สารออกซิไดซ์ 2.Reactive metal 3.Reducing agent 4.กรดแก่

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

2.2 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก

2.2.1 ประโยชน์ของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิกเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ เป็นกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อรา กรดโพรพิโอนิกสามารถพบได้ตามธรรมชาติในอาหารประเภทหมักดอง ในเหงื่อของคน และในกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง กรดโพรพิโอนิกสามารถละลายได้ดีในน้ำ เอทธานอล และอีเทอร์ ส่วนเกลือโพรพิโอเนตสามารถละลายน้ำได้ร้อยละ 30 แต่ไม่ละลายในไขมัน (Helena Lind , 2004)

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ซึ่งไม่แตกตัวจึงมีประโยชน์ในการทำลายจุลินทรีย์ โดยจะไปละลายสารกายในเยื่อหุ้มเซลล์ มีการตั้งสมมุติฐานว่ากรดทำลายจุลินทรีย์ได้โดยไปรบกวนการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะไปยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ ทำให้สภาพภายในของเซลล์นั้นมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่มีผลช่วยในการยับยั้งการเจริญและทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ตายได้ในที่สุด พีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของโพรพิโอนิกให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 3.4 ถึง 4.5 โดยที่พีเอช 4 จะมีโมเลกุลของกรด และเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 88 ในขณะที่พีเอช 6 จะมีโมเลกุลที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 6.7 กรดที่ไม่แตกตัวทำให้เกิดการยับยั้งการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์สารประกอบนี้ให้ส่งผลในการป้องกันได้ดีในอาหารที่เป็นกรดต่ำ ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นจะใช้กรดโพรพิโอนิกที่อยู่ในรูปของเกลือ ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 3 รูปแบบ คือ เกลือโซเดียม แคลเซียม และโปแทสเซียม โดยเกลือโซเดียมจะละลายได้ดีกว่าเกลือแคลเซียม ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมปังจะนิยมใช้กรดโพรพิโอนิกในรูปของเกลือแคลเซียม เนื่องจากจะเป็นการเพิ่มแคลเซียมไปในตัวด้วย (ศิวาพร, 2524)

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

กรดโพรพิโอนิกจะมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่อ แอนไอออนไปรบกวนการแตกตัวของกรด อย่างไรก็ตามการทำลายจุลินทรีย์ของกรดก็มีข้อจำกัด ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นด้วย เช่น กรดอินทรีย์ไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากได้ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อช่วยในการเจริญได้ ความต้านทานกรดของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันมาก การนำกรดอินทรีย์มาใช้ในอาหารอาจทำให้เกิดจุลินทรีย์ชนิดทนกรดได้เพิ่มขึ้น

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพมากในการทำลายเชื้อรา จึงนิยมใช้เป็นสารป้องกันการเน่าเสียและช่วยในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร ช่วงพีเอชที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 3.5 ถึง 4.5 แต่ในประเทศไทย อนุญาตให้ใช้กรดโพรพิโอนิกได้ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

กุลยา (2533) รายงานว่า การใช้แคลเซียมโพรพิโอเนต และโซเดียมโพรพิโอเนตปริมาณร้อยละ 0.2 ถึง 0.4 ของขนมปัง จะสามารถป้องกันเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเมือกได้ การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของโซเดียมโพรพิโอเนตจะให้ผลที่ พีเอช 3.5 ถึง 4.5 ดีกว่าที่พีเอชสูง

Buchanan และ Ayres (1976) ได้มีการรายงานว่าการใช้กรดโพรพิโอนิก 0.1 กรัมต่อ 100 มิลลิกรัม ของอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* และสร้างอะฟลาทอกซินได้บางส่วน แต่ถ้าเพิ่มเป็น 0.2 กรัมจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการสร้างอะฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ ในระยะเวลา 7 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2.2.2 โทษของกรดโพรพิโอนิก (http:// msds.pcd.go.th.IsearchName.asp?VIP=742)

2.2.2.1 อันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ

กรดโพรพิโอนิกทำให้เกิดอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ โดยความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดในอากาศ จะทำให้คัดจมูก เจ็บคอ ไอ เสียงแหบ หายใจติดขัด ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรเคลื่อนย้ายผู้ป่วยออกจากที่ซึ่งมีกรดโพรพิโอนิกและนำผู้ป่วยไปยังที่ที่มีอากาศปลอดโปร่ง แล้วนำส่งแพทย์

2.2.2.2 อันตรายต่อผิวหนัง

อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อผิวหนังจะมีความรุนแรงระดับปานกลางถึงรุนแรงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรด และลักษณะการสัมผัส หากสัมผัสกรดโดยตรงจะทำให้ผิวเกิดรอยแดงและเจ็บ ถ้ารุนแรงจะทำให้ผิวไหม้เกิดแผลพุพองและเนื้อเยื่อถูกทำลาย บาดแผลจะจางลงหลังจาก 40 นาที ผิวที่แดงอาจเกิดการบวมและเนื้อเยื่อตาย (necrosis) และจะหายดีใน 3 วัน การสัมผัสกรดอาจส่งผลอย่างรุนแรงหากไม่ทำการล้างกรดออกจากผิวหนัง อาจทำให้เกิดบาดแผลถาวรได้ จากการศึกษาพบว่ากรดโพรพิโอนิกสามารถซึมผ่านผิวหนังทำให้เกิดอันตรายได้ ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรล้างบริเวณผิวหนังที่โดนกรดด้วยน้ำสะอาดทันที ถ้ากรดมีความเข้มข้นสูง และบาดแผลมีอาการหนัก ควรนำส่งแพทย์

2.2.2.3 อันตรายต่อตา

อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อตาหากถูกไอของกรดที่มีความเจือจางเข้าตา ทำให้เกิดอาการตาแดงและเจ็บ ถ้าถูกกรดที่มีความเข้มข้นเข้าตาโดยตรง ทำให้กระจกตาไหม้ โดยระดับความรุนแรงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรด ถ้ามีความรุนแรงมากอาจส่งผลถาวร และทำให้ตาบอด ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรล้างตรงบริเวณผิวหนังที่โดนกรดด้วยน้ำสะอาดทันที แล้วนำส่งแพทย์โดยทันที

2.2.2.4 อันตรายต่อระบบทางเดินอาหาร

อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อระบบทางเดินอาหารถ้าบริโภคกรดที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้ปาก ลำคอ กระเพาะ ได้รับบาดเจ็บ กรดโพรพิโอนิกไม่สะสมในร่างกาย ในธรรมชาติกรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตจากการแตกตัวของกรดไขมัน และโซ่ข้างของคลอเรสเตอรอลในร่างกาย โดยร่างกายจะทำการดูดซึมอย่างรวดเร็วผ่านทางเดินอาหาร และถูกขับออกจากร่างกายอย่างรวดเร็วผ่านทางลมหายใจ ปัสสาวะ และอุจจาระ ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรนำผู้ป่วยล้างปากด้วยน้ำ อย่าชักนำให้ผู้ป่วยอาเจียน ให้ดื่มน้ำ 240 ถึง 300 มิลลิลิตร หรือดื่มนมแล้วล้างปากผู้ป่วยทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

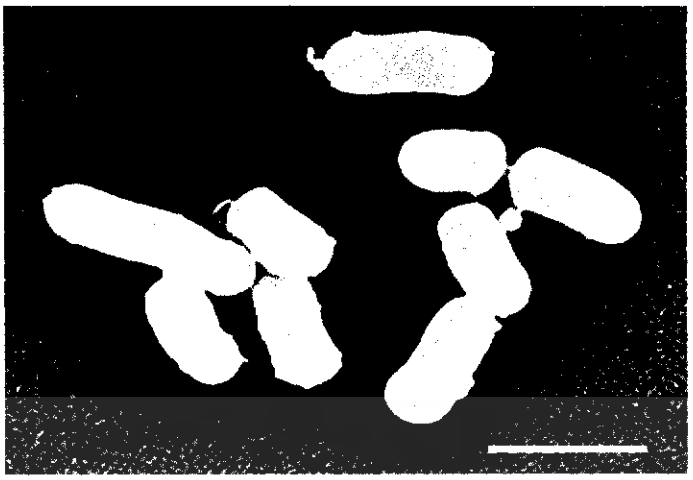
2.3 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิก

เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกนั้นจัดอยู่ในสกุล Propionibacteria ซึ่งเรียกว่าเป็นแบคทีเรียโพรพิโอนิก (Quesada-Chanto และคณะ, 1994) พบครั้งแรกโดยแยกได้จากเนยแข็งแบบสวิส (Swiss cheese) ผลลัพธ์จากกระบวนการหมักจะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะทำให้เกิดลักษณะที่เป็นรูพรุนในเนยแข็ง

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียพวกนี้คือ ลักษณะแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ มีการเจริญแบบแฟคคัลเททีฟแอนแอโรบ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส สามารถหมักได้กรดโพรพิโอนิก ซัคซินิก อะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ มีความต้องการทางอาหารที่ซับซ้อน เจริญเติบโตช้า แหล่งที่พบแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมหรือกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นม มีอยู่ด้วยกัน 6 สายพันธุ์ คือ *Propionibacterium freudenreichii P. jensenil P. theonil, P. acidipropionici P. coccoides* และ *P. cyclohexanicum* ส่วนกลุ่มที่สองคือ กลุ่มที่เจริญอยู่บนผิวหนังของมนุษย์หรือกลุ่มที่ทำให้เกิดสิว กลุ่มนี้ไม่ค่อยมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม

รูปที่ 2.5 การย้อม แกรม ของเชื้อ *Propionibacterium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 เชื้อ *Propionibacterium freudenreichii*

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

2.4 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ

ปัจจัยหลักของการผลิตกรดโพรพิโอนิกขึ้นอยู่กับที่สายพันธุ์ของเชื้อดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ

Species	Strain reference	Propionic acid (70 h) g/l	pH
P. acidipropionici	ATCC 4965	9.8	4.65
	CNRZ 287	7.5	4.67
	CNRZ 721	2	5.67
	CNRZ 733	0	4.4
P. thoenii	ATCC 4871	8	4.62
P. jensenii	ATCC 4870	0	5.82
	CNRZ 83	2	5.1
	ATCC 4867	0	5.1
	CNRZ 731	0	4.11
P. freudenreichii subsp. *freudenreichii*	NCIB 5959	0	5.82
	CNRZ 89	3.1	5.03
	CNRZ 725	2.6	5.29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Species	Strain reference	Propionic acid (70 h) g/l	pH
P. freudenreichii subsp. *freudenreichii*	CNRZ 727	3.2	5.1
	CNRZ 728	3.2	5.24
	CNRZ 729	3.2	5.31
P. freudenreichii subsp. *shermanii*	*NCIB*	3.7	5.15
	CNRZ	2.3	5.18
	CNRZ	4.5	4.73
	CNRZ	0	5.81
P. freudenreichii subsp. *shermanii*	*SO-STANDA*	6	4.51
	2908-STANDA	6.2	4.45
	2910-STANDA	1.92	5.67
	7916-STANDA	0.55	5.9
	PSI-BOLL	0.82	5.2

ที่มา : Colomban และ คณะ (1993)

2.5 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ 2 วิธี

2.5.1 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี

การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยวิธีสังเคราะห์ทางเคมีเป็นวิธีที่นิยมใช้ผลิตในทางการค้าอยู่ในปัจจุบันเพราะเป็นกระบวนการผลิตที่ใช้เวลาในการผลิตสั้นและได้ผลผลิตตามต้องการ

2.5.2 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium* แต่ข้อจำกัดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพนี้เป็นผลมาจากการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกระบวนการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่น้อย ตัวอย่างเช่น การหมักแบบกะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียงร้อยละ 1 ถึง 3 ซึ่งใช้เวลาในการหมัก 7 ถึง 14 วัน (Beate Schuppert และคณะ,1992) จึงได้มีการคิดหาวิธีต่างๆเพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีต่างๆ เช่น การใช้การตรึงเซลล์ (Shang-Tian Yang และคณะ,1994) การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Martinez และคณะ, 2002) การใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโพรพิโอนิก (Quesada-Chanto และคณะ, 1994)

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) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการหมักกรดโพรพิโอนิกโดยการใช้แลคโตส กลูโคสและแลคเตทเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* spp. *shermanii* ในสภาพการหมักแบบกะ การเติมกลีเซอรอลจำนวน 20 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อผลิตกรดนั้น พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ใช้เวลาในการหมักสั้นกว่า *P. shermanii* ถึง 2 เท่า คือ 54 ชั่วโมง และ 110 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่ได้พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ให้ผลผลิตที่สูงกว่าเชื้อ *P. shermanii* คือ 12 กรัมต่อลิตร และ 9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในทำนองเดียวกันการเติมกลูโคสจำนวน 20 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ *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) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก และวิตามินบี 12 จากซูโครส พบว่าความเข้มข้นของ $FeSO_4.7H_2O$ 1.5 มิลลิกรัม ธาตุโคบอลต์ 0.75 มิลลิกรัม 5,6dimethykbenzimidazol 0.3 มิลลิกรัม และสารสกัดยีสต์ 12 กรัม นั้นมีความจำเป็นที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม สำหรับในการผลิตเพื่อให้ได้กรดโพรพิโอนิกนั้นจะต้องทำในสภาวะที่ไม่มีอากาศที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และในการผลิตวิตามินบี12 นั้นทำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีอากาศที่พีเอช 6.5

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคส และแลคเตทจาก corn steep liquor (CSL) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* สายพันธุ์ P200910 เมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแอลจิเนตและเชื้ออิสระในสภาพการหมักแบบกะ กึ่งกะ และต่อเนื่อง พบว่าการหมักแบบกะจะแสดงผลผลิตของกรดสูงสุดภายในเวลา 36 ชั่วโมง การใช้แลคเตทเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าการใช้กลูโคสและเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตจะให้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้ออิสระ ส่วนการหมักแบบกึ่งกะใช้เวลาในการหมักนาน 250 ชั่วโมง ความเข้มข้นสูงสุดของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้กลูโคสจะสูงกว่าการใช้แลคเตท คือ 57 และ 45.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในการหมักแบบต่อเนื่อง การใช้กลูโคสจะให้ผลผลิตของกรดโดยเชื้อที่ถูกตรึงสูงกว่าการใช้แลคเตท

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

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

E.H.Himmi และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้กลูโคส และ กลีเซอรอล เป็นแหล่งอาหาร โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* จะได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ และได้ผลิตผลพลอยได้ คือ กรดอะซิติก n-propanol และกรดซัคซินิก จากการทดลองนี้ พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน จะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้มากที่สุด *P. acidipropionici* มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นได้เร็วกว่า 0.64 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดสูงกว่า 0.42 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ได้จะมากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นถึง 2 เท่า ส่วนเชื้อ *P. freudenreichii* เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการใช้กลีเซอรอลกับการสร้างผลผลิต แสดงว่าเมแทบอไลท์ของเชื้อ *P. freudenreichii* นั้นปรับตัวเพื่อนำไปใช้ในการสร้างสารประกอบตัวอื่นได้ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีเยี่ยมสำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Martinez และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยในสภาพการหมักแบบกึ่งกะจากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* มีการเติมกลูโคสหรือแลคเตทหรือสารผสมระหว่างกลูโคส และแลคเตท กลูโคส และแลคเตท จะถูกใช้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การใช้แลคเตทและกลูโคสร่วมกันจะเพิ่มอัตราการผลิตโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) แล้วยังเป็นการเพิ่มส่วนของธาตุคาร์บอนสำหรับที่จะนำไปใช้ในการผลิตชีวมวล ผลผลิตของโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) เท่ากับ 7.6 เมื่อใช้แลคเตทและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) เท่ากับ 1.34 เมื่อใช้แลคเตท อย่างเดียว และ 1.85 เมื่อใช้กลูโคสอย่างเดียว ปริมาณธาตุคาร์บอนที่เก็บเกี่ยวได้ในชีวมวลมีค่าเท่ากับ 0.09 เมื่อใช้กลูโคส 0.12 เมื่อใช้ แลคเตท และ 0.21 เมื่อใช้แลคเตท และกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์

2.6 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก

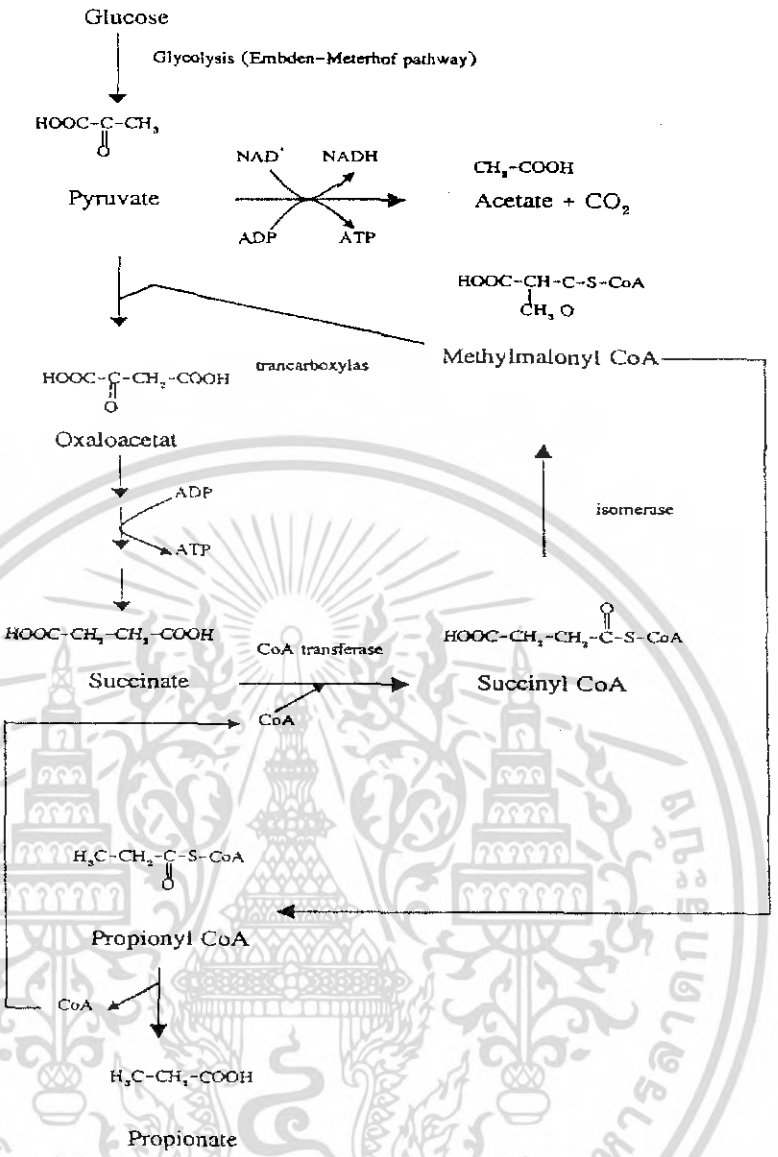
Virtanen (1923) ทำการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวทโดย Embden - Mayerhof pathway จากนั้นไพรูเวทจะเกิดปฏิกิริยาแยกได้ 2 ทาง คือทางที่หนึ่งจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นกรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ ทางที่สองจะถูกรีดิวส์ไปเป็นกรดโพรพิโอนิก การเปลี่ยนกลูโคส แลคเตท หรือไพรูเวท ไปเป็นกรดโพรพิโอนิกนั้นจะมีอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติกอยู่ระหว่าง 1.6 ถึง 1.8 ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์

Wood และ Werkman (1940) ทำการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถเปลี่ยนกรดซัคซินิกไปเป็นกรดโพรพิโอนิก และคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณโมลเท่ากับโมลของซัคซินิกที่ใช้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ และได้กรดอะซิติกปริมาณเล็กน้อย และไม่พบผลผลิตอื่น

ในกระบวนการหมักโดยทั่วไปมักจะเกิดคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตผลสุดท้ายเสมอ สำหรับสิ่งมีชีวิตนั้นการสร้างซัคซิเนต และโพรพิโอเนต โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ การผลิตกรดโพรพิโอนิกสามารถเกิดขึ้นได้หลายวิถีด้วยกัน

คาร์บอนจากแหล่งต่างๆ จะถูกใช้ไปในการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลผลิตโดยเชื้อ *Propionibacterium* โดยเริ่มจากสารตัวกลางที่สำคัญคือ ไพรูเวต ออกซาโลอะซิเตต (Oxaloacetate) มาเลต และโพรพิโอเนต ตามลำดับที่ได้มาจากกลูโคสหรือแลคเตท (Roberto และคณะ, 2002) ดังรูปที่ 2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



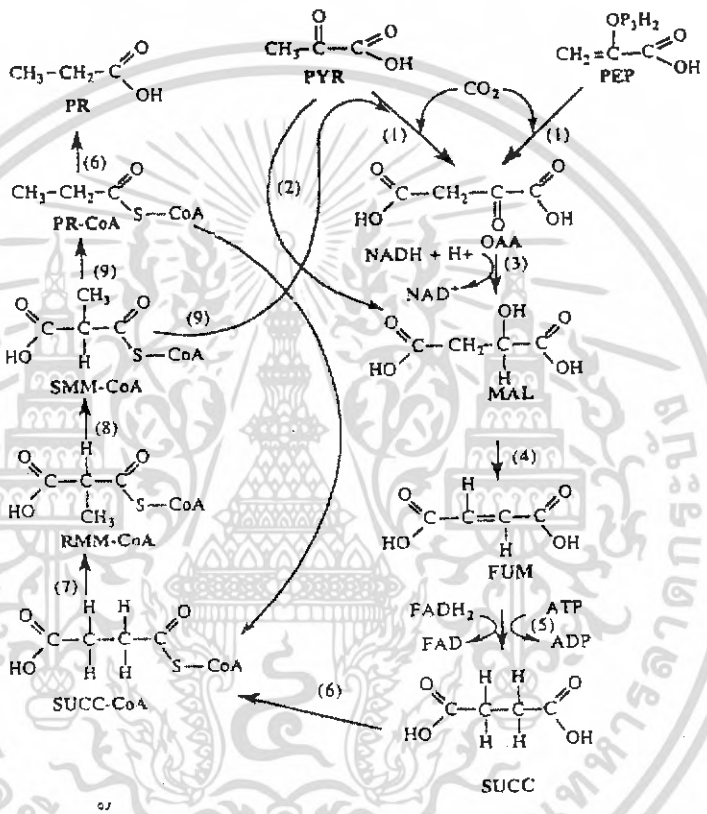
รูปที่ 2.7 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสโดยเชื้อ *Propionibacterium*

ที่มา : Papoutsakis และ Meyer (1985)

การสร้างซัคซิเนต และโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ได้แสดงในรูปที่ 2.8 การสร้างจะเริ่มต้นจากการสร้างออกซาโลอะซิเตตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้กลับไพรูเวต (Pyruvate) หรือ ให้กับฟอสโฟอีนอลไพรูเวต (PEP) จะถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอล-มาเลต (L-malate) โดยการทำงานของเอนไซม์มาลิกดีไฮโดรจิเนส (malic dehydrogenase) กรดมาลิก (malic acid) ที่ได้จะถูกดึงน้ำออกโดยเอนไซม์ฟูมาเรส (Fumarase) ทำให้ได้กรดฟูมาริก (Fumaric acid) ซึ่งปฏิกิริยานี้ผันกลับได้จากนั้นฟูมาเรสจะถูกเปลี่ยนให้เป็นซัคซิเนตโดยเอนไซม์ฟูมาเลตรีดักซ์เตส (Fumarate reductase) ซัคซิเนตเป็นตัวกลางในกระบวนการ โดยซัคซิเนตจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โคเอทรานเฟอ-เรส (CoA tranferase) ได้ซัคซินิลโคเอ (Succinyl CoA) ปฏิกิริยาต่อไปนี้ซัคซินิลโคเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเปลี่ยนไปเป็น อาร์-เมททิล มาโลนิลโคเอ (R-methyl malonyl CoA) โดยเอนไซม์อาร์-เมททิล มาโลนิลมิวเตส (R-methyl malonylmutase) หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนอาร์-เมททิลมาโลนิลโคเอ ไปเป็นเอส-เมททิล มาโลนิลโคเอ (S-methyl malonyl CoA) คาร์บอนของเอส-เมททิล มาโลนิล โคเอ จะถูกย้ายออกไปรวมกลับไพรูเวททำให้เกิดการสร้างออกซาโลอะซิเตต เมื่อคาร์บอนเคลื่อนย้าย ออกไปจะทำให้ได้โพรพิโอนิล โคเอ (Propionyl CoA) จะถูกย้ายโคเอ (CoA) ออกจากโมเลกุล ทำ ให้โคเอที่จะนำไปใช้กับซัคซิเนตตัวต่อไป และทำให้ได้กรดโพรพิโอนิก(Propionic acid)

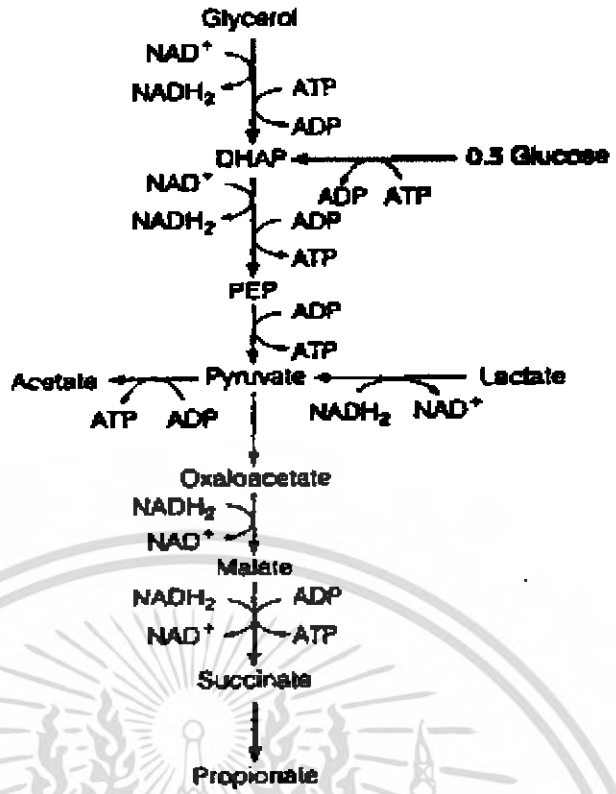


รูปที่ 2.8 การสร้าง ซัคซิเนต และโพรพิโอเนต โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

ที่มา : Papoutsakis และ Meyer (1985)

Barbirato และคณะ (1997) ได้ศึกษาการหมักกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลซึ่งพบว่า กระบวนการเปลี่ยนแปลงจากกลีเซอรอลไปเป็นกรดโพรพิโอนิกเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) โดย 2 โมล ของ ATP จะถูกใช้ไปเพื่อสังเคราะห์ 1 โมล ของกรดโพรพิโอนิก ดังแสดง ในรูปที่ 2.9

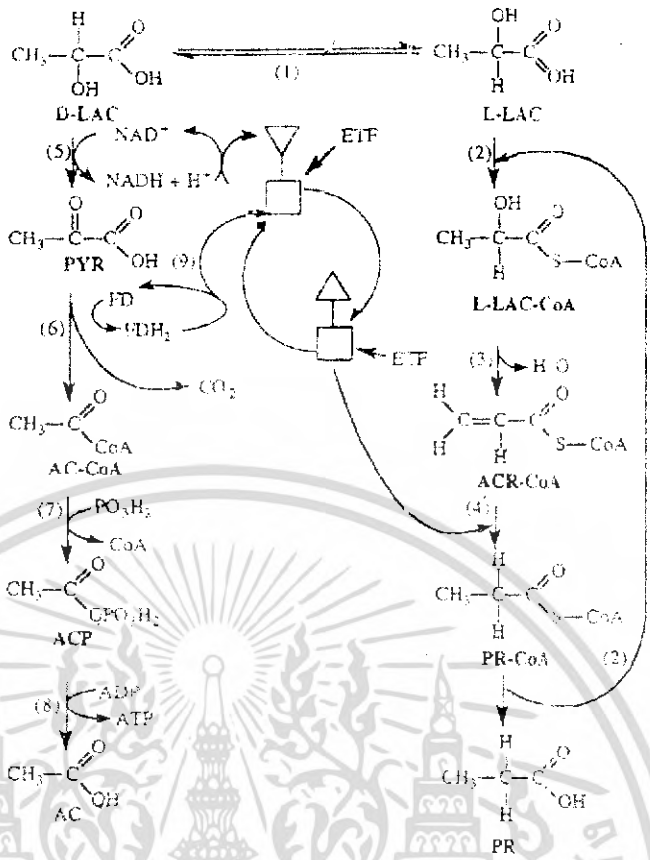
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 กระบวนการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็นกรดโพรพิโอนิก
ที่มา : Barbirato และคณะ (1997)

วิถีอะครีเลต (Acrylate) ของการสร้างโพรพิโอเนต รายละเอียดของวิถีนี้แสดงในรูปที่ 2.10 กรดโพรพิโอนิกจะถูกสร้างขึ้นตามลำดับ โดยเริ่มต้นจากการเปลี่ยนรูปของแอล-แลคเตท (L-lactate) ไปเป็น แอล-แลคติล โคเอ (L-lactryl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์โคเอ ทรานเฟอเรส (CoA transferase) แอล- แลคติล โคเอจะเปลี่ยนรูปกลายไปเป็น อะซิลิล โคเอ (Acrylyl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีไฮดราเทส อะซิลิลโคเอ (Dehydratase acrylyl CoA) จะเปลี่ยนไปเป็นโพรพิโอนิล โคเอ โดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของฟราโวโปรตีน (flavoprotein) โพรพิโอนิลโคเอจะย้ายโมเลกุลโคเอไปสู่ แอลแลคเตท เพื่อสร้างแอลแลคติล โคเอ และเกิดเป็นกรดโพรพิโอนิกอิสระ การสร้างอะซิเตต (acetate) และคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดควบคู่กับการสร้างโพรพิโอเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 วิถีอะครีเลตของการสร้างโพรพิโอเนต

ที่มา : Papoutsakis และ Meyer

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

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

และยังสามารถเปลี่ยนกรดแลคติกไปเป็นกรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก ดังสมการ

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

(Tyree และคณะ, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67285

Lewis และ Yang (1992) ได้มีการศึกษาทดลองพบว่าในกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ *Propionibacterium acidipropionici* ในอาหารที่มีแลคเตทที่พีเอช 6.6 จะเจริญได้น้อยกว่าในอาหารที่มีกลูโคส

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

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

Yang และ Huang (1995) ได้ทำการทดลองโดยการหมักแบบ recycle batch จากเชื้อ *P. acidipropionici* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกจะได้ร้อยละ 90 ของผลผลิตทางทฤษฎี

2.7.2 แหล่งไนโตรเจน

Prescott และ Dunn (1959) ได้ทำการศึกษาพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีอิทธิพลต่ออัตราการหมักและอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติก *P. shermanii* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด สารสกัดยีสต์ เนื้อสัตว์ แต่สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3 แหล่งเกลือแร่

Gebgardt และคณะ (1970) ได้ทำศึกษาพบว่า โคบอลท์มีอิทธิพลต่อการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโคบอลท์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีเชื้อ *P. shermanii* ร้อยละ 55 ถึง 60 ของน้ำหนักแห้ง แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโคบอลท์การเจริญของเชื้อจะลดลง

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

2.7.4 แหล่งวิตามิน

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

2.7.5 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)

2.7.6 อุณหภูมิ

โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญอยู่ระหว่าง 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส (Cavin และคณะ, 1985) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของ *P. 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

2.7.7 การให้อากาศ

Shaposhnikov และ Vorob'eva (1963) พบว่า *P. jensenii* สามารถเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศใกล้เคียงกับภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

Menon และ Shemin (1967) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. shermanii* ภายใต้สภาวะมีอากาศอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกจะต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 High – performance liquid chromatography (HPLC)

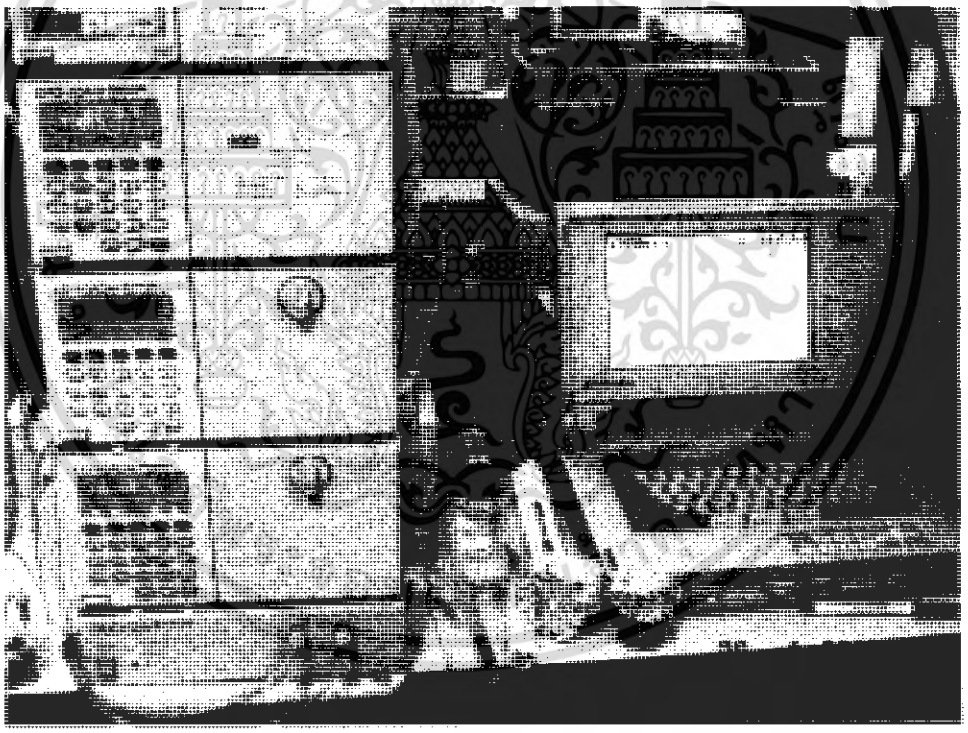
HPLC เป็นวิธีการหนึ่งของการแยกทางโครมาโทกราฟี ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นของเหลวพาสารละลายตัวอย่างไหลผ่านเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) ที่เป็นอนุภาคเล็กซึ่งบรรจุอัดแน่นในท่อ Stainless ที่เรียกว่าคอลัมน์ (Column) ทำให้เกิดการแยกสารประกอบจากสารละลายตัวอย่างเข้าสู่เครื่องตรวจวัดสัญญาณ (Detector) การไหลของเฟสเคลื่อนที่นี้ต้องอาศัยแรงดันมาพอสมควร จึงจะสามารถส่งผ่านไปทั้งระบบได้ ส่วนที่เป็นหลักในการสร้างแรงดันคือปั๊ม (Pump) นั่นเอง

ดังนั้นคำว่า HPLC จึงมีความหมายได้ว่า

High Performance Liquid Chromatography

High Pressure Liquid Chromatography

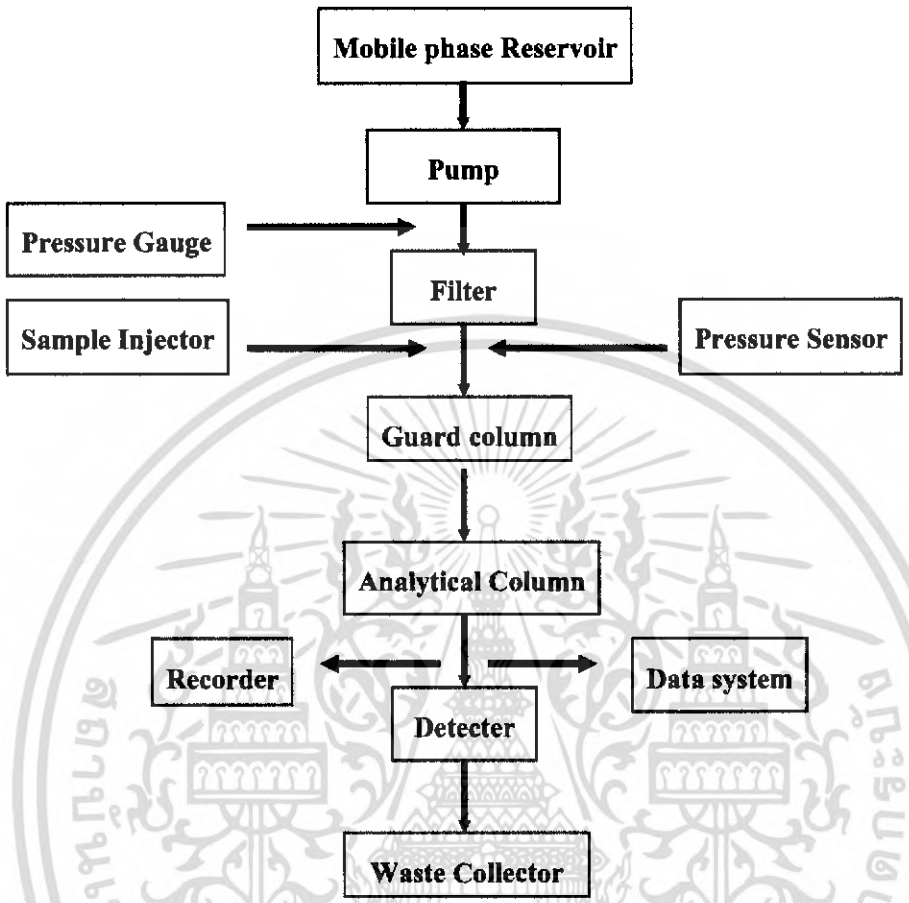
High Speed Liquid Chromatography



รูปที่ 2.11 รูปเครื่อง High – performance liquid chromatography (HPLC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC



2.9.1 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase reservoires)

ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ ควรเป็นขวดแก้วเพื่อจะได้ไม่เกิดปฏิกิริยาทางเคมีใดๆกับเฟสเคลื่อนที่ ในปัจจุบันขวดที่ใส่เฟสเคลื่อนที่นี้จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น แก๊สออกซิเจน จุดประสงค์ของการไล่อากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ก็คือ ต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่กับเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมภ์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหาขณะทำการทดลองอยู่

สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ และสารละลายของเกลือชนิดต่างๆ ที่ถูกปรับพีเอชให้มีค่าที่เหมาะสมกับการแยก ในกรณีที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ ควรบรรจุในขวดแก้วสีชาเพื่อลดความเข้มของแสงที่จะทำให้แบคทีเรีย หรือจุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำเจริญเติบโตได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2.9.2 ระบบของปั๊ม (Pumping system)

ทำหน้าที่สูบดันเฟสเคลื่อนที่เข้าคอลัมน์ในอัตราเร็วที่กำหนดได้อย่างแม่นยำ โดยความดันของระบบจะขึ้นอยู่กับอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ ถ้ากำหนดให้มีอัตราเร็วในการไหลของเฟสเคลื่อนที่สูง ความดันของปั๊มก็จะมีค่าสูง โดยปกติความดันที่ใช้ใน HPLC ไม่ควรเกิน 400 บาร์ ถ้าขณะอ่านผลผ่านเครื่องโครมาโทแกรม (chromatogram) ความดันของปั๊มเกิดลดลงอย่างมากจนเกือบ 0 บาร์ แสดงว่าต้องมีการรั่ว (Leak) ในเครื่องให้ตรวจสอบและแก้ไข และในทางตรงกันข้าม ถ้าความดันมีค่าสูงเกิน 400 บาร์แสดงว่ามีสิ่งอุดตันในระบบ ต้องตรวจสอบและแก้ไข โดยระบบปั๊มมี 2 ชนิด ได้แก่

2.9.2.1 Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่ ปั๊มประเภทนี้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

(1) Syringe pump เป็นปั๊มที่มีลักษณะเป็นกระบอกสูบ

(2) Reciprocating pump เป็นปั๊มที่มีลักษณะเป็นแบบชักลูกสูบ

2.9.2.2 Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

หลักการเลือก Pumping system

- ปั๊มและส่วนประกอบต้องทำด้วยวัสดุที่ทนต่อการสึกกร่อนด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ และสะดวกต่อการบำรุงรักษา
- ปั๊มเฟสเคลื่อนที่ในปริมาตรมากๆ ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีขัดข้อง
- สามารถให้ความดันได้ถึง 4,000 ถึง 6,000 psi เพื่อปั๊มผ่านคอลัมภ์ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กได้ อย่างน้อยต้องให้ความดันถึง 500 psi
- สามารถให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงถึง 3 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นอย่างน้อย และคงที่
- ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต้องไม่เกินร้อยละ 1 ถึง 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ควรมีปริมาตรภายในต่ำเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

2.9.3 หน่วยฉีดสารตัวอย่าง (Injection Unit)

การฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์ต้องมีความเที่ยงตรง และแม่นยำสูง ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ต้องไม่เกินขีดจำกัด หรือทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง โดยทั่วไปแล้ว Injector มีให้เลือกใช้ทั้งชนิด Manual และ Auto

2.9.4 คอลัมน์ (Column)

ในส่วนของคอลัมน์ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Guard column และ Analysis column

- **Guard column** โดยปกติส่วนมากที่ใช้มีขนาด 5.0 cm x 4.6 mm id. วัสดุที่บรรจุภายในเป็นประเภทเดียวกับคอลัมน์ที่ใช้แยก แต่มีอนุภาคใหญ่กว่าหรือเท่ากันกับคอลัมน์ ทำหน้าที่กรอง Particle ช่วยยืดอายุการใช้งานของ Analytical column

- **Seperating Column** โดยมากทำด้วย Stainless Steel ซึ่งทนต่อความดันสูงๆ ได้ดี ผิวด้านในเรียบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากันตลอด โดยปกติที่ใช้งานทั่วไปมีขนาดดังนี้

External diameter	6.35	mm. (1/4 inch)
Internal diameter	4.6	mm.
Length	10-100	cm.
Particle size	5.50	µm.

แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

- **คอลัมน์สำหรับงานวิเคราะห์ (Analytical column)** เป็นคอลัมน์ที่ใช้สำหรับงานวิเคราะห์ทางคุณภาพและทางปริมาณ ในวิธี HPLC

- **คอลัมน์สำหรับเตรียมตัวอย่าง (Preparative column)** เป็นคอลัมน์ที่ใช้แยกสารผสมออกจากกัน แล้วเก็บแต่ละส่วนที่แยกออกจากกันได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นต่อไป

2.9.5 เครื่องตรวจวัด (Detector) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.9.5.1 Solute property หรือ selective detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น

(1) UV – VIS Detectors

หลักการ คือ อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง นิยมใช้กันมากใน HPLC เพราะเครื่องตรวจนี้มีลักษณะที่พิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหล และอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างจะมีความไวสู.กับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

(2) Fluorescent Detector

มีสภาพไวสูงและเฉพาะ เนื่องจากมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวีจากแหล่งกำเนิด โดยผ่านเครื่องกรองแสง หรือโมโนโครเมเตอร์ เพื่อให้แสงที่มีความยาวคลื่นตามที่ต้องการผ่านเข้าไปยัง flow cell ที่ใส่สารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์ สารตัวอย่างจะให้ฟลูออเรสเซนต์ออกมาซึ่งมีความยาวคลื่นเฉพาะจะผ่านไปยังฟิลเตอร์ หรือโมโนโครเมเตอร์เพื่อตัดแสงที่ไม่ต้องการออก จากนั้นจึงให้แสงผ่านเขาไปยังดีเทคเตอร์ซึ่งเป็นโฟโตเซลล์

2.9.5.2 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

2.9.6 เครื่องบันทึกข้อมูล และประมวลผล (Recorder and Data procession)

ปัจจุบันการบันทึกข้อมูล และประมวลผลต่างๆ สามารถทำได้โดยใช้ soft ware computer ที่บริษัทผู้ผลิตเครื่องมือเป็นผู้สร้างขึ้น และระบบการทำงานของเครื่องมือทั้งหมดถูกควบคุมได้ด้วยคอมพิวเตอร์ ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง และเที่ยงตรงมากขึ้น ข้อมูลที่ถูกบันทึกไว้ในหน่วยความจำของเครื่องคอมพิวเตอร์ทำให้ผู้วิเคราะห์มีความสะดวก และง่ายในการนำข้อมูลมาประมวลผล และเก็บผลนั้นไว้ได้โดยไม่สิ้นเปลืองกระดาษบันทึกผล

2.10 ขั้นตอนในการใช้ HPLC

2.10.1 การเตรียมสารละลายที่จะใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่

เตรียมสารละลายของเฟสเคลื่อนที่ให้มีความเข้มข้นและปริมาณตามที่ต้องการ ซึ่งขึ้นอยู่กับเรื่องที่จะทำการทดลอง และต้องกรองเฟสเคลื่อนที่ด้วยแผ่นเมมเบรนขนาด 0.2 หรือ 0.45 μm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อนนำไปใช้ด้วยชุดกรอง ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรนต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของตัวทำละลายด้วย ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2.3 ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรน ที่เหมาะสมกับตัวทำละลายแต่ละชนิด

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

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

2.10.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ตัวอย่างที่จะนำเข้าไปฉีดในระบบต้องสะอาดเพียงพอ คือปราศจากสิ่งปนเปื้อนที่จะไปลดหรือทำลายประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ทำการวิเคราะห์ และต้องไม่ให้มีตะกอนหรือฝุ่นผง ดังนั้นตัวอย่างต้องผ่านขั้นตอนในการเตรียมที่เหมาะสมเพื่อขจัดมลทินออไป วิธีกำจัดสิ่งปนเปื้อนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

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

เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างนั้นๆแล้ว ก่อนฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ควรกรองตัวอย่างด้วย syringe membrane filter ขนาด 0.20 μm. ก่อน

หมายเหตุ เฟสเคลื่อนที่และตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างควรเป็นเกรด HPLC เพื่อผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และอายุการใช้งานของคอลัมน์ที่ยาวนาน

2.10.3 การเลือกคอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่ (Column selection and Mobile phase selection)

เมื่อต้องการอ่านผลผ่านเครื่องโครมาโทแกรม (chromatogram) ของสารตัวอย่าง ต้องศึกษาคุณสมบัติของสารตัวอย่าง เพื่อเลือกคอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่ให้ถูกต้อง ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สุดในการทำปฏิบัติการทดลอง การเลือกขึ้นอยู่กับชนิด และคุณสมบัติของตัวอย่างว่าเป็นประเภทใด

ปัจจุบันคอลัมน์ที่นิยมนำมาใช้ ในการวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทต่างๆ คือ bond – phase column ที่มีหมู่ฟังก์ชันนอลได้หลายชนิด มีทั้งที่เป็น polar เช่น cyano หรือ amino (ทำให้เกิดการวิเคราะห์แบบ normal phase) และ non polar เช่น octadecyl (ทำให้เกิดการวิเคราะห์แบบ reverse phase) โดยคอลัมน์ที่นิยมใช้มากกว่า คือ reverse phase column ชนิด C_8 หรือ C_{18} ซึ่งสามารถแยกได้ทั้งสารตัวอย่างที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ในกรณีของตัวอย่างที่มีขั้วจะใช้หลักการของ ion – pair เมื่อต้องการให้เกิดการแยกสามารถใช้วิธีปรับเปลี่ยนค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ หรือ ความเข้มข้นของ pairing ion ในกรณีของสารตัวอย่างไม่มีขั้ว สามารถทำให้เกิดการแยกได้โดยปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่

2.10.3 การอ่านผล

ทำการศึกษาวิธีการใช้เครื่อง HPLC อย่างละเอียดก่อนลงมืออ่านผลผ่านเครื่องโครมาโทแกรม (chromatogram) เมื่ออ่านผลเสร็จแล้ว ข้อมูลต้องถูกบันทึกไว้ใน folder ที่จำเพาะของการเก็บข้อมูล และเป็นของแต่ละผู้วิเคราะห์ ไม่ควรปะปนกัน เพื่อความสะดวกในการเรียกข้อมูลมาทำการประเมินและแปรผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กับเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) การหาน้ำตาลแลคโตส ดูในภาคผนวก

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่อง HPLC (Hight Performannce Liquid Chromatography) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น C-R7 Ae plus

คอลัมน์ ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ยี่ห้อ INERTSIL รุ่น C8-3

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-1601

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-Visible

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) 600 นาโนเมตร ยี่ห้อ Eppendorf

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ MEMMERT

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ FALCON 6/300 รุ่น MSB-300.CR 3.K

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ HERMLE รุ่น Z 383 K

เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA MFG. CORP.

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น EB-4000H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ SARTORIUS

เครื่องวัดพีเอช ยี่ห้อ CYBERSCAN 2000

ตู้อบ 150 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ WTB BINDER รุ่น ED53

ตู้อบ 105 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ AStell Hearson

ตู้อบ 98 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ WTB BINDER รุ่น FD53

ตู้เย็นอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ NATIONAL รุ่น NR-A223WS

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ยี่ห้อ MICROFLOW รุ่น Model ABS 1200

กระดาษกรอง (Cellulose acetate filter) ขนาด 0.45 นาโนเมตร ยี่ห้อ SARTORIUS

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

หลอดทดลอง (Test tube)

กระบอกตวง (Cyclinder)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บีกเกอร์ (Beaker)

ปีเปตต์ (Pipette)

คิวเวต (แก้ว)

โถดูดความชื้น (Dasicator)

เครื่องสั่นสะเทือนด้วยเสียง (Sonicate) ยี่ห้อ CREST

3.2 สารเคมี

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)

สารสกัดเนื้อ (Beef extract)

เปปโตน (Peptone)

โมโนโซเดียมกลูตาเมต (Monosodiumglutamate)

ทริปทิเคส ซอย บรอท (Trypticase soy broth)

แลคโตส (Lactose)

วุ้น (agar)

น้ำกลั่น

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 .4H_2O$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 .7H_2O$)

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

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

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการโครงงานพิเศษ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

3.4 องค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้ในการทำโครงการพิเศษ

สารสกัดยีสต์ ทริปทิเคส ซอย บรอท น้ำตาลแลคโตส และ Minor element

ปริมาณสารอาหารที่ใช้ในสูตรอาหาร มีดังนี้

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

ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 6.5 ถึง 7 แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อโดยการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5 การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

3.5.1 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

โดยใช้สูตรอาหารที่ทำให้เชื้อผลิตกรดโพรพิโอนิกได้จากข้อ 3.4 โดยผันแปรชนิดแหล่งไนโตรเจน ดังนี้

สูตรที่ 1 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งไนโตรเจนเดิม

สูตรที่ 2 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 สารเปปโตน (Peptone) ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งไนโตรเจนเดิม

สูตรที่ 3 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 สารสกัดเนื้อ (Beef extract) ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งไนโตรเจนเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่ 4 : สูตรอาหารจากข้อ 3.4 โมโนโซเดียมกลูตาเมต (Monosodiumglutamate) ความเข้มข้นร้อยละ1 เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งไนโตรเจนเดิม

เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารที่เตรียมไว้ทั้ง 4 สูตร โดยให้มีปริมาตรอาหารรวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรฟลาสก์ (ปริมาตรอาหาร 190 มิลลิลิตรและหัวเชื้อ 40 มิลลิลิตร) ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 7 วัน เก็บน้ำหมักทุก ๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณชีวมวล ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ค่าพีเอช และน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ไป

3.5.2 ศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

เลือกแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด จากข้อ 3.5.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนปริมาณร้อยละ 0.5 1 1.5 และ 2 ได้สูตรอาหาร 4สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 : สูตรอาหารที่เลือกจากข้อ3.4 ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.5

สูตรที่ 2 : สูตรอาหารที่เลือกจากข้อ 3.4 ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ1

สูตรที่ 3 : สูตรอาหารที่เลือกจากข้อ 3.4 ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 1.5

สูตรที่ 4 : สูตรอาหารที่เลือกจากข้อ 3.4 ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 2

ปรับค่าพีเอชของอาหารให้ได้ 5.0 แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารที่เตรียมไว้ทั้ง 4 สูตร โดยให้มีปริมาตรอาหารรวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรฟลาสก์ (ปริมาตรอาหาร 190 มิลลิลิตรและหัวเชื้อ 40 มิลลิลิตร) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 7 วัน เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณชีวมวล ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ค่าพีเอช และน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ไป

3.6 การวิเคราะห์ผล

1. วัดชีวมวลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
2. วัดชีวมวลโดยวัดน้ำหนักแห้ง โดยนำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง นำใส่โถดูดความชื้นทิ้งให้เย็นวัดน้ำหนักของชีวมวลที่ได้ตามวิธีของ (A.O.A.C., 2000)
3. การวัดกรดโพรพิโอนิก วัดด้วยเครื่อง HPLC (Hight Performannce Liquid Chromatography) นำน้ำหมักไปกรองผ่านเซลลูโลส เมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตรใช้ Inertsil C8-3 column ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราไหล 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส (ตรวจหาจากส่วนใสของตัวอย่างจากการปั่นเหวี่ยงจากข้อ 2)

4. การวัดปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ (Dobois, 1956)

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

แต่ละการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างอิสระโดยสมบูรณ์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติใช้ของ SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science) การเปรียบเทียบใช้การทดสอบของ LSD (Least significant differences) สำหรับการเปรียบเทียบจำนวนมากทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในการพิจารณาว่ามีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

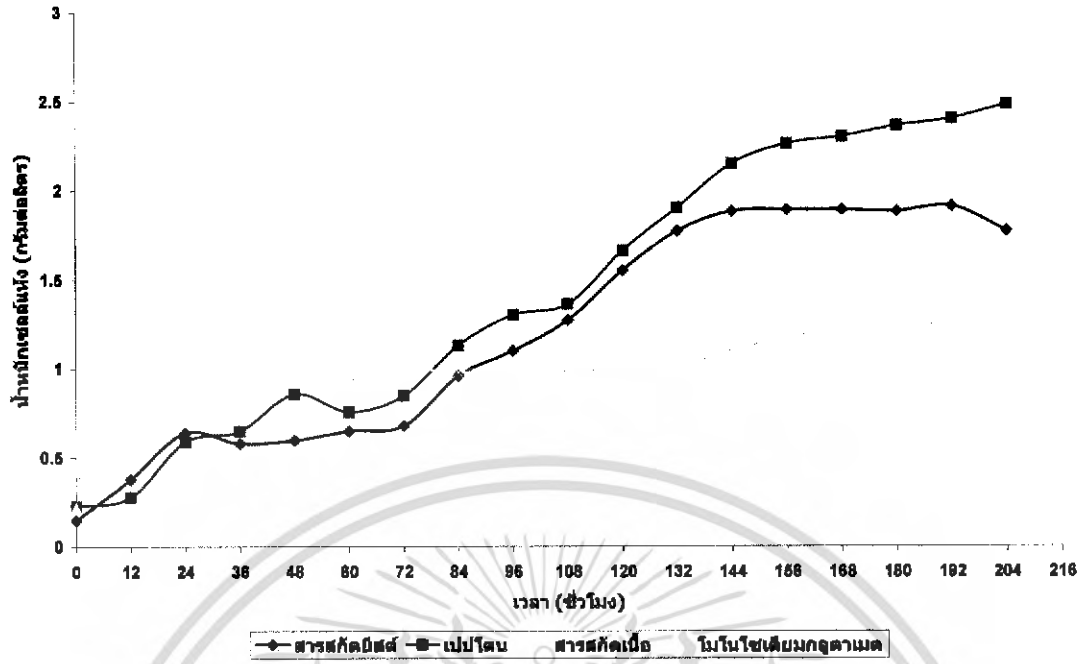
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

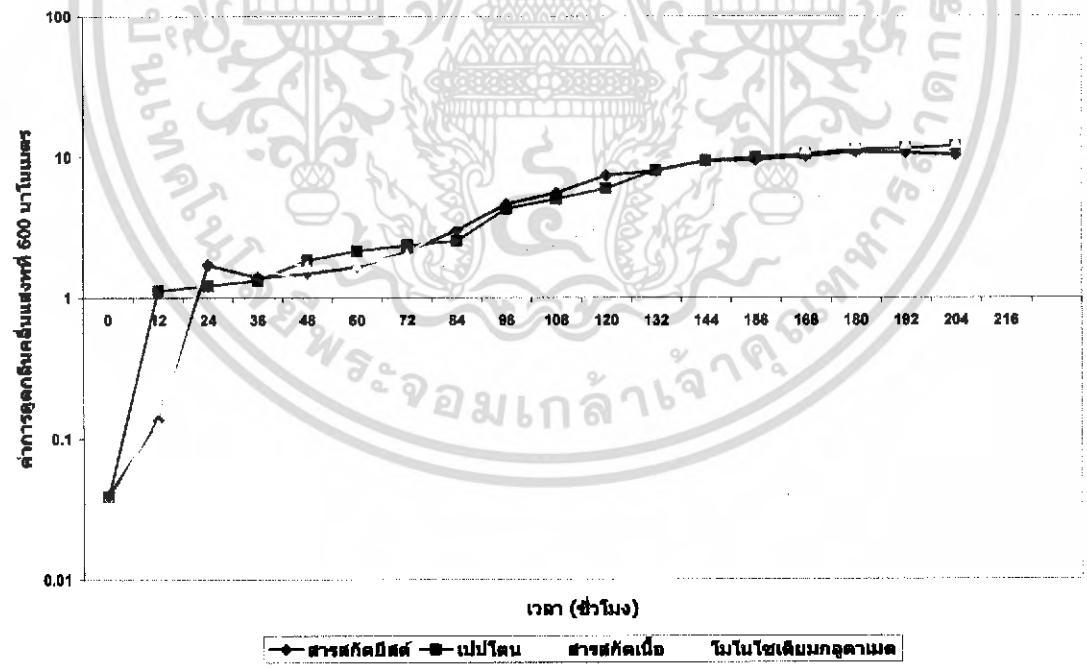
4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหาร เลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ เปปโตน (Peptone) สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) สารสกัดเนื้อ (Beef extract) และโมโนโซเดียมกลูตาเมต (Monosodiumglutamate) เพื่อทำการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเชื้อในแต่ละช่วงเวลาพบว่า การเจริญของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีสารสกัดเนื้อ เป็นแหล่งไนโตรเจนมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันกับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีสารสกัดเนื้อจะระยะการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 144 วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 11.248 และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.2500 กรัมต่อลิตร และเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนจะมีระยะการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 156 วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 9.975 และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.2260 กรัมต่อลิตรนอกจากนั้น พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดยีสต์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมตจะมีระยะการเจริญเติบโตสูงสุด ที่ชั่วโมงที่ 132 และ156 ตามลำดับ โดยเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดยีสต์วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 8.021 และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.1770 กรัมต่อลิตร และเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 4.779 และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.1180 กรัมต่อลิตร แล้วหลังจากนั้นเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ก็จะมีระยะการเจริญเติบโตคงที่ แล้วทำการทดลองต่อจนเสร็จสิ้นการทดลองที่ 291 ชั่วโมง ซึ่งผลของค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง สอดคล้องกันดังแสดงในรูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน



รูปที่ 4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

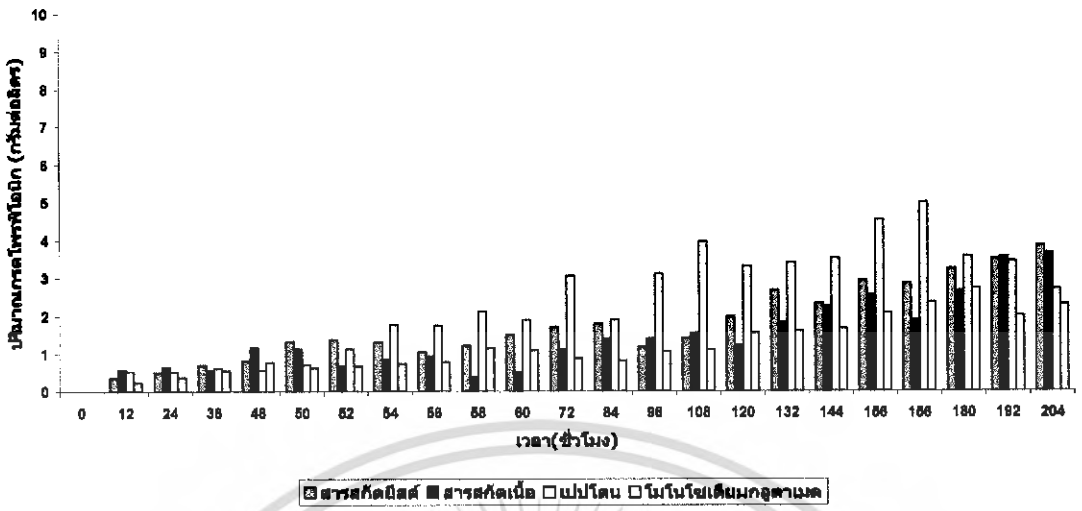
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.1 และ รูปที่ 4.2 เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ชั่วโมงเดียวกันเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเนื้อเป็นแหล่งไนโตรเจนมีการเจริญเติบโตสูงสุดรองลงมาได้แก่ เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตน สารสกัดยีสต์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต ตามลำดับ

4.2 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

จากการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกัน 4 ชนิดได้แก่ เปปโตน สารสกัดยีสต์ สารสกัดเนื้อ และโมโนโซเดียมกลูตาเมตจากรูปที่ 4.3 พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนจะผลิตกรดได้สูงที่สุดโดยมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 192 ซึ่งปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 168 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สูงสุดได้ เท่ากับ 4.99 กรัมต่อลิตร คิดเป็น1.5942 (กรัมต่อกรัมสับสเตรท) รองลงมา คือเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดยีสต์จะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 132 ถึงชั่วโมงที่ 204 ซึ่งปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 204 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สูงสุดได้ เท่ากับ 3.85 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.7210 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ในขณะที่เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเนื้อจะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 156 ถึงชั่วโมงที่ 204 ซึ่งปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 204 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สูงสุดได้ เท่ากับ 3.66 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.4453 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโมโนโซเดียม กลูตาเมตจะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 156 ถึงชั่วโมงที่ 204 ซึ่งปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 180 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สูงสุดได้ เท่ากับ 2.72 กรัมต่อลิตรคิดเป็น 0.5161 กรัมต่อกรัมสับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าปริมาณกรดที่ผลิตได้โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตน และสารสกัดยีสต์ให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่จากการทดลองนี้ เมื่อดูผลได้ของผลผลิตต่อสับสเตรท และอัตราการผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากเชื้อ *P. acidipropionici* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนจะมีค่าสูงกว่าที่ผลิตได้จากเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดยีสต์ โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนจะให้ค่าผลผลิต (Product) เท่ากับ 4.99 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ (Yield) เท่ากับ 1.5942 กรัมต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิต (Productivity) เท่ากับ 0.2419 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีช่วงเวลาของการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดมากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 4.1 ดังนั้นจึงทำการเลือกเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อนำมาทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกในการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Substrate	Fermentation time	pH	Product (g/l)	Yeild (g/g)	Productivity (g/l/h)
Beef extract[b]	204	4.25	3.66	0.4453	0.1261
Monosodiumglutamate[b]	180	4.51	2.72	0.5161	0.1038
Peptone[a]	168	4.31	4.99	1.5942	0.2419
Yeast extract[ab]	204	4.36	3.85	0.7210	0.1450

Chih-Sheng Ko และ I.-Ming Chu (2004) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิต *S*-acetylthio-2-methyl propionic acid (*S*-AMPA) เป็นอนุพันธ์ของกรดโพรพิโอนิก ซึ่งได้จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส S,R–methyl–β-acetylthioisobutyrate (MAMP) ด้วยเอนไซม์ไลเปส โดยกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงจะทำให้ได้ *S*-AMPA เป็นผลิตภัณฑ์สูง จากการศึกษาโดยมีการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ เปปโตน สารสกัดยีสต์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน วัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ เท่ากับ 157.4 ยูนิต ส่วนสารสกัดยีสต์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมตวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ เท่ากับ 170.8 ยูนิต และ 167.4 ยูนิต

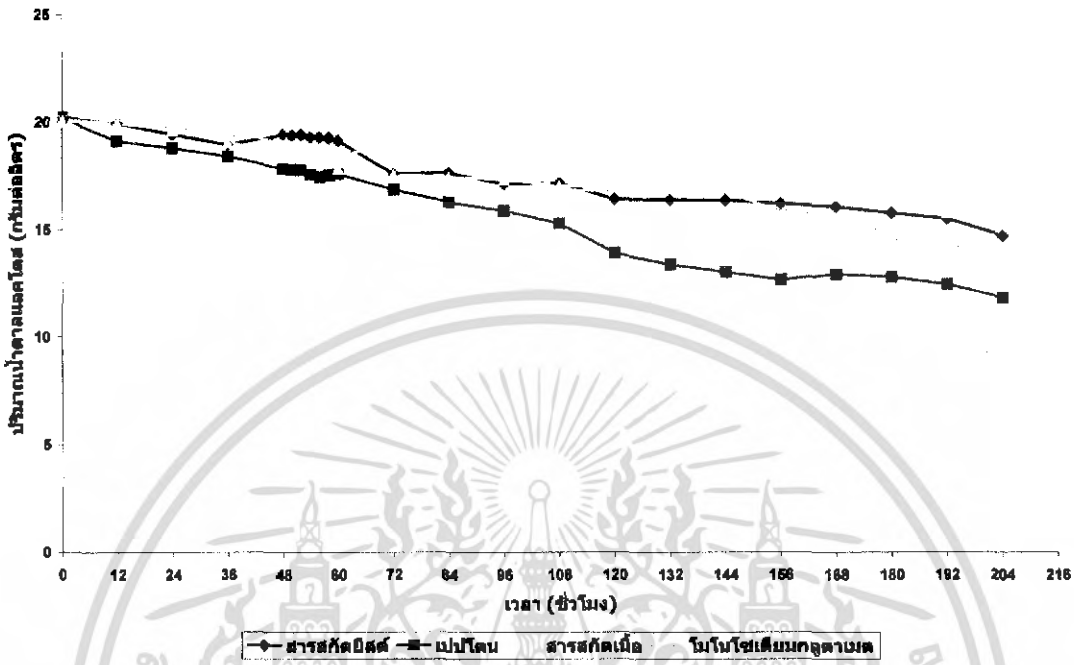
Colomban, A.,L. Roger และ P. Boyaval. (1993) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้สารสกัดยีสต์จากบริษัทผู้ผลิตที่แตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน จากการศึกษาพบว่า ถ้าใช้สารสกัดยีสต์ LS65 ผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 9.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สารสกัดยีสต์ SD20 และสารสกัดยีสต์ Lacval 98F ผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 6.5 และ6.0 กรัมต่อลิตร

4.3 การศึกษาปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ไปในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

จากการศึกษาปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่นำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสเริ่มต้น เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองที่ได้พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 204 เชื้อ *P. acidipropionici* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนจะมีการใช้น้ำตาลแลคโตสได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยปริมาณน้ำตาลแลคโตสลดลงเหลือ เท่ากับ 11.78 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เชื้อ *P. acidipropionici* ที่เจริญในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต สารสกัดยีสต์ และสารสกัดเนื้อ จะมีปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือ 14.00 14.66 และ 15.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

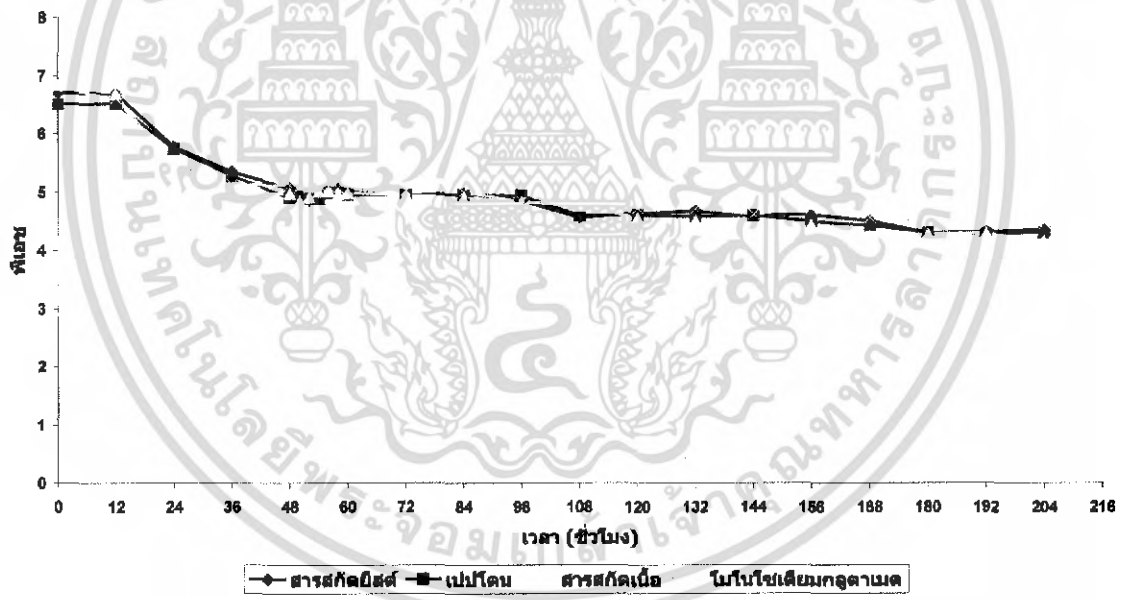
จากการศึกษาที่ได้พบว่า เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน มีการใช้สับสเตรทอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้นจึงทำการเลือกเปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก เพื่อนำมาทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ในการทดลองขั้นต่อไป

4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันในการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 พบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโต เชื้อจะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกออกมาโดยสังเกตจากค่าพีเอชของอาหารจะมีค่าลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้น และเมื่อเชื้อมีระยะการเจริญเติบโตคงที่ พบว่าเชื้อจะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกปริมาณเพิ่มมากขึ้นค่าพีเอชจะลดต่ำลงเรื่อยๆ ดังที่แสดงในรูปที่ 4.5 โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเนื้อมีค่าพีเอชเริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

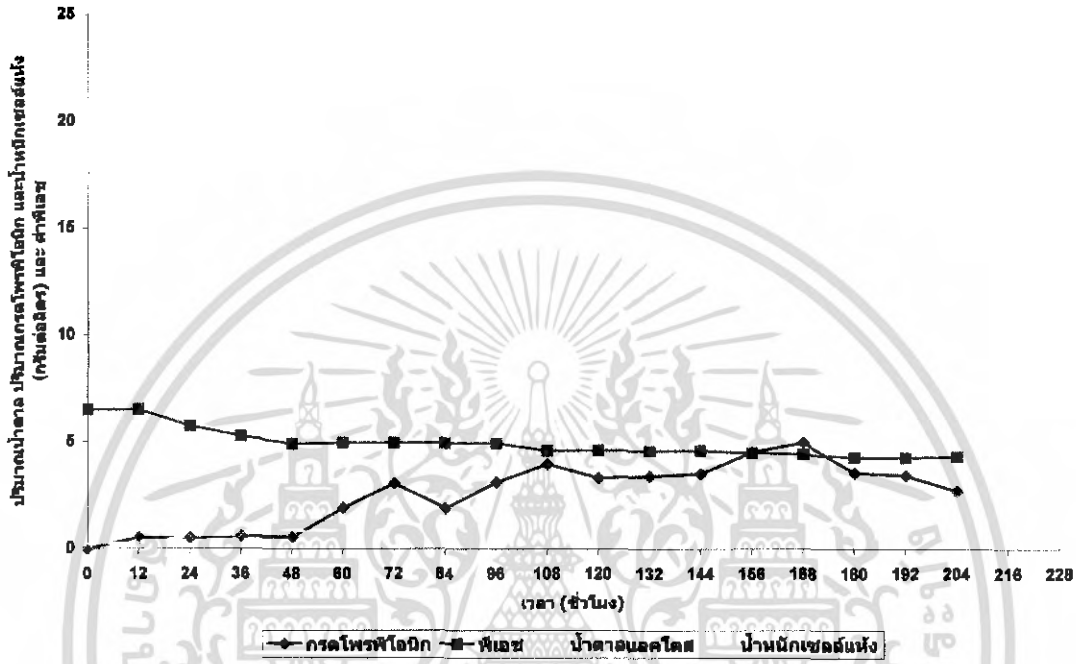
เท่ากับ 6.84 ค่าพีเอชจะลดลงค่อนข้างคงที่อย่างต่อเนื่อง เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมงที่ 204 จะมีค่าพีเอชลดลง เท่ากับ 4.16 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนมีค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 6.51 ค่าพีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และลดลงคงที่ในชั่วโมงที่ 48 ถึง 108 ของระยะเวลาการหมักจากนั้นค่าพีเอชจะลดลงอย่างคงที่อีกครั้ง เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมงที่ 204 จะมีค่าพีเอชลดลง เท่ากับ 4.31 ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดยีสต์มีค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 6.71 พีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 108 และค่าลดลงอย่างคงจนสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมงที่ 204 จะมีค่าพีเอชลดลง เท่ากับ 4.36 และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมตมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.98 ค่าพีเอชจะลดลงอย่างช้าๆ และคงที่ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมงที่ 204 จะมีค่าพีเอชลดลง เท่ากับ 4.47 ซึ่งค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงนั้นแสดงดังรูปที่ 4.5 จากค่าพีเอชของอาหารนั้นไม่สามารถบอกปริมาณกรดโพรพิโอนิกได้ เนื่องจากการหมักของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ให้ผลผลิตที่เป็นกรดผสมค่าพีเอชจึงแสดงได้เพียงแนวโน้มการผลิตกรด เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 เท่านั้น



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโพพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ลดลง และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการศึกษาในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งผลิตกรดโพรพินิกได้ปริมาณสูงสุดนั้น ค่าต่างๆจะมีความสัมพันธ์กันดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ปริมาณกรดต่างๆ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช เมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน

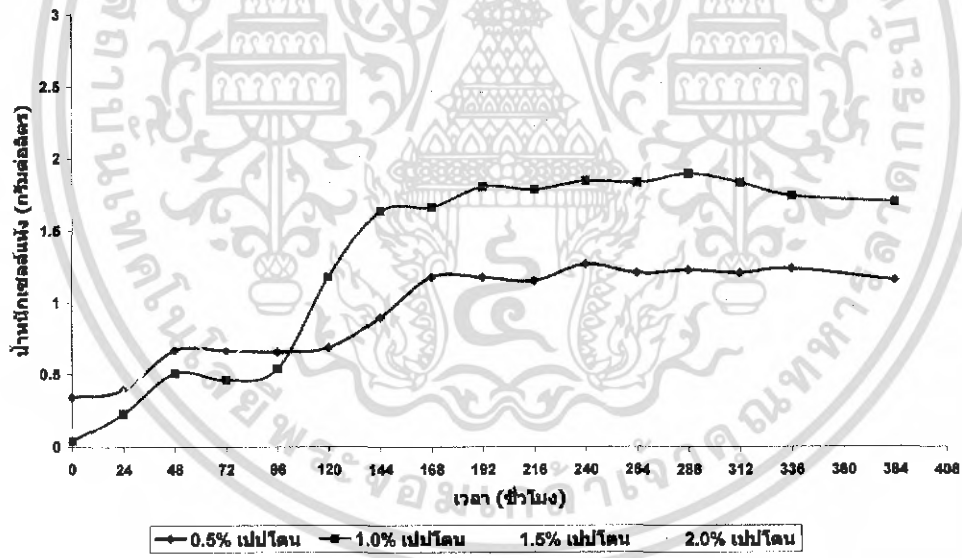
จากรูปที่ 4.6 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อจะมีระยะการเจริญเติบโตสูงสุดชั่วโมงที่ 156 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.2260 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่ชั่วโมง 168 เท่ากับ 4.99 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลงเท่ากับ 4.31 และมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่คงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 11.78 กรัมต่อลิตร

4.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มี เปปโตน ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ2.0 เพื่อทำการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเชื้อในแต่ละช่วงเวลา โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici*

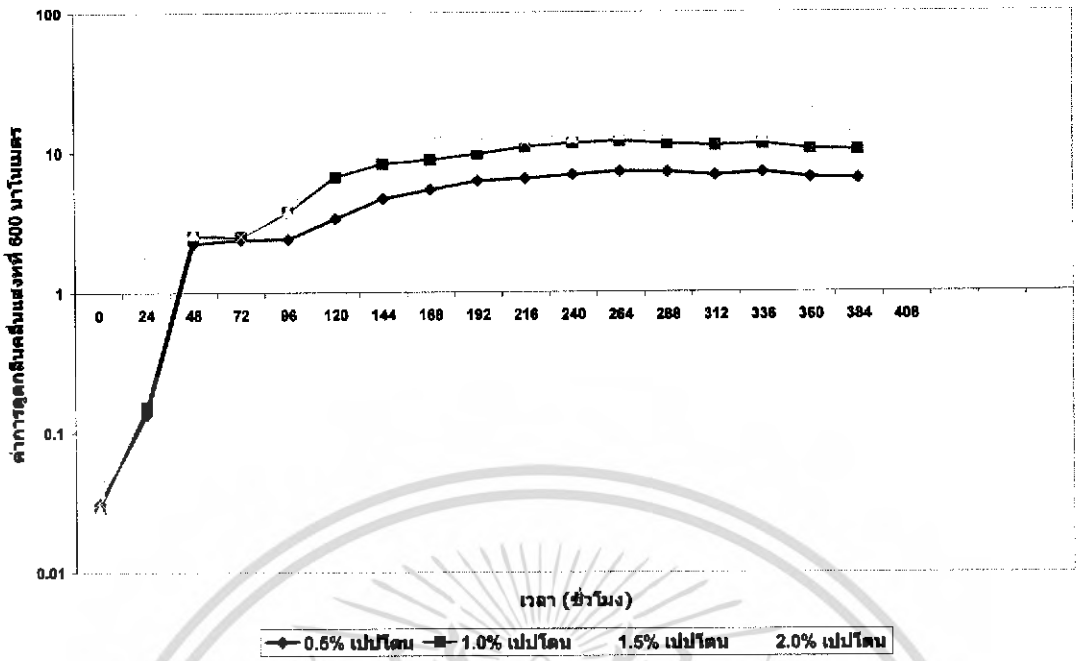
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ2.0 พบว่าจะมีระยะการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 168 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 2.0 มีการเจริญเติบโตของเชื้อใกล้เคียงกับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ1.5 โดยเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 2.0 วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 12.628 และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.2450 กรัมต่อลิตร และเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 1.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 11.942 และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.2240 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ0.5 จะมีการเจริญเติบโตลดลง เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 8.808 และ 5.390 ตามลำดับ และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.1670 และ 0.1180 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ก็มีระยะการเจริญเติบโตคงที่ แล้วทำการทดลองต่อจนเสร็จสิ้นการทดลองที่ 504 ชั่วโมง ซึ่งผลของค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง สอดคล้องกันดังแสดงในรูปที่ 4.7 และรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งในการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน

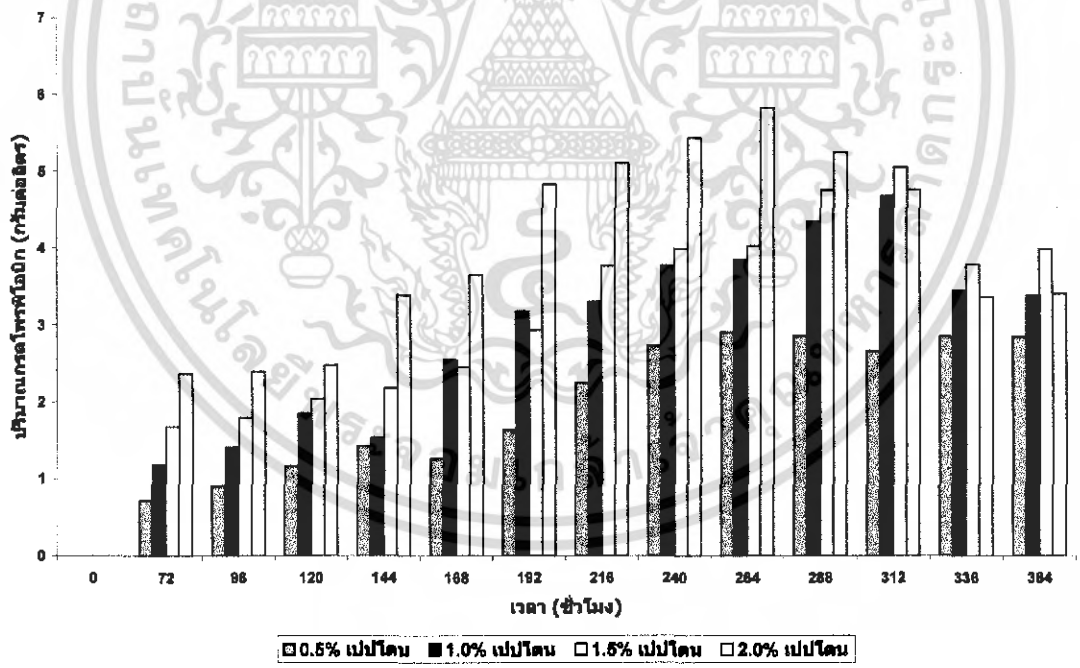
จากรูปที่ 4.7 และรูปที่ 4.8 เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ชั่วโมงเดียวกัน เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 2.0 เป็นแหล่งไนโตรเจนมีการเจริญเติบโตสูงสุด รองลงมา ได้แก่ เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 1.5 1.0 และ0.5 ตามลำดับ

4.6 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มี เปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 เมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ2.0 เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากรูปที่ 4.9 พบว่าที่ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0.5 จะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงที่ช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 240 ถึงชั่วโมงที่ 384 ซึ่งปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จะสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 264 เท่ากับ 2.92 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.40276 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ที่ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 1.0 จะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงที่ช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 192 ถึงชั่วโมงที่ 312 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 312 เท่ากับ 4.69 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.4916 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ที่ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 1.5 จะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงที่ช่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาชั่วโมงที่ 192 ถึงชั่วโมงที่ 312 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 312 เท่ากับ 5.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.4229 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และที่ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 2.0 จะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่ช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 192 ถึงชั่วโมงที่ 312 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 264 เท่ากับ 5.84 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.5004 กรัมต่อกรัมสับสเตรท จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 2.0 มีการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงรองลงมาคือที่ความเข้มข้น 1.5 1.0 และ0.5 ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้น 1.0 และ 1.5 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกใกล้เคียงกัน และปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จะลดลงตามความเข้มข้นของเปปโตนที่ลดลงตามลำดับ ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าที่ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 1.0 1.5 และ2.0 ไม่แตกต่างกัน แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 2.0 จะให้ค่าผลผลิต (Product) เท่ากับ 5.84 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ (Yield) เท่ากับ 0.5004 กรัมต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิต (Productivity) เท่ากับ 0.5761 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 4.2 ดังนั้นจึงทำการเลือกเปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่อไป



รูปที่ 4.9 แสดงผลผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

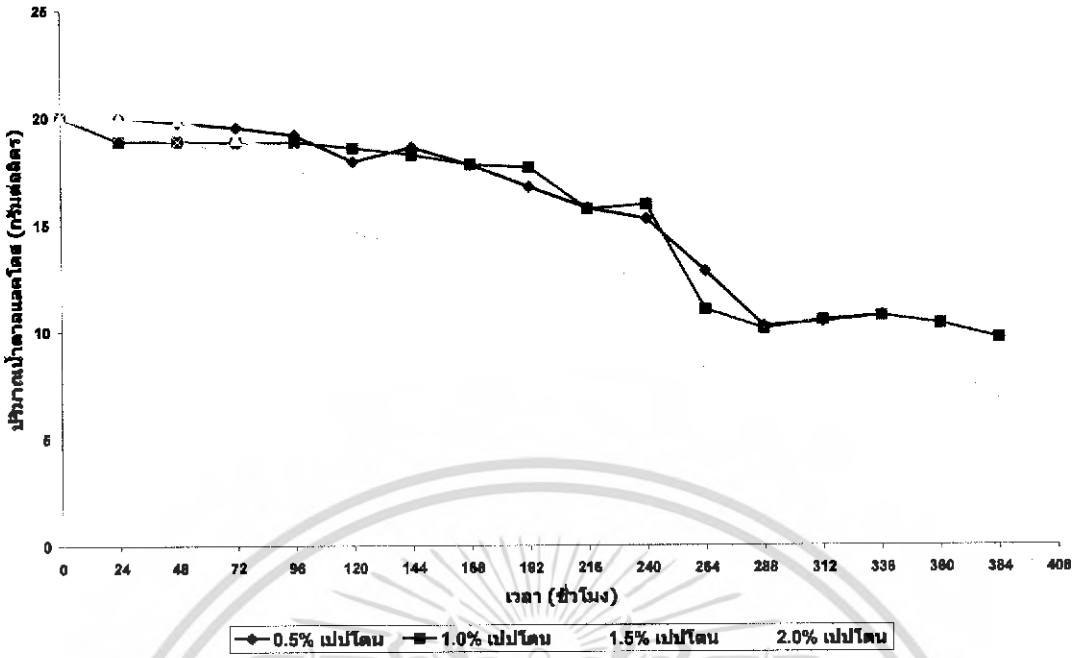
ตารางที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นของเปปโตนต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

Substrate	Fermentation time	pH	Product (g/l)	Yeild (g/g)	Productivity (g/l/h)
0.5 % Peptone[b]	264	3.94	2.92	0.40276	0.2935
1.0 % Peptone[a]	312	4.00	4.69	0.4916	0.3948
1.5 % Peptone[a]	312	4.05	5.07	0.4229	0.3998
2.0 % Peptone[a]	264	4.00	5.84	0.5004	0.5761

4.7 การศึกษาปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่นำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการศึกษาปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่นำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสเริ่มต้น เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าที่ความเข้มข้นเปปโตนร้อยละ 2.0 และ1.5 ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ลดลงจะใกล้เคียงกันโดยชั่วโมงที่ 384 ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เหลืออยู่คือ 6.79 และ8.78 กรัมต่อลิตร ซึ่งลดลงมากกว่าที่ความเข้มข้นเปปโตนร้อยละ 1.0 และ0.5 ในชั่วโมงเดียวกันซึ่งมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสเหลืออยู่ 5.59 กรัมต่อลิตร ทั้งสองความเข้มข้นดังแสดงในรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่นำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน

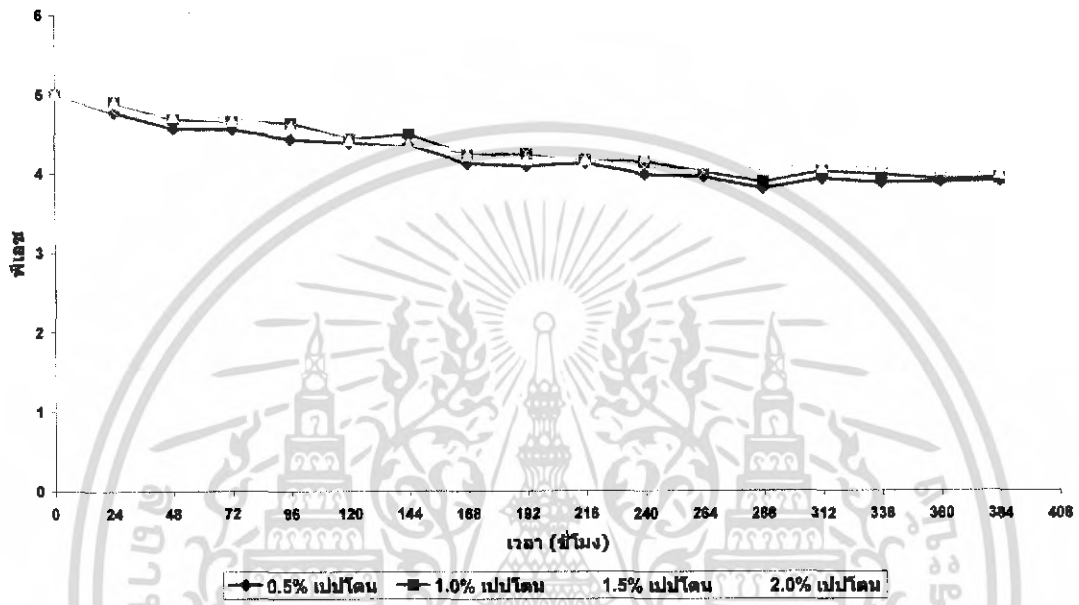
จากการศึกษาที่ได้พบว่าค่าน้ำตาลแลคโตสที่ลดลงสอดคล้องกับการผลิตกรดโพรพิโอนิกที่ได้คือ เปปโตนความเข้มข้น 2.0 มีการผลิตกรดโพรพิโอนิกและการใช้น้ำตาลแลคโตสสูงที่สุด รองลงมาคือ เปปโตนความเข้มข้น 1.5 1.0 และ0.5 ตามลำดับ จะเห็นว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้น 2.0 เป็นแหล่งไนโตรเจน มีการใช้สับสเตรทอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และ ตารางที่ 4.2 ดังนั้นความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 2.0 จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

4.8 การศึกษาพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีมีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกันที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยทำการปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกความเข้มข้นให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 (ปรับโดยกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์) พบว่าเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 ค่าพีเอชจะค่อยๆ ลดลงและค่าพีเอชที่ลดลงนั้นมีค่าใกล้เคียงกันและค่อนข้างคงที่ดังรูปที่ 4.11 โดยที่ชั่วโมงที่มีการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

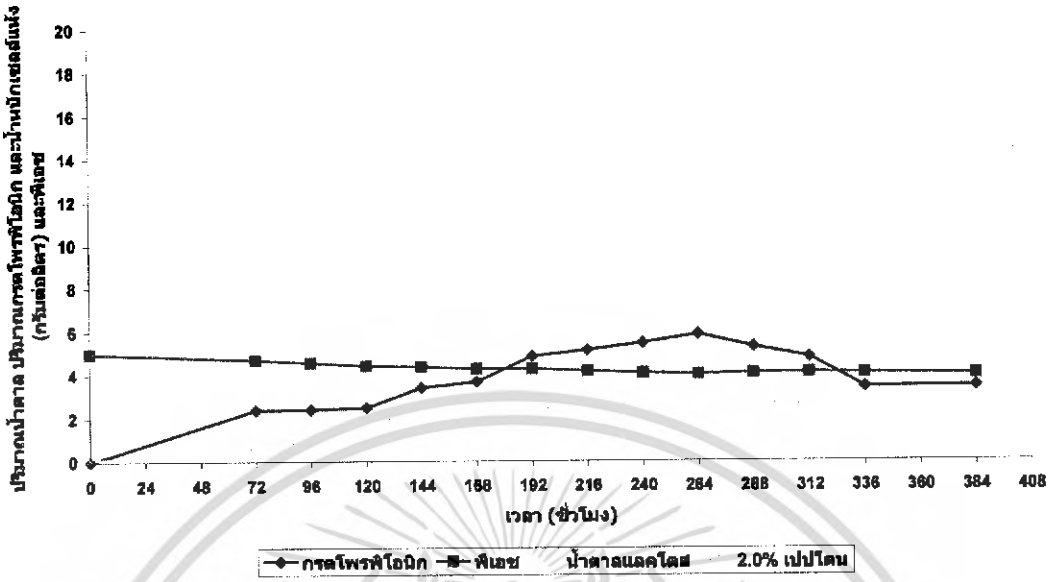
กรดโพรพิโอนิกสูงสุดของแต่ละความเข้มข้นจะมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.94 4.00 4.05 และ4.00 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.2 จากนั้นค่าพีเอชจะค่อยๆ ลดลงค่าพีเอชสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเปปโตนร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 จะมีค่า 3.88 9.91 3.97 และ3.98 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 มีการผลิดกรดโพรพิโอนิกอย่างต่อเนื่อง



รูปที่ 4.11 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

เมื่อนำค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ลดลงและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการศึกษาในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 2.0 เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งผลิตกรดโพรพินิกได้สูงที่สุดนั้น ค่าต่างๆจะมีความสัมพันธ์กันดังรูปที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดต่างๆ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช เมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 2.0 เป็นแหล่งไนโตรเจน

จากรูปที่ 4.12 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 2.0 เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีระยะการเจริญเติบโตสูงสุดชั่วโมงที่ 168 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.2450 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่ชั่วโมง 264 เท่ากับ 5.84 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชลดลง เท่ากับ 3.98 และมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่คงเหลือในอาหรเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.79 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเจริญเติบโต และการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ เปปโตน สารสกัดยีสต์ สารสกัดเนื้อ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต พบว่าเมื่อใช้เปปโตน และสารสกัดยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูง คือ เปปโตนจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 4.99 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ เท่ากับ 1.5942 กรัมต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิต เท่ากับ 0.2419 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีช่วงเวลาของการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 96 ถึง 192 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดยีสต์จะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 3.85 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ เท่ากับ 0.7210 กรัมต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิต เท่ากับ 0.2419 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีช่วงเวลาของการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 132 ถึง 204 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อใช้สารสกัดเนื้อ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต จะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกลดลง คือ สารสกัดเนื้อจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 3.66 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ เท่ากับ 0.4453 กรัมต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิต เท่ากับ 0.1261 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีช่วงเวลาของการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 156 ถึง 204 ชั่วโมง และ โมโนโซเดียมกลูตาเมตจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 2.72 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ เท่ากับ 0.5161 กรัมต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิต เท่ากับ 0.1038 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีช่วงเวลาของการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 156 ถึง 204 ชั่วโมง ดังนั้นจึงทำการเลือกใช้เปปโตนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้เปปโตนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 จากผลการทดลองที่พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของเปปโตน โดยการผลิตกรดโพรพิโอนิกจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเปปโตน ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 2.0 จะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 5.84 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ เท่ากับ 0.5004 กรัมต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิต เท่ากับ 0.5761 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีช่วงเวลาของการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 192 ถึง 312 ชั่วโมง เปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 1.5 จะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 5.07 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ เท่ากับ 0.4229 กรัมต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิต เท่ากับ 0.3998 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีช่วงเวลาของการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 192 ถึง 312 ชั่วโมง เปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 1.0 จะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 4.69 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ เท่ากับ 0.4916 กรัมต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิต เท่ากับ 0.3948 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีช่วงเวลาของการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 192 ถึง 312 ชั่วโมง และเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 จะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 2.92 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ เท่ากับ 0.40276 กรัมต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิต เท่ากับ 0.2935 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีช่วงเวลาของการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 240 ถึง 384 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมมากที่สุดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

เนื่องจากเมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าปริมาณของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีเปปโตน และสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ในการศึกษาครั้งต่อไป ควรทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้ สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อนำผลการทดลองมาทำการเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อทำการวิเคราะห์ว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดใดเหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด เพื่อเป็นแนวทางการศึกษา และพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กุลยา จันทร์อรุณ. **เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่** 2. กรุงเทพฯ : หน่วยศึกษานิเทศก์. 2533.

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

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

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

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.

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

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.

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

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

Quesada-Chanto, A., A. S. Afschar, and F. Wagner; 1994a. Microbial production of propionic acid and vitamin B-12 using molasses or sugar . **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 41: 378–383.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Babirato, F., Chedaille, Bories, A. 1997. Propionic acid fermentation from glycerol comparion with conventionnal . **Appl. Microbiol**. 47 : 441-446.

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

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

Gebgardt , A.G., Kucheras, R.V., Laska, D.V., Vogrin, A.G. 1970. The relation between nitrogen metabolism and the cobamide-synthetic capacity of Propionibacterium shermanii. **Mikrobiologiia.** 3: 447-52.

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.

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

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

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

Cavin, J.F., Saint, C. et Divis, C. 1985. Continuous production of emmental cheese Bavors and propionic acid starters by immobilized ceUs of propionic acid bacterium. **Biotechnol.** 7: 821-826.

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

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.

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis, 17 th ed. Association of official Analytical chemists. Washington, Dc.

Dobois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars andRelated Substances. **Anal. Chem.** 28: 350-356.

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

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

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

www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/anderson/gifs/e282.gif

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

www.sci-toys.com/ingredients/sodium_propionate.gif

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมงกานีสซัลเฟต	($MnSO_4 . 4 H_2O$)	0.05	กรัม
วุ้น (agar)		15	กรัม

วิธีการ

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

2. สารเคมี

2.1 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)

วิธีการ

1. ตวงสารละลาย A มา 200 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 500 มิลลิลิตร คนให้ผสมเข้ากันแล้วนำไปวัดค่าพีเอช จากนั้นปรับค่าพีเอชให้ได้ 3.0 $\pm$ 0.1 โดยใช้สารละลาย B

2. นำมาเทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้เหลือบริเวณก่อนถึงขีดบอกปริมาตร ทำการวัดค่าพีเอชอีกครั้ง ถ้าค่าพีเอชไม่ได้ค่าเท่ากับ 3.0 ให้ปรับค่าพีเอชอีกครั้งด้วยสารละลาย B แล้วทำการเติมน้ำจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 3 ที่เตรียมได้มาทำการกรอง แล้วเก็บใส่ขวดสีชา

4. ก่อนนำไปใช้งานควรทำการไล่อากาศ (Sonicated) 10 นาที ก่อนนำไปใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กรดโพรพิโอนิกมาตรฐาน

ทำการเตรียมกรดโพรพิโอนิกมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ จากกรดโพรพิโอนิก 0.5 มิลลิโมลาร์ (เตรียมได้จากกรดโพรพิโอนิกเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ดังต่อไปนี้

กรดโพรพิโอนิก 0.5 มิลลิโมลาร์	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	กรดโพรพิโอนิกมาตรฐาน (มิลลิโมลาร์)
1	9	0.05
2	8	0.1
4	6	0.2
6	4	0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลแลกโตส วิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dobois,1956)

อุปกรณ์

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

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)
2. ฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักเตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายแลคโตสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งแลคโตสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแลคโตสเข้มข้น 400 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. ปีเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายแลคโตสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1 มิลลิลิตร

2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆปล่อยลงที่ข้างหลอด

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

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของแลคโตสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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

2. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วยเครื่อง 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 มีฟองอากาสอยู่รึเปล่า ถ้ายังมีอยู่ให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
5. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจน Pump หยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน
6. ปิด Drain valve ที่ Pump
7. ตั้ง Flower rate , Pmax และ Pmin ที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับ Pump (P max ดูจาก Pressure maximum ของ Column)
8. ตั้งอุณหภูมิที่ต้องการไว้ที่ CTO (ถ้ามี)
9. ตั้ง Parmeter ให้กับ Detector
10. สั่งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ขั้นตอนการเปลี่ยน MOBILE PHASE

1. ปิด Pump HPLC
2. เท Mobile Phase ใหม่ลงใน บีกเกอร์
3. เปิด Drain ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ยก Sinker ออกจาก Mobile phase แล้วจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มี Mobile phase ใหม่อยู่
5. รอจน Pump ดูดMobile phase ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20 – 30 ml
6. ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของ Sinker ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาดแล้วนำ Sinker จุ่มลงในขวดของ Mobile phase ใหม่
7. ในระหว่างขั้นตอนที่ 1- 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
10. ปิด Drain valve ที่ Pump แล้วสั่งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์

หมายเหตุ : 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 ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง

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. ทำการ Inject Sample

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.1 Rhecdyne Manual Injector

ล้าง syringe ให้สะอาดด้วย solvent 5 ครั้ง

↓

ล้าง syringe ด้วย sample ที่ inject 3 ครั้ง

↓

ดูด sample โดยไม่ให้มีฟองอากาศใน syringe แล้ว

Set ปริมาตร ให้ได้ตามที่จะฉีดเข้าระบบ 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**)

↓

รอประมาณ 5-10 วินาที แล้วดึง syringe ออกจาก injector

↓

ล้าง needle port ด้วยน้ำกลั่น 5-10 ml แล้วตามด้วยอากาศ 10-20 ml โดยใช้ syringe พลาสติก

ขนาด 5 – 25 ml ที่ต่อด้วย needle port cleaner

↓

ล้างด้วย syringe ที่ใช้ฉีด sample ด้วย solvent 20 – 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

หมายเหตุ : กรณีที่จะหยุดใช้ เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

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

หมายเหตุ

1. การเปลี่ยน mobile phase ที่ใช้งานมาเป็น mobile phase ที่ใช้เก็บ colume ต้องระวังการ ผสมกันระหว่าง mobile phase ทั้ง 2 ว่า สามารถผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันได้ดีต้องมี mobile phase ขั้นกลางอย่างละ 30 นาที
2. การล้างใช้ flow rate 1 ml/min หรือน้อยกว่า ขึ้นกับชนิดของ colume

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

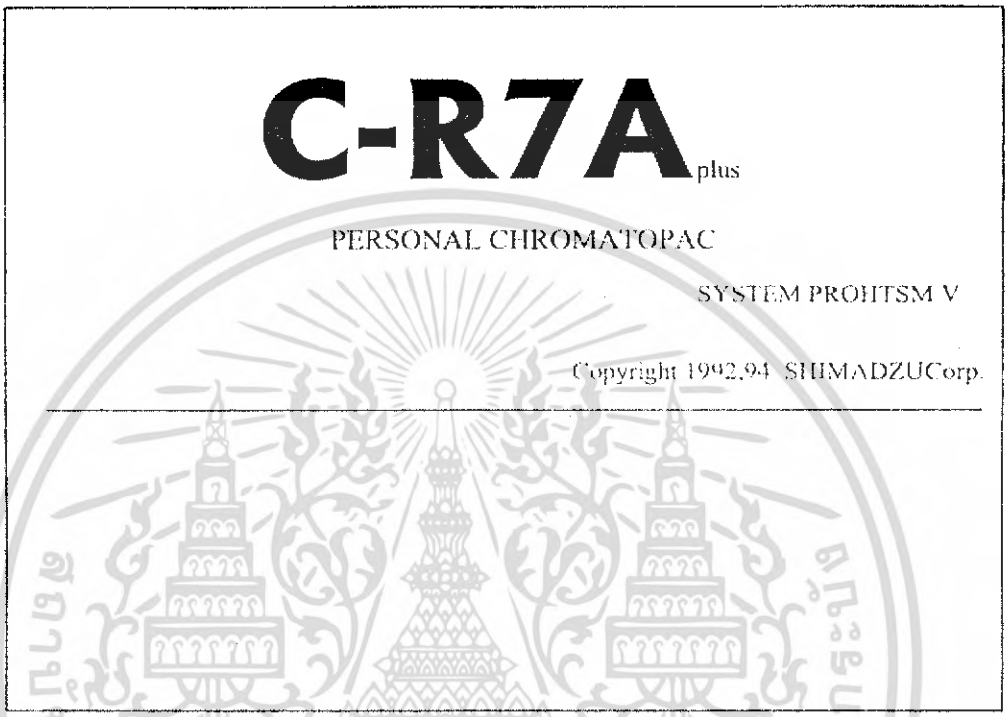
2.6 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)

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 ชั่วโมง
5. off pump แล้วปิดเครื่องทุก unit
6. ยก sinker ออกจากขวด mobile phase แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ในกรรีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File กับทุกๆครั้งของการฉีด

วิธีสร้าง Analysis File ใหม่

- เลือก **E** จะปรากฏหน้าจอของ Analysis File
- แก้ไข Parameter ดังต่อไปนี้ WIDTH 5

  DRIFT(uV/min) 0

  และ T.DBL(min) 1000
- กด **EXIT** เพื่อออกจากหน้าจอ จะปรากฏคำถาม | Save FILE? Y : yes N: no | กด **Y**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

เลือก R เมื่อต้องการยกเลิกการตั้งชื่อข้างต้น

C ยกเลิกการ Save ของChromatogram สุดท้าย

A เมื่อต้องการให้เครื่อง save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

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

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

6. Menu ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis file

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณ และให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START

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

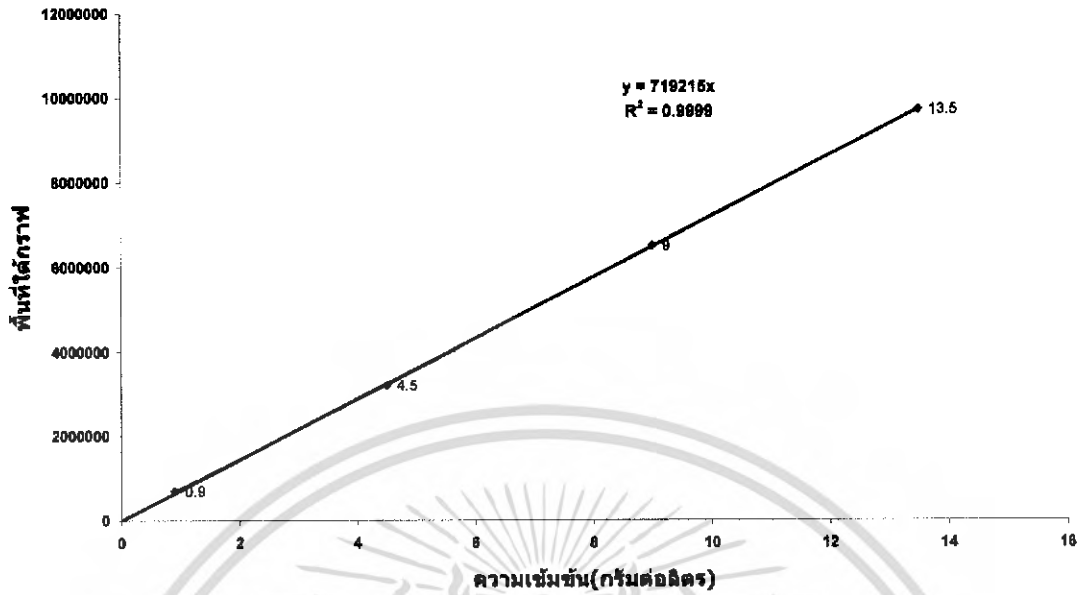
รูปที่ 1 แสดงค่า Retention time ของกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

retention time ของกรดแลคติก เท่ากับ 5.987 นาที

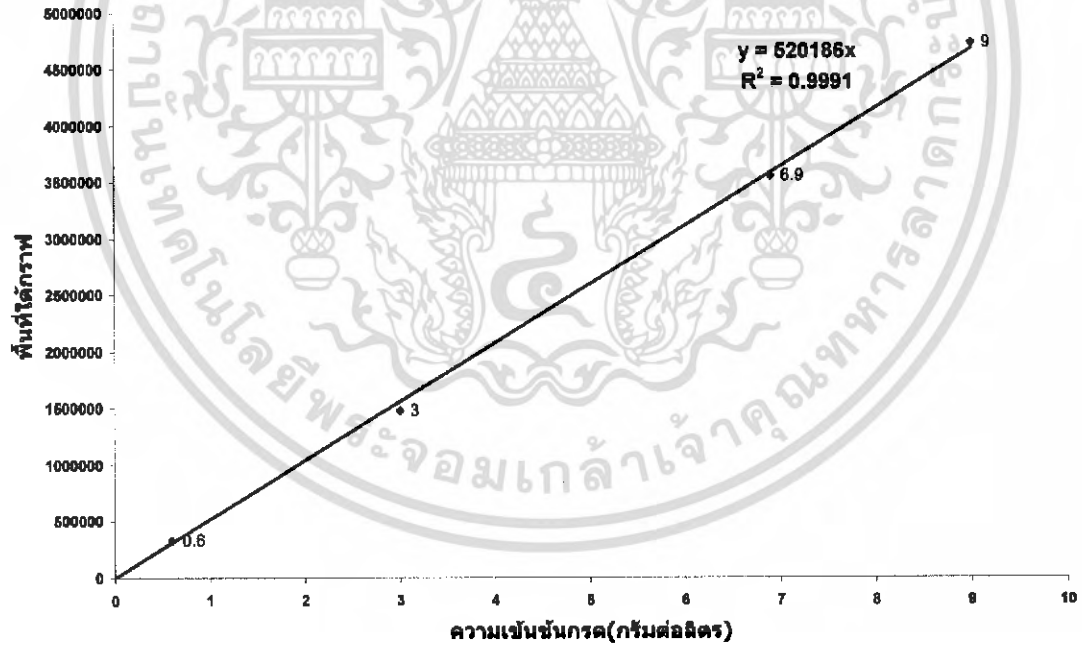
retention time ของกรดอะซิติก เท่ากับ 6.788 นาที

retention time ของกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 17.384 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

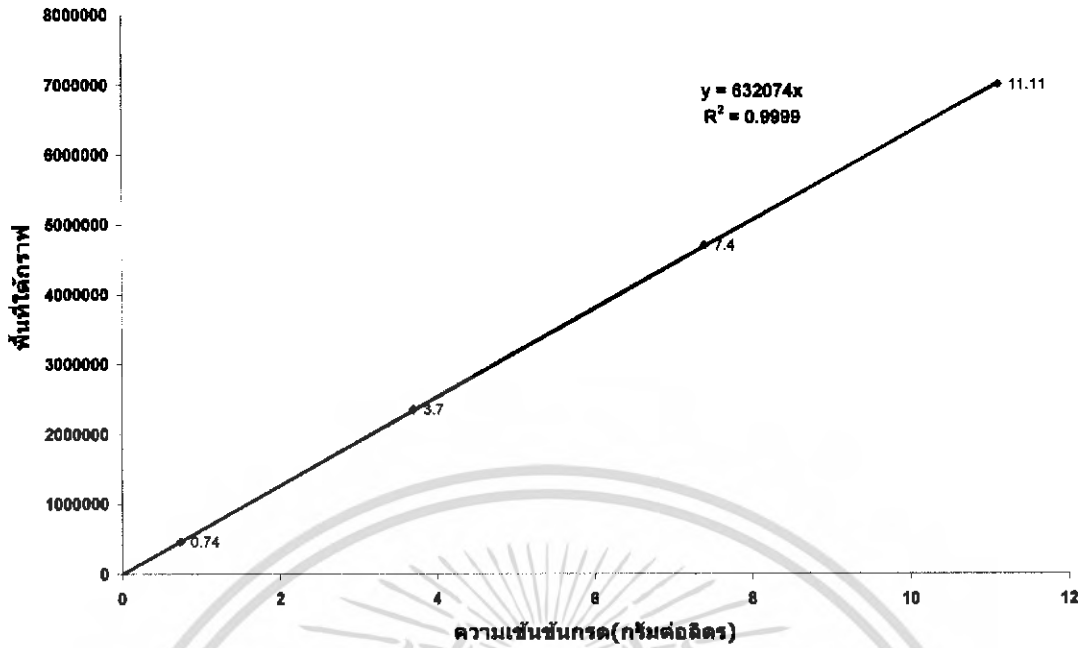


รูปที่ 2 แสดงกราฟมาตรฐานของกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965



รูปที่ 7 แสดงกราฟมาตรฐานของกรดอะซิติกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	สารสกัดยีสต์	เปปโตน	สารสกัดเนื้อ	โมโนโซเดียมกลูตาเมต
0	0.150	0.230	0.220	0.360
12	0.380	0.280	1.100	0.860
24	0.640	0.590	1.380	1.000
36	0.580	0.650	1.320	0.980
48	0.598	0.86	1.280	0.940
60	0.650	0.760	1.282	0.940
72	0.680	0.850	1.320	1.000
84	0.960	1.130	1.500	0.980
96	1.100	1.300	1.710	1.000
108	1.270	1.360	2.020	0.980
120	1.550	1.660	2.280	1.000
132	1.770	1.900	2.360	1.020
144	1.880	2.150	2.500	1.100
156	1.888	2.260	2.540	1.180
168	1.888	2.300	2.460	1.200
180	1.880	2.360	2.580	1.220
192	1.908	2.400	2.580	1.260
204	1.770	2.480	2.600	1.280

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	เปปโตนร้อยละ 0.5	เปปโตนร้อยละ 1.0	เปปโตนร้อยละ 1.5	เปปโตนร้อยละ 2.0
0	0.340	0.040	0.100	0.100
24	0.3960	0.230	0.380	0.340
48	0.670	0.510	0.770	0.750
72	0.666	0.462	0.720	0.620
96	0.658	0.540	0.900	0.990
120	0.690	1.180	1.600	1.840
144	0.900	1.640	1.840	2.090
168	1.180	1.670	2.240	2.450
192	1.180	1.810	2.290	2.480
216	1.1540	1.792	2.140	2.250
240	1.270	1.850	2.300	2.440
264	1.210	1.840	2.340	2.460
288	1.230	1.900	2.360	2.610
312	1.210	1.840	2.170	2.590
336	1.240	1.750	2.330	2.650
384	1.160	1.708	2.150	2.530

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	สารสกัดยีสต์	สารสกัดเนื้อ	เปปโตน	โมโนโซเดียมกลูตาเมต
0	0.040	0.039	0.031	0.035
12	0.137	1.122	0.128	0.152
24	1.710	1.220	2.105	1.945
36	1.392	1.338	1.930	1.590
48	1.485	1.845	1.686	1.352
60	1.659	2.142	1.716	1.251
72	2.109	2.352	2.032	1.647
84	3.020	2.524	3.534	1.668
96	4.641	4.305	6.975	2.052
108	5.580	5.040	7.910	2.325
120	7.440	6.012	10.066	3.321
132	8.021	8.138	10.672	4.203
144	9.464	9.506	11.936	4.527
156	9.555	9.9975	12.112	4.779
168	10.185	10.575	11.520	5.184
180	10.912	11.328	12.580	5.364
192	10.761	11.611	12.544	6.075
204	10.404	12.036	12.720	5.499

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ของเชื้อ *P.acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	เปปโตนร้อยละ 0.5	เปปโตนร้อยละ 1.0	เปปโตนร้อยละ 1.5	เปปโตนร้อยละ 2.0
0	0.031	0.029	0.028	0.032
24	0.135	0.151	1.266	1.971
48	2.250	2.532	2.648	2.760
72	2.385	2.515	3.090	2.534
96	2.410	3.744	3.768	3.913
120	3.370	6.672	8.001	8.371
144	4.648	8.240	10.219	10.740
168	5.390	8.808	11.942	12.628
192	6.228	9.645	11.356	13.090
216	6.444	10.829	12.654	11.780
240	6.852	11.495	12.580	13.800
264	7.236	11.913	13.271	14.122
288	7.152	11.362	13.317	13.800
312	6.792	11.058	13.478	13.900
336	7.116	11.343	12.811	12.875
360	6.540	10.413	12.489	13.575
384	6.396	10.184	13.064	13.575

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)			
	สารสกัดยีสต์	สารสกัดเนื้อ	เปปโตน	โมโนโซเดียมกลูตาเมต
0	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.64	0.00	1.71	0.87
24	1.10	0.68	2.95	1.98
36	0.00	0.69	2.23	1.80
48	0.51	0.67	3.74	2.26
50	0.52	0.71	4.54	1.04
52	2.51	2.84	5.35	1.29
54	2.72	3.29	5.37	1.32
56	3.03	3.23	6.05	1.46
58	2.80	3.66	5.72	0.93
60	0.81	3.34	4.94	1.38
72	1.79	3.03	4.56	1.28
84	2.18	1.84	4.53	0.97
96	2.18	1.8	4.35	1.33
108	2.10	2.19	4.11	1.14
120	2.01	2.67	3.96	1.86
132	2.49	3.04	3.53	2.05
144	2.75	3.36	1.65	2.36
156	2.54	3.60	1.36	3.24
168	2.15	3.70	1.07	3.17
180	2.10	3.63	1.08	3.00
192	1.66	2.85	0.96	2.54
204	1.59	0.56	0.83	1.62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)			
	เปปโตนร้อยละ 0.5	เปปโตนร้อยละ1.0	เปปโตนร้อยละ1.5	เปปโตนร้อยละ 2.0
0	0.00	0.00	0.00	0.00
72	0.72	1.18	1.68	2.37
96	0.91	1.41	1.80	2.40
120	1.17	1.86	2.04	2.48
144	1.43	1.54	2.18	3.40
168	1.27	2.56	2.46	3.66
192	1.64	3.19	2.94	4.84
216	2.26	3.31	3.78	5.12
240	2.74	3.78	4.00	5.45
264	2.92	3.86	4.04	5.84
288	2.87	4.36	4.77	5.26
312	2.67	4.69	5.07	4.78
336	2.86	3.46	3.80	3.38
384	2.86	3.40	4.00	3.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	สารสกัดยีสต์	สารสกัดเนื้อ	เปปโตน	โมโนโซเดียมกลูตาเมต
0	6.71	6.51	6.84	6.80
12	6.70	6.53	6.70	6.62
24	5.78	5.75	5.36	5.50
36	5.35	5.28	4.96	5.13
48	5.07	4.91	4.99	5.13
50	4.90	4.93	4.85	5.10
52	4.87	4.89	4.92	5.09
54	4.93	4.89	5.02	5.14
56	5.03	4.99	5.03	5.11
58	5.06	5.00	4.98	5.08
60	5.01	4.96	5.00	5.06
72	4.95	4.96	4.95	5.04
84	4.99	4.96	4.90	5.01
96	4.86	4.95	4.84	4.85
108	4.57	4.60	4.77	4.80
120	4.64	4.61	4.56	4.73
132	4.68	4.58	4.51	4.72
144	4.60	4.60	4.34	4.62
156	4.62	4.50	4.44	4.72
168	4.51	4.43	4.25	4.57
180	4.30	4.30	4.28	4.51
192	4.32	4.28	4.29	4.48
204	4.36	4.31	4.16	4.47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	เปปโตนร้อยละ 0.5	เปปโตนร้อยละ 1.0	เปปโตนร้อยละ 1.5	เปปโตนร้อยละ 2.0
0	5.00	5.00	5.00	5.00
24	4.77	4.90	4.90	4.78
48	4.56	4.68	4.72	4.72
72	4.55	4.65	4.66	4.70
96	4.42	4.63	4.59	4.56
120	4.37	4.42	4.41	4.42
144	4.35	4.48	4.35	4.36
168	4.11	4.22	4.21	4.27
192	4.08	4.23	4.16	4.25
216	4.11	4.15	4.16	4.15
240	3.97	4.13	4.19	4.06
264	3.94	4.00	4.11	4.00
288	3.79	3.87	4.07	4.05
312	3.91	4.00	4.05	4.08
336	3.86	3.96	4.06	4.04
360	3.87	3.90	4.01	3.97
384	3.88	3.91	3.97	3.98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลแลคโตสเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	สารสกัดยีสต์	สารสกัดเนื้อ	เปปโตน	โมโนโซเดียมกลูตาเมต
0	20.22	20.20	20.04	20.13
12	19.96	19.14	19.97	19.99
24	19.44	18.80	19.64	19.74
36	18.95	18.41	19.05	19.42
48	19.41	17.83	18.65	19.14
50	19.40	17.79	18.39	19.07
52	19.41	17.76	18.34	18.94
54	19.31	17.57	18.31	18.73
56	19.30	17.44	18.28	18.80
58	19.28	17.51	18.22	18.91
60	19.14	17.57	17.82	18.60
72	17.57	16.84	17.54	18.60
84	17.63	16.25	17.44	18.60
96	17.10	15.86	17.30	18.19
108	17.13	15.26	17.00	16.85
120	16.38	13.89	16.96	16.71
132	16.35	13.36	16.93	16.77
144	16.32	13.00	17.20	16.64
156	16.16	12.64	16.87	15.85
168	16.01	12.89	16.87	15.52
180	15.73	12.76	16.34	14.73
192	15.45	12.41	15.74	14.14
204	14.66	11.78	15.65	14.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลแลคโตสเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	เปปโตนร้อยละ 0.5	เปปโตนร้อยละ 1.0	เปปโตนร้อยละ 1.5	เปปโตนร้อยละ 2.0
0	20.00	20.00	20.00	20.00
24	20.00	18.88	20.00	19.21
48	19.74	18.87	19.87	18.87
72	19.50	18.80	18.97	18.35
96	19.14	18.82	18.36	17.89
120	17.88	18.52	15.13	14.45
144	18.55	18.20	13.42	14.21
168	17.72	17.74	12.35	15.12
192	16.70	17.60	13.48	14.41
216	15.71	15.67	13.53	14.29
240	15.20	15.87	12.20	11.64
264	12.75	10.97	8.45	8.33
288	10.18	10.06	7.50	8.27
312	10.39	10.46	8.01	8.02
336	10.65	10.65	8.12	8.33
360	10.28	10.28	9.07	8.29
384	9.59	9.59	8.68	6.79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยโปรแกรม SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science)

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	16.555	3	5.518	4.771	0.004
Within Groups	101.786	88	1.157		
Total	118.342	91			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable :data

LSD

(I) Nitrogen	(J) Nitrogen	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Beef extract	MSG	0.23435	0.31714	0.462	-0.3959	0.8646
	Peptone	-0.89739*	0.31714	0.006	-1.5276	-0.2671
	Yeast extract	-0.31130	0.31714	0.329	-0.9416	0.3189
MSG	Beef extract	-0.23435	0.31714	0.462	-0.8646	0.3959
	Peptone	-1.13174*	0.31714	0.001	-1.7620	-0.5015
	Yeast extract	-0.54565	0.31714	0.089	-1.1759	0.0846
Peptone	Beef extract	0.89739*	0.31714	0.006	0.2671	1.5276
	MSG	1.13174*	0.31714	0.001	0.5015	1.7620
	Yeast extract	0.58609	0.31714	0.068	-0.0442	1.2163
Yeast extract	Beef extract	0.31130	0.31714	0.329	-0.3189	0.9416
	MSG	0.54565	0.31714	0.089	-0.846	1.1759
	Peptone	-0.58609	0.31714	0.068	-1.2163	0.0442

* The mean difference is significant at the 0.05 level

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยโปรแกรม SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Science)

Oneway

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	24.958	3	8.319	4.512	0.007
Within Groups	95.884	52	1.844		
Total	120.842	55			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable :data

LSD

(I) Concentration	(J) Concentration	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0.5% Peptone	1.0% Peptone	-0.87714	0.51324	0.093	-1.9070	0.1528
	1.5% Peptone	-1.16000*	0.51324	0.028	-2.1899	-0.1301
	2.0% Peptone	-1.86286*	0.51324	0.001	-2.8928	-0.8330
1.0% Peptone	0.5% Peptone	0.87714	0.51324	0.093	-0.1528	1.9070
	1.5% Peptone	-0.28286	0.51324	0.584	-1.3128	0.7470
	2.0% Peptone	-0.98571	0.51324	0.06	-2.0156	0.0442
1.5% Peptone	0.5% Peptone	1.16000*	0.51324	0.028	0.1301	2.1899
	1.0% Peptone	0.28286	0.51324	0.584	-0.7470	1.3128
	2.0% Peptone	-0.70286	0.51324	0.177	-1.7328	0.3270
2.0% Peptone	0.5% Peptone	1.86286*	0.51324	0.001	0.8330	2.8928
	1.0% Peptone	0.98571	0.51324	0.06	-0.0442	2.0156
	1.5% Peptone	0.70286	0.51324	0.177	-0.3270	1.7328

* The mean difference is significant at the 0.05 level

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้