สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดโพรพิโอนิกแบบกะ โดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965: ผลของพีเอช และอุณหภูมิ

นางสาว ญาณิน พรพนมเวศน์
นางสาวปุณยวีร์ ปียวรวงศ์
นางสาวอัญญารัตน์ ทองคำ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67281
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2548
b 11662827
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Batch Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965: Effect of pH and Temperature

Miss Yanin Pompanomvest

Miss Poonyawee Piyaworawong

Miss Anyarat Thongkum

A special Project Submitted in Partial of the Requirement for the Degree of Bachelor of science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การผลิตกรดโพรพิโอนิกแบบกะ โดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965: ผลของพีเอช และอุณหภูมิ		
นักศึกษา	นางสาว ญาณิน	พรพนมเวศน์	รหัสประจำตัว 45050192
	นางสาว ปุณยวีร์	ปียวรวงศ์	รหัสประจำตัว 45050215
	นางสาว อัญญารัตน์	ทองคำ	รหัสประจำตัว 45050265
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.สุขใจ ชูจันทร์		
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง		

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ	ผศ.ลินจง สุขลำภู	
กรรมการ	รศ.สุขใจ ชูจันทร์	

.....

(.....)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ การผลิตกรดโพรพิโอนิกแบบกะ โดย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965: ผลของพีเอช และอุณหภูมิ

นักศึกษา นางสาว ญาณิน พรพนมเวศน์
นางสาวปุณยวีร์ ปิยวรวงศ์
นางสาวอัญญารัตน์ ทองคำ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

การผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพแบบกะโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ให้ผลผลิตออกมาในรูปของกรดผสม โดยมีกรดที่สำคัญ ได้แก่ กรดโพรพิโอนิก กรดแลคติก กรดอะซิติก เป็นต้น ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกด้วยเครื่อง HPLC จากการศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่ง เมื่อได้สภาวะพีเอชที่เหมาะสม จึงทำการศึกษาผลของอุณหภูมิของการบ่มเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 25 30 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกที่ให้ปริมาณผลผลิตมากที่สุด คือ ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุด คือ 4.840 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 216 ของระยะเวลาการหมัก โดยมีค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.0169 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของผลผลิตมีค่าเท่ากับ 0.2516 กรัมต่อกรัมสับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Batch Propionic acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965: Effect of pH and Temperature
Name	Yanin Pompanomvest
	Poonyawee Piyaworawong
	Anyarat Thongkum
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Sukjai Choojun

ABSTRACT

Batch propionic acid biotechnological production by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 give mixed acid products such as propionic acid, lactic acid and acetic acid etc. Quantity of propionic acid analyzed by HPLC. Effect of pH that suitable for propionic acid production was studied at pH values 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0. At stationary-state was used for fermentation. When we found suitable pH value, various temperature values at 25, 30, 37°C and room temperature were studied. The best condition of propionic acid production were found to be pH 5.0 and 30°C, produced highest propionic acid product of 4.840 g/L with fermentation time at 216 hours. Productivity rate of these conditions were 0.0169 g/L.h^{-1} and product yields were 0.2516 g/g substrate.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้นเนื่องจากได้รับความสนับสนุน ความช่วยเหลือ ความร่วมมือ ตลอดจนคำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อผู้จัดทำ คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ที่ให้คำปรึกษา และแนะแนวทาง การปฏิบัติ และข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงงานนี้ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานทำให้โครงงานชิ้นนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ ประธานกรรมการ และ ผศ.ลินจง สุขลำภู กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทานแก้ไข โครงงานพิเศษเล่มนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติๆที่คอยให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษเสมอมา ขอขอบคุณพี่ๆเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาคชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อใช้ในการทำโครงงานพิเศษ รวมถึงพี่ปริญญาโท เพื่อนๆ และน้องๆทุกท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้จัดทำใคร่ขอถือโอกาสนี้ขอบพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนาม และไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย หากโครงงานพิเศษนี้มีสิ่งใดที่ขาดตกบกพร่อง ผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณความดีที่ปรากฏในโครงงานพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นคุณความดีของผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นางสาว ญาณิน พรพนมเวศน์
นางสาว ปุณยวีร์ ปิยวรวงศ์
นางสาว อัญญารัตน์ ทองคำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทที่ 1 บทนำ.....1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์.....30
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและเสนอแนะ.....38
บทที่ 6 เอกสารอ้างอิง.....39

ภาคผนวก ก. การใช้วัตถุเจือปนอาหาร.....42
ภาคผนวก ข. อาหารเลี้ยงเชื้อ.....46
ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์น้ำตาลแลคโตส ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dobois, 1956).....48
ภาคผนวก ง. การใช้เครื่อง HPLC.....50
ภาคผนวก จ. ข้อมูลผลการทดลอง.....56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2-1 สูตรโครงสร้างของกรดโพรพิโอนิก.....3
2-2 สูตรโครงสร้างของโซเดียมโพรพิโอเนท.....4
2-3 สูตรโครงสร้างของแคลเซียมโพรพิโอเนท.....4
2-4 เชื้อ *Propionibacteriu. Acidipropionici* ATCC 4965.....11
2-5 เชื้อ *Propionibacterium freudenreichii*.....12
2-6 เชื้อ *Propionibacterium acnes*.....12
2-7 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสและแลคเตทโดยเชื้อ *Propionibacterium* sp...14
2-8 การสร้างซัคซิเนต และ โพรพิโอเนท โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์.....15
2-9 วิถีอะคริเลตของการสร้างโพรพิโอเนท.....16
4-1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช.....30
4-2 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช.....31
4-3 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ.....32
4-4 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ.....32
4-5 แสดงปริมาณผลผลิตเมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช.....33
4-6 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช.....34
4-7 แสดงปริมาณผลผลิตเมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ.....36
4-8 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ.....37
7-1 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตส.....49
7-2 แสดงพีคของกรดแต่ละชนิด.....56
7-3 แสดงกราฟมาตรฐานกรดชนิดต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.....57
7-4 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช กับปริมาณผลผลิต กรดต่างๆ เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช 58
7-5 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช กับปริมาณผลผลิต กรดต่างๆ เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิการบ่ม.....65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2-1 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของกรดโพรพิโอนิก.....4
2-2 ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราที่พีเอชต่างๆ.....6
2-3 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ.....13
4-1 แสดงผลการทดลอง พีเอชของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ไป
ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลผลิต
เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช.....35
4-2 แสดงผลการทดลอง พีเอชของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ไป
ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลผลิต
เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิการบ่ม.....37
7-1 การใช้วัตถุเจือปนอาหาร.....42
7-2 การเจือจางสารละลายแลคโตสที่ระดับความเจือจางต่างๆ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน.....48
7-3 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 4.5.....59
7-4 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 5.0.....60
7-5 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 5.5.....61
7-6 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 6.0.....62
7-7 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 6.5.....63
7-8 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 7.0.....64
7-9 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....66
7-10 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....67
7-11 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....68
7-12 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่อุณหภูมิห้อง.....69
7-13 การวิเคราะห์ ANOVA เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสม.....69
7-14 การเปรียบเทียบผลทางสถิติด้วยวิธี Tukey HSD และ LSD
เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสม.....70
7-15 การวิเคราะห์ ANOVA เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม.....71
7-16 การเปรียบเทียบผลทางสถิติด้วยวิธี Tukey HSD และ LSD
เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสม.....71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งขบวนการเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตเพื่อการค้านิยมผลิตโดยกระบวนการทางเคมีเนื่องจากได้ผลผลิตสูงตามความต้องการ และมีระยะเวลาในการผลิตที่เร็วกว่ากระบวนการทางชีวภาพ แต่กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้มีราคาที่ค่อนข้างแพงเนื่องจากกระบวนการทำให้กรดบริสุทธิ์นั้นมีความยุ่งยากซับซ้อน ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ไม่มีความเป็นพิษ และสามารถใช้กับอุตสาหกรรมประเภทอาหารได้ค่าใช้จ่ายในการผลิตไม่สูงนัก การผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium* แต่ข้อจำกัดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพนี้เป็นผลมาจากการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกระบวนการหมัก จะได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณน้อย ตัวอย่างเช่น การหมักแบบกะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียงร้อยละ 1-3 ซึ่งใช้เวลาในการหมัก 7-14 วัน จึงได้มีการคิดหาวิธีต่างๆเพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้การตรึงเซลล์ การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะ การใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมกับการผลิดกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น การทดลองนี้เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการคิดค้นสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ที่สภาวะของพีเอชและอุณหภูมิต่างๆ

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของพีเอช และอุณหภูมิต่างๆ ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก และกรดแลคติกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ทดลองเพื่อหาค่า พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก วิเคราะห์หาปริมาณของกรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก กรดแลคติก น้ำตาลและชีวมวล (น้ำหนักแห้ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงค่าพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ รวมถึงการผลิตกรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก และกรดแลคติกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

1.4.2 ทราบถึงผลผลิตที่ได้จากกระบวนการการหมักโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก (ที่มา : http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?vID=742)

2.1.1 **ชื่อสาร** : กรดโพรพิโอนิก (propionic acid)

2.1.2 **ชื่อพ้องอื่นๆ** : กรดเมทธิลอะซิติก (methylacetic acid)
กรดโพรเพนโนอิก (propanoic acid)
กรดอีเทนคาร์บอกซีลิก (ethanecarboxylic acid)
กรดซูโดอะซิติก (pseudoacetic acid)
คาร์บอกซีอีเทน (carboxyethane)
กรดไฮโดรอะคลิริก (hydroacrylic acid)
กรดเอทธิลฟอร์มิก (ethylformic acid)
กรดเมธาอะซิโนนิก (metacetonic acid)

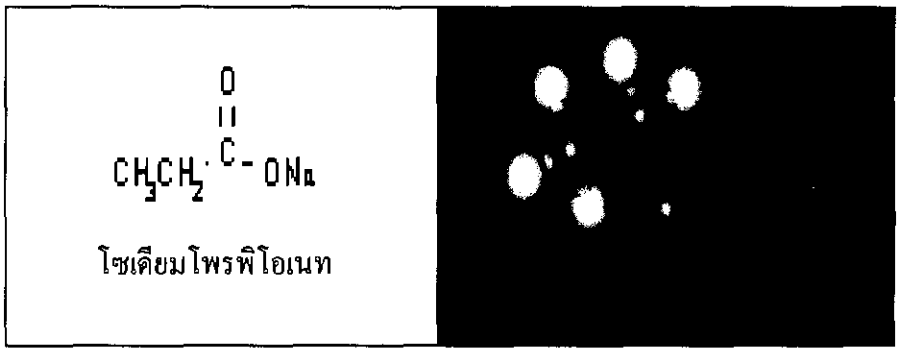
2.1.3 **สูตรโมเลกุล** : $C_3H_6O_2$

2.1.4 **สูตรโครงสร้าง** :

รูปที่ 2-1 สูตรโครงสร้างของกรดโพรพิโอนิก
ที่มา : http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/40abcj13.htm และ
http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/anderson/preservatives.htm

กรดโพรพิโอนิกที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมส่วนมากใช้ในรูปของเกลือ เช่น โซเดียมโพรพิโอเนท แคลเซียมโพรพิโอเนท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-2 สูตรโครงสร้างของโซเดียมโพรพิโอเนท

ที่มา : http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/40abcj13.htm และ

http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/anderson/preservatives.htm

รูปที่ 2-3 สูตรโครงสร้างของแคลเซียมโพรพิโอเนท

ที่มา : http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/40abcj13.htm และ

http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/anderson/preservatives.htm

2.1.5 คุณสมบัติทางกายภาพ และทางเคมี

ตารางที่ 2-1 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของกรดโพรพิโอนิก

คุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพ	กรดโพรพิโอนิก
สถานะ	ของเหลว
สี	ไม่มีสี
กลิ่น	ฉุน
จุดหลอมเหลว	21 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	141.1 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ	0.992-0.994

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

คุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพ	กรดโพรพิโอนิก
ความหนาแน่นไอ	2.55
ความสามารถในการละลายน้ำ	100 กรัม/น้ำ 1 ลิตร
แฟกเตอร์แปลงหน่วย	1 พีพีเอ็ม เท่ากับ 3.03 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เมตร 1มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เมตร เท่ากับ 0.33 พีพีเอ็ม ที่ 25 องศาเซลเซียส
อัตราการระเหย	ไม่ระเหย
การละลาย	สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆเช่น เอทธานอล ไดเอธิลอีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม
ความคงตัวทางเคมี	สารนี้มีความเสถียร
สารที่เข้ากันไม่ได้	เบสเข้มข้น เอมีน โลหะ สารออกซิไดส์อย่างแรง สารรีดิวซ์อย่างแรง ฮาโลเจน และสารประกอบ- ฮาโลเจนเข้มข้น
สภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง	ความร้อน เปลวไฟ และแหล่งจุดติดไฟ
สารเคมีอันตรายที่เกิดจากการสลายตัว	คาร์บอนมอนนอกไซด์ และคาร์บอนไดออกไซด์
อันตรายจากการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์	จะไม่เกิดขึ้น
สารนี้เป็นสารไวไฟ	

ที่มา : http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?vID=742

2.2 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดที่อยู่ในกลุ่ม Aliphatic monocarboxylic acid พบเกิดตามธรรมชาติ ใน swiss cheese อาหารหมักดอง เหงื่อของคน และในกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง กรดโพรพิโอนิกสามารถละลายได้ดีในน้ำ เอทธานอล และอีเทอร์ ส่วนเกลือโพรพิโอเนทสามารถละลายน้ำได้ร้อยละ 30 แต่ไม่ละลายในไขมัน (Helena Lind, 2004)

กรดโพรพิโอนิก และเกลือแคลเซียมหรือโซเดียมโพรพิโอเนทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี โดยพบว่ากรดโพรพิโอนิกจะไปยับยั้งเอนไซม์ที่จำเป็นต่อขบวนการเมตาบอลิซึม โดยเข้าไปแข่งขันกับอะลานีน (alanine) และกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Braner และคณะ, 1990) พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของกรดโพรพิโอนิกให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 3.4 – 4.5 โดยที่พีเอช 4 มีโมเลกุลของกรดและเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 88 ในขณะที่พีเอช 6 จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีโมเลกุลที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 6.7 โดยกรดที่ไม่แตกตัวจะทำให้การยับยั้งการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ดังแสดงให้เห็นในตาราง 2-2

ตารางที่ 2-2 ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราที่พีเอชต่างๆ

เชื้อจุลินทรีย์	*Chatomonium globosum*	*Alternaria solani*	*Penicillium citrinum*	*Aspergillus niger*
pH 3	0.04%	0.04%	0.04%	0.08%
pH 5	0.04%	0.06%	0.08%	0.08%
pH 7	-	-	-	-
pH 9	-	-	-	-

- ไม่มีการยับยั้ง

ที่มา : ศิวาพร, 2524

จากการศึกษาของ กุลยา (2533) พบว่า การใช้แคลเซียมโพรพิโอเนท และโซเดียม-โพรพิโอเนทปริมาณร้อยละ 0.2-0.4 ของขนมปัง จะสามารถป้องกันเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเมือกได้ การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของโซเดียมโพรพิโอเนทจะให้ผลที่ พีเอช 3.5-4.5 ดีกว่าที่พีเอชสูง

จากการศึกษาของ Buchanan และ Ayres (1976) พบว่าการใช้กรดโพรพิโอนิก 0.1 กรัมต่อ 100 มิลลิกรัมของอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus parasiticus* และการสร้างอะฟลาทอกซินได้บางส่วน แต่ถ้าเพิ่มเป็น 0.2 กรัมจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการสร้างอะฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ ในระยะเวลา 7 วัน

2.2.1 **ประโยชน์ของกรดโพรพิโอนิก**

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ (E.H. Himmi และคณะ, 1999) และอาหารสัตว์ (Beate Schuppert, 1992) และนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการทำพลาสติกในรูปของ cellulose propionate (Babirato และคณะ, 1997)

2.2.1.1 **อุตสาหกรรมอาหาร**

การใช้ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่จะใช้เป็นสารกันบูด (Preservatives) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์เนยแข็งต่างๆ น้ำหวานต่างๆ และผักแห้งเป็นต้น และการเกิดเมือกหรือยางเหนียวในโด (dough) หรือแป้งขนมปังที่ผ่านการนวดแล้ว เนื่องจากกรดโพรพิโอนิก จะมีกลิ่นคล้ายเนยแข็งเล็กน้อย จึงมักจะนิยมใช้เป็นสารกันบูดใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ขนมอบ และเนยแข็งมากกว่าผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น (ศิวาพร, 2524) ช่วงพีเอชที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ 3.5-4.5 ในประเทศไทย อนุญาตให้ใช้กรดโพรพิโอนิกได้ 3,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.2.1.2 **อุตสาหกรรมยา**

ในอุตสาหกรรมยา จะใช้เป็นสารกันบูด (Preservatives) ในยาเม็ด และแคปซูล เพื่อป้องกันเชื้อรา ส่วนใหญ่นิยมใช้ในรูปเกลือโพรพิโอเนท และใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส (flavor) ในยาน้ำสำหรับเด็ก

2.2.1.3 **อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง**

ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง จะใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อรา อีกทั้งเป็นสาร Antioxidant ซึ่งเสริมประสิทธิภาพของสารกันหืนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เนื่องจากกรดโพรพิโอนิกมีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน จึงใช้เป็นสารปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในเครื่องสำอางให้มีความสมดุล และใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมน้ำหอมในรูป ethyl propionate (Czaczyk และคณะ, 1995) และกรดโพรพิโอนิก ที่ผลิตโดยวิธีการทางชีวภาพ จะมีความเป็นพิษน้อย เหมาะแก่การผสมในเครื่องสำอาง

2.2.2 **อันตรายจากกรดโพรพิโอนิก** (ที่มา :http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?vID=742)

2.2.2.1 **อันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ**

การหายใจเข้าไปจะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อจมูก และลำคอ ก่อให้เกิดอาการไอ และหายใจติดขัด

2.2.2.2 **อันตรายต่อผิวหนัง**

การสัมผัสถูกผิวหนังจะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง เกิดแผลไหม้ สารนี้สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายผ่านทางผิวหนังได้

2.2.2.3 **อันตรายต่อระบบทางเดินอาหาร**

การกลืนหรือกินเข้าไปจะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบย่อยอาหารและทางเดินอาหาร ก่อให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน เกิดแผลแสบไหม้บริเวณปาก และลำคอ

2.2.2.4 **อันตรายต่อตา**

การสัมผัสถูกตาจะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อตา และทำให้เกิดแผลไหม้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.5 **การก่อมะเร็ง ความผิดปกติอื่นๆ**

1. มีผลทำลายตา ผิวหนัง และเยื่อบุเมือก
2. อวัยวะเป้าหมาย : ตา ผิวหนัง ระบบทางเดินหายใจ

2.3 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ 2 วิธี

2.3.1 **กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี**

การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยวิธีสังเคราะห์ทางเคมีเป็นวิธีที่นิยมใช้ผลิตในทางการค้าอยู่ในปัจจุบันเพราะเป็นกระบวนการผลิตที่ใช้เวลาในการผลิตสั้นและได้ผลผลิตตามต้องการ (Playne., 1985)

2.3.2 **กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ**

กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium* แต่ข้อจำกัดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพนี้เป็นผลมาจากการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกระบวนการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่น้อย ตัวอย่างเช่น การหมักแบบกะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียงร้อยละ 1-3 ซึ่งใช้เวลาในการหมัก 7-14 วัน (Beate Schuppert และคณะ,1992) จึงได้มีการคิดหาวิธีต่างๆเพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีต่างๆ เช่น การใช้การตรึงเซลล์ (Shang-Tian Yang และคณะ,1994) การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะ (Roberto Martinez-Campos และคณะ, 2002) การใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (Quesada-Chanto และคณะ, 1994) การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโพรพิโอนิก (Quesada-Chanto,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 กลูโคส และแลคเตทเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* spp. *shermanii* ในสภาพการหมักแบบกะ การเติมกลีเซอรอลจำนวน 20 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อผลิตกรดนั้น พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ใช้เวลาในการหมักสั้นกว่า *P. shermanii* ถึง 2 เท่า คือ 54 ชั่วโมง และ 110 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของกรดโพรพิโอนิกที่ได้พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ให้ผลผลิตที่สูงกว่าเชื้อ *P. shermanii* คือ 12 กรัมต่อลิตร และ 9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในทำนองเดียวกันการเติมกลูโคสจำนวน 20 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากเชื้อ *P. acidipropionici* ก็สูงกว่าเช่นกัน คือ 8.7 กรัมต่อลิตร และ 6.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบแหล่งของธาตุคาร์บอนจากทั้ง 2 แหล่งพบว่าการใช้กลีเซอรอลจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าการใช้กลูโคส คือ 12 กรัมต่อลิตร และ 8.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก และวิตามินบี 12 จากซูโครส พบว่าความเข้มข้นของ $FeSO_4.7H_2O$ 1.5 มิลลิกรัม ธาตุโคบอลต์ 0.75 มิลลิกรัม 5,6dimethylbenzimidazol 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) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคเตทจาก corn steep liquor (CSL) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* สายพันธุ์ P200910 เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแอลจิเนตและเชื้ออิสระในสภาพการหมักแบบกะกึ่งกะและต่อเนื่อง พบว่าการหมักแบบกะจะแสดงผลผลิตของกรดสูงสุดภายในเวลา 36 ชั่วโมง การใช้แลคเตทเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าการใช้กลูโคส และเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตจะให้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าเชื้ออิสระ ส่วนการหมักแบบกึ่งกะใช้เวลาในการหมักนาน 250 ชั่วโมง ความเข้มข้นสูงสุดของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้กลูโคสจะสูงกว่าการใช้แลคเตท คือ 57 และ 45.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในการหมักแบบต่อเนื่อง การใช้กลูโคสจะให้ผลผลิตของกรดโดยเชื้อที่ถูกตรึงสูงกว่าการใช้แลคเตท

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Himmi และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้กลูโคสและ กลีเซอรอล เป็นแหล่งอาหาร โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* จะได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ และได้ผลิตผลพลอยได้คือ กรดอะซิติก n-propanol และกรดซัคซินิก จากการทดลองนี้ พบว่า เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน จะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้มากที่สุด *P. acidipropionici* มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นได้เร็วกว่า 0.64 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดสูงกว่า 0.42 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ได้จะมากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นถึง 2 เท่า ส่วนเชื้อ *P. freudenreichii* เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการใช้กลีเซอรอลกับการสร้างผลผลิต แสดงว่าเมแทบอไลท์ ของเชื้อ *P. freudenreichii* นั้นปรับตัวเพื่อนำไปใช้ในการสร้างสารประกอบตัวอื่นได้ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีเยี่ยมสำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

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* มีการเติมกลูโคสหรือแลคเตทหรือสารผสมระหว่างกลูโคสและแลคเตท กลูโคสและแลคเตทจะถูกใช้ใน ปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การใช้แลคเตทและกลูโคสร่วมกันจะเพิ่มอัตราการผลิตโพรพิโอเนทต่ออะซิเตท (P/A) แล้วยังเป็นการเพิ่มส่วนของธาตุคาร์บอนสำหรับที่จะนำไปใช้ในการผลิตชีวมวล ผลผลิตของโพรพิโอเนทต่ออะซิเตท (P/A) เท่ากับ 7.6 เมื่อใช้แลคเตทและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโพรพิโอเนทต่ออะซิเตท (P/A) เท่ากับ 1.34 เมื่อใช้แลคเตท อย่างเดียว และ 1.85 เมื่อใช้กลูโคสอย่างเดียว ปริมาณธาตุคาร์บอนที่เก็บเกี่ยวได้ในชีวมวลมีค่าเท่ากับ 0.09 เมื่อใช้กลูโคส 0.12 เมื่อใช้ แลคเตท และ 0.21 เมื่อใช้แลคเตทและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์

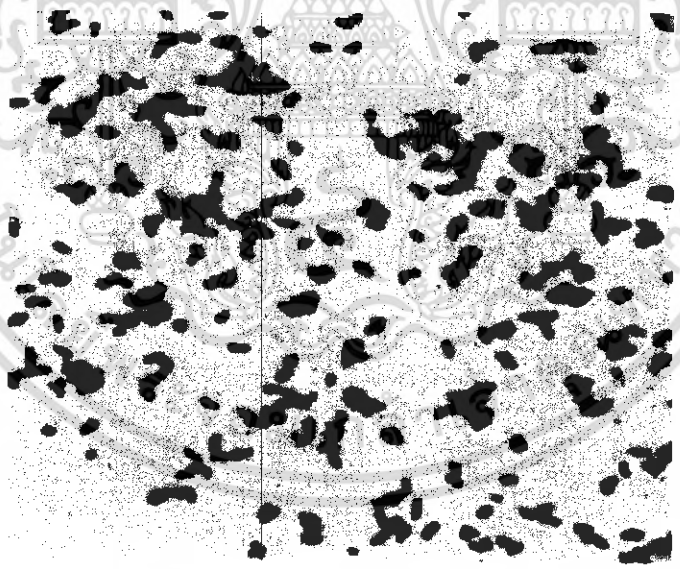
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

2.4.1 *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ

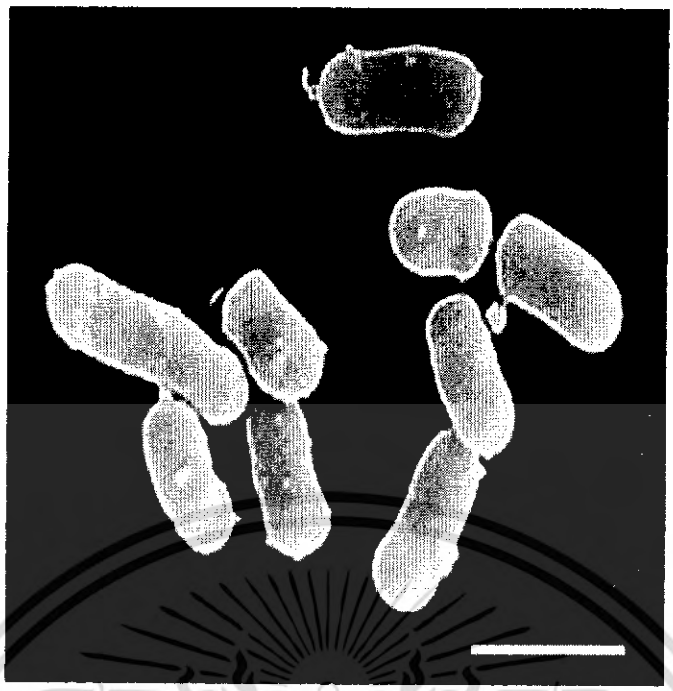
เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดโพรพิโอนิกอยู่ในสกุล *Propionibacterium* ซึ่งเรียกว่าเป็น propionic acid bacteria พบครั้งแรกโดยแยกได้จาก Swiss cheese ผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการหมักจะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะทำให้เกิดลักษณะที่เป็นรูพรุนในเนยแข็ง (Hettinga และ Reinbold, 1972)

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียพวกนี้คือ ลักษณะแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ มีการเจริญแบบแฟคคัลเททีฟแอนแอโรบ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส สามารถหมักได้กรดโพรพิโอนิก ซัคซินิค อะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์ มีความต้องการทางอาหารที่ซับซ้อน เจริญเติบโตช้า แหล่งที่พบแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมหรือกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นม มีอยู่ด้วยกัน 6 สายพันธุ์ คือ *Propionibacterium freudenreichii P. jensenii P. theonii P. acidipropionici P. coccoides* และ *P. cyclohexanicum* ส่วนกลุ่มที่สองคือ กลุ่มที่เจริญอยู่บนผิวหนังของมนุษย์หรือกลุ่มที่ทำให้เกิดสิว กลุ่มนี้ไม่ค่อยมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม



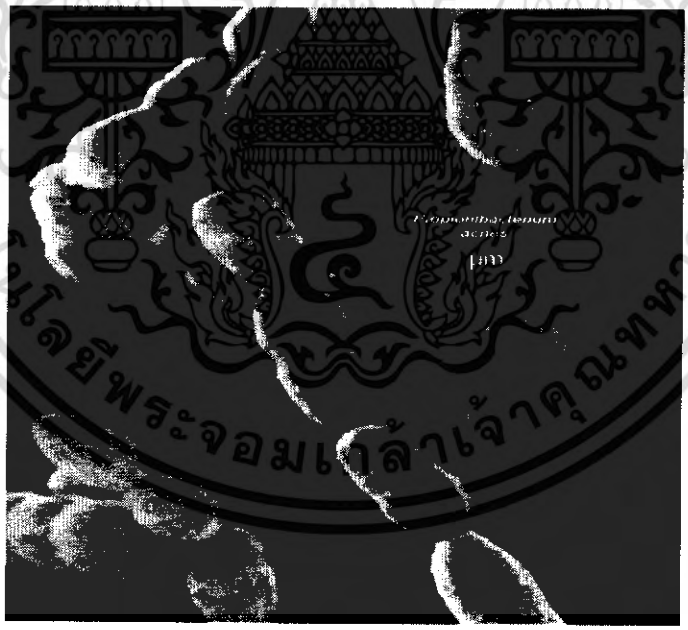
รูปที่ 2-4 เชื้อ *Propionibacteriu. Acidipropionici* ATCC 4965

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-5 เชื้อ *Propionibacterium freudenreichii*

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



รูปที่ 2-6 เชื้อ *Propionibacterium acnes*

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2-3 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ

Species	Strain reference	Propionic acid (70 h) g/l	pH (40)
P. acidipropionici	ATCC 4965	9.8	4.65
	CNRZ 287	7.5	4.67
	CNRZ 721	2.0	5.67
	CNRZ 733	0.0	4.40
P. thoenii	ATCC 4871	8.0	4.62
P. jensenii	ATCC 4870	0.0	5.82
	CNRZ 83	2.0	5.10
	ATCC 4867	0.0	5.10
	CNRZ 731	0.0	4.11
P. freudenreichii subsp. freudenreichii	NCIB 5959	0.0	5.82
	CNRZ 89	3.1	5.03
	CNRZ 725	2.6	5.29
	CNRZ 726	3.0	5.36
	CNRZ 727	3.2	5.10
	CNRZ 728	3.2	5.24
	CNRZ 729	3.2	5.31
P. freudenreichii subsp. shermanii	NCIB	3.7	5.15
	CNRZ	2.3	5.18
	CNRZ	4.5	4.73
	CNRZ	0.0	5.81
	SO-STANDA	6.0	4.51
	2908-STANDA	6.2	4.45
	2910-STANDA	1.92	5.67
	7916-STANDA	0.55	5.90
	PSI-BOLL	0.82	5.20

ที่มา : Colomban และ คณะ (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 **จุลินทรีย์ผลิตกรดโพรพิโอนิกชนิดอื่นๆ**

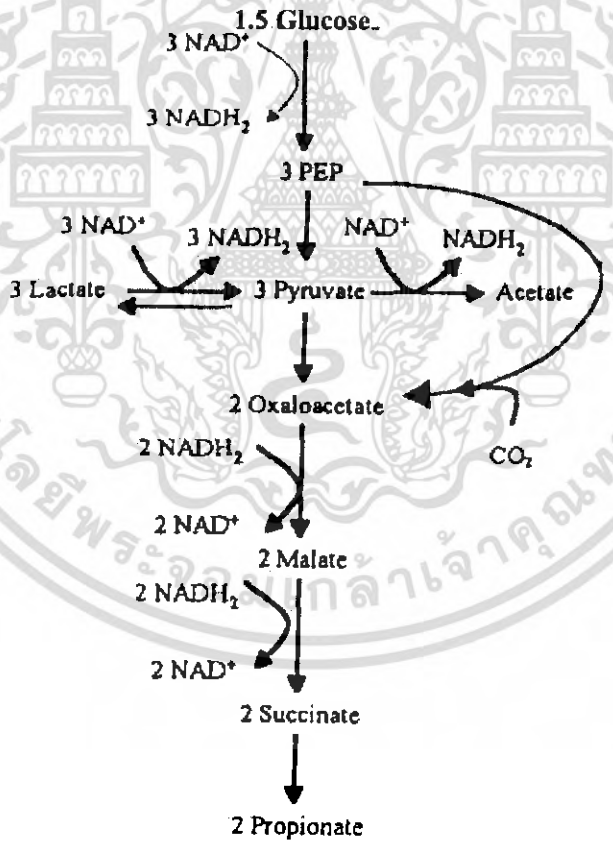
2.4.2.1 *Clostridium propionicum* (Babirato และคณะ, 1997)

2.4.2.2 *Propionispira arboris* (Thompson และคณะ, 1984)

2.4.2.3 *Selenomonas ruminantium* (Eaton และ Gabelmen, 1995)

2.5 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก

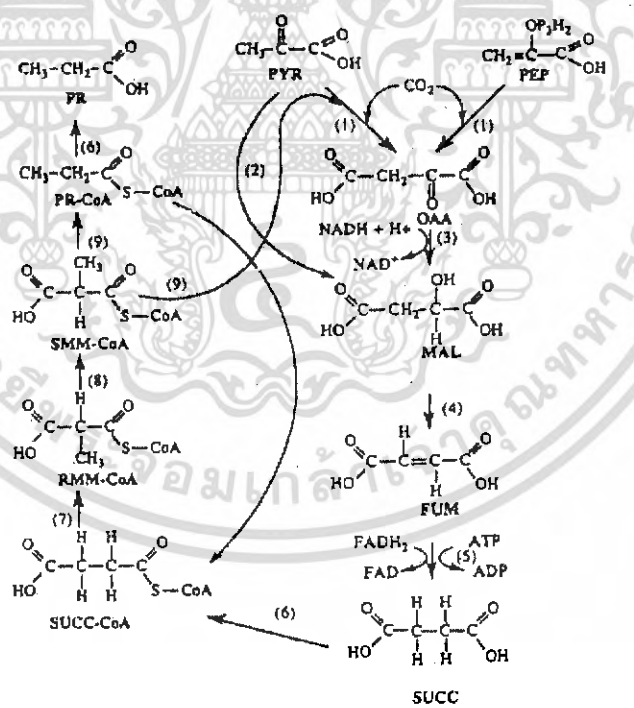
ในกระบวนการหมักโดยทั่วไป มักจะเกิดคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตผลสุดท้ายเสมอ สำหรับสิ่งมีชีวิตนั้นการสร้าง ซัคซิเนต (Succinate) และโพรพิโอเนท (Propionate) จะทำการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์จะเป็นตัวเสริมปัจจัยทางสรีรวิทยา การผลิตกรดโพรพิโอนิกสามารถเกิดขึ้นได้หลายวิถีด้วยกันคาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ถูกใช้ไปในการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์โดยเชื้อ *Propionibacterium* โดยเริ่มจากสารตัวกลางที่สำคัญคือ ไพรูเวต ออกซาโรอะซิเตท (Oxaloacetate) มาเลต และโพรพิโอเนท ตามลำดับ ดังรูป 2-7



รูปที่ 2-7 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสและแลคเตทโดยเชื้อ *Propionibacterium*
ที่มา : Papoutsakis และ Meyer (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้างซัคซิเนตและโพรพิโอเนทโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ได้แสดงในรูปที่ 2-8 การสร้างจะเริ่มต้นจากการสร้างออกซาโรอะซิเตท โดยการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้กลับเป็นไพรูเวต (Pyruvate) หรือฟอสโฟอีนอลไพรูเวต(PEP) จะถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอล-มาเลต(L-malate)โดยการทำงานของเอนไซม์มาริกดีไฮโดรจิเนส(malic dehydrogenase) กรดมาริก(malic acid) ที่ได้จะถูกดึงน้ำออกโดยเอนไซม์ฟูมาเรส(Fumarase) ทำให้ได้กรดฟูมาริก(Fumaric acid) ซึ่งปฏิกิริยานี้ผันกลับได้จากนั้นฟูมาเรสจะถูกเปลี่ยนให้เป็นซัคซิเนต โดยเอนไซม์ฟูมาเลตรีดักซ์เตส (Fumarate reductase) ซัคซิเนตเป็นตัวกลางในกระบวนการ โดยซัคซิเนตจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โคเอทรานเฟอเรส (CoA tranferase) ได้ซัคซินิลโคเอ(Succinyl CoA) ปฏิกิริยาต่อไปนี้ซัคซินิลโคเอจะเปลี่ยนไปเป็นอาร์-เมททิล มาโลนิลโคเอ(R-methyl malonyl CoA) โดยเอนไซม์ อาร์-เมททิล มาโลนิลมิวเตส(R-methyl malonylmutase) หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนอาร์-เมททิลมาโลนิลโคเอไปเป็นเอส-เมททิล มาโลนิลโคเอ(S-methyl malonyl CoA) คาร์บอนของเอส-เมททิล มาโลนิลโคเอ จะถูกย้ายออกไปรวมกลับไพรูเวททำให้เกิดการสร้างออกซาโรอะซิเตท เมื่อคาร์บอนเคลื่อนย้ายออกไปจะทำให้ได้โพรพิโอนิลโคเอ(Propionyl CoA) จะถูกย้ายโคเอ(CoA) ออกจากโมเลกุล ทำให้โคเอที่จะนำไปใช้กับซัคซิเนตตัวต่อไปและทำให้ได้กรดโพรพิโอนิก(Propionic acid)

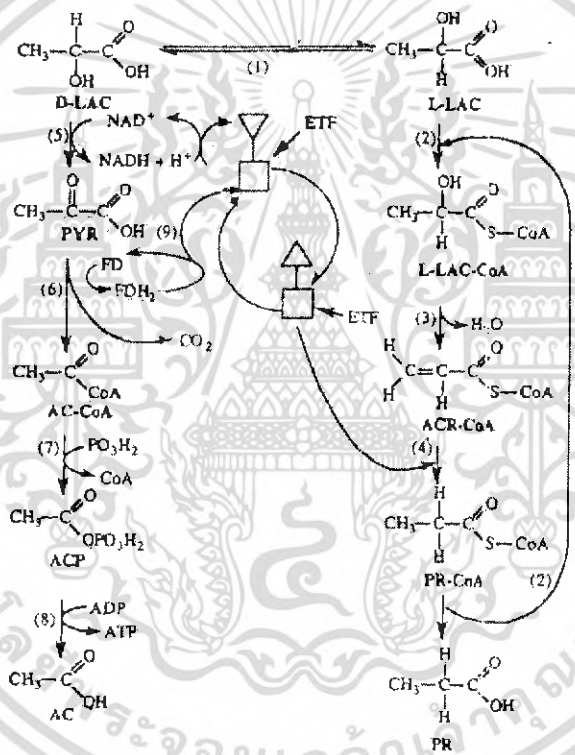


รูปที่ 2-8 การสร้างซัลซิเนต และโพรพิโอเนทโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

ที่มา : Papoutsakis และ Meyer (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิถีอะครีเลต(Acrylate) ของการสร้างโพรพิโอเนท รายละเอียดของวิถีนี้แสดงในรูปที่ 2-9 กรดโพรพิโอนิกจะถูกสร้างขึ้นตามลำดับ โดยเริ่มต้นจากการเปลี่ยนรูปของแอล-แลคเตท(L-lactate) ไปเป็น แอล-แลคติลโคเอ(L-lactryl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์โคเอทรานเฟอเรส(CoA transferase) แอล-แลคติลโคเอจะเปลี่ยนรูปกลายไปเป็น อะคริลิลโคเอ(Acrylyl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีไฮดราเทสอะคริลิลโคเอ(Dehydratase acrylyl CoA) จะเปลี่ยนไปเป็นโพรพิโอนิลโคเอ โดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของฟลาโวโปรตีน(flavo protein) โพรพิโอนิลโคเอจะย้ายโมเลกุลโคเอไปสู่ แอล- แลคเตทเพื่อสร้างแอล-แลคติลโคเอและเกิดเป็นกรดโพรพิโอนิกอิสระ การสร้างอะซิเตท(acetate) และคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดควบคู่กับการสร้างโพรพิโอเนท



รูปที่ 2-9 วิถีอะครีเลตของการสร้างโพรพิโอเนท

ที่มา : Papoutsakis และ Meyer (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

2.6.1 แหล่งคาร์บอน

ธาตุคาร์บอนเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และการใช้เพื่อผลิตเป็นสารผลิตภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะใช้ธาตุคาร์บอนจากแหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน เช่น สารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก กลีเซอรอล แมนนิทอล สารประกอบคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ กลูโคส มอลโทส แลคโตส ซูโครส และแป้ง (Prescott และ Dun, 1959)

Champange และคณะ(1989) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *P. shermanii* สายพันธุ์ B-123 ที่ถูกตรึงอยู่ในแคลเซียมแอลจิเนทในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วยหางนม และแลคเตทในการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าเชื้อ B-123 จะใช้แลคเตทในการเจริญได้ดีกว่าแลคโตสที่มีอยู่ในหางนม เนื่องจากหางนมที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักนี้ได้มาจากการผลิตเนยแข็งที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อแลคโทบาซิลลัส (*Lactobacillus*) ซึ่งมีพีเอชค่อนข้างไปทางกรดจึงต้องทำให้เป็นกลางด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ก่อนที่จะทำการหมักด้วยเชื้อ B-123 และพบว่าอัตราการหมักจะสูงขึ้นเมื่อปรับพีเอชของหางนมด้วย แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และความเข้มข้นของแลคเตทที่ใช้อยู่ระหว่าง ร้อยละ 1-2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักกรดโพรพิโอนิก คือ 37 องศาเซลเซียส โดยที่อัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติกจะสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสูงขึ้น

แบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropioici* สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก ดังสมการ

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

และยังสามารถเปลี่ยนกรดแลคติกไปเป็นกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติกดังสมการ

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

(Tyree และคณะ, 1991)

Woskow และ Glatz (1991) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคโตสจากหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P9 และP 200910 ในสภาพการหมักแบบกะและกึ่งต่อเนื่อง พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P 200910 ให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 47 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าผลผลิตที่ได้จากสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ P9 และจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกสูงสุดโดยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาพการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

67281

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

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ศึกษาพบว่า *Propionibacterium shermanii* PZ-3 และ *Propionibacterium acidipropionici* NRRL B3569 ทั้งสองสายพันธุ์สามารถใช้ซูโครสเพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นกรดโพรพิโอนิกโดยไม่ทำให้เกิดการยับยั้งโดยสับเสรทในช่วงความเข้มข้น 30.170 กรัมซูโครสต่อลิตร

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคเตทจาก corn steep liquor (CSL) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* สายพันธุ์ P200910 เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแอลจิเนทและเชื้ออิสระในสภาพการหมักแบบกะกึ่งกะและต่อเนื่อง พบว่าการหมักแบบกะจะแสดงผลผลิตของกรดสูงสุดภายในเวลา 36 ชั่วโมง การใช้แลคเตทเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าการใช้กลูโคส และเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตจะให้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าเชื้ออิสระ ส่วนการหมักแบบกึ่งกะใช้เวลาในการหมักนาน 250 ชั่วโมง ความเข้มข้นสูงสุดของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้กลูโคสจะสูงกว่าการใช้แลคเตท คือ 57 และ 45.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในการหมักแบบต่อเนื่อง การใช้กลูโคสจะให้ผลผลิตของกรดโดยเชื้อที่ถูกตรึงสูงกว่าการใช้แลคเตท

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

Babirato และคณะ (1997) เปรียบเทียบการเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิก 3 ชนิด คือ *Propionibacterium acidipropionici* สายพันธุ์ ATTCC 25562 *P. acnes* ATTCC 6919 และ *Clostridium propionicum* ATTCC 25522 ทำการหมักแบบกะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ กลีเซอรอล กลูโคส และกรดแลคติคเพื่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่า *P. acidipropionici* สายพันธุ์ ATTCC 25562 ให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุดโดยใช้เวลาใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียอีก 2 สายพันธุ์ และพบอีกว่าการใช้กลีเซอรอลเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ ATTCC 25562 จะได้ผลผลิตของกรดที่สูงกว่าการใช้กลูโคสและกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน

E.H.Himmi และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้กลูโคสและกลีเซอรอล เป็นแหล่งอาหาร โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* จะได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ และได้ผลิตผลพลอยได้คือ กรดอะซิติก n-propanol และกรดซัคซินิก จากการทดลองนี้ พบว่าเมื่อใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน จะมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้มากที่สุด *P. acidipropionici* มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นได้เร็วกว่า 0.64 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดสูงกว่า 0.42 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ได้จะมากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นถึง 2 เท่า ส่วนเชื้อ *P. freudenreichii* เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการใช้กลีเซอรอลกับการสร้างผลผลิต แสดงว่าเมแทบอไลท์ของเชื้อ *P. freudenreichii* นั้นปรับตัวเพื่อนำไปใช้ในการสร้างสารประกอบตัวอื่นได้ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีเยี่ยมสำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

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* มีการเติมกลูโคสหรือแลคเตทหรือสารผสมระหว่างกลูโคสและแลคเตท กลูโคสและแลคเตทจะถูกใช้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การใช้แลคเตทและกลูโคสร่วมกันจะเพิ่มอัตราการผลิตโพรพิโอเนทต่ออะซิเตท (P/A) แล้วยังเป็นการเพิ่มส่วนของธาตุคาร์บอนสำหรับที่จะนำไปใช้ในการผลิดชีวมวล ผลผลิตของโพรพิโอเนทต่ออะซิเตท (P/A) เท่ากับ 7.6 เมื่อใช้แลคเตทและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโพรพิโอเนทต่ออะซิเตท (P/A) เท่ากับ 1.34 เมื่อใช้แลคเตท อย่างเดียว และ 1.85 เมื่อใช้กลูโคสอย่างเดียว ปริมาณธาตุคาร์บอนที่เก็บเกี่ยวได้ในชีวมวลมีค่าเท่ากับ 0.09 เมื่อใช้กลูโคส 0.12 เมื่อใช้ แลคเตท และ 0.21 เมื่อใช้แลคเตทและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supaporn และ Yang (2005) ได้ทำการศึกษากระบวนการหมักกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* โดยใช้ กลูโคส ซอร์บิทอล กลูโคเนต และไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อแหล่งคาร์บอน พบว่าซอร์บิทอลให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสพบว่าการใช้ซอร์บิทอลสามารถเพิ่มอัตราการผลิต เพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิก เพิ่มความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกสุดท้าย และเพิ่มอัตราส่วนระหว่างโพรพิโอเนทต่ออะซิเตท นอกจากนี้ยังลดผลผลิตของอะซิเตทและซัคซิเนทอีกด้วย ส่วนการเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ได้แก่ ไซโลส และกลูโคส จะทำให้ได้ผลผลิตสุดท้าย และผลผลิตอะซิเตทเพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้อัตราส่วนระหว่างโพรพิโอเนทต่ออะซิเตทลดลง การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้ซอร์บิทอลเป็นสารตั้งต้นนั้น จุลินทรีย์สามารถนำสารอาหารไปใช้ได้ง่าย และกระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตมีราคาไม่แพง

2.6.2 **แหล่งไนโตรเจน**

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

Precott และ Dunn (1959) พบว่า แหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่ออัตราการหมัก และอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติก *Propionibacterium shermanii* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด สารสกัดยีสต์ เนื้อสัตว์ แต่สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

Agnes Colomban และคณะ (1993) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้แหล่งไนโตรเจนดังนี้ สารสกัดยีสต์ ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด โปรตีนเวย์เข้มข้น พบว่าเมื่อใช้สารสกัดยีสต์ผลิตกรดโพรพิโอนิก จะได้ปริมาณสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ

Shang-Tian Yang และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในเวย์ โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือสารสกัดยีสต์ และทริปทิเคส ซอย บรอท พบว่าจะได้ปริมาณกรดสูงสุดเมื่อใช้ สารสกัดยีสต์ และทริบทิเคส ซอย บรอท เติมลงไปในเวย์ปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 และโมโนโซเดียมกลูตาเมต วัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ เท่ากับ 170.8 ยูนิต และ 167.4 ยูนิต

2.6.3 **แหล่งเกลือแร่**

Gebgardt และคณะ (1970) ศึกษาพบว่าโคบอลท์มีอิทธิพลต่อการเจริญของเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโคบอลท์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเชื้อ *Propionibacterium shermanii* ร้อยละ 55-60 ของน้ำหนักแห้ง แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีโคบอลท์การเจริญของเชื้อจะลดลง

Quesada-Chanto และคณะ (1994) พบว่า เหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญของ *Propionibacterium shermanii* โดยเมื่อเติม $FeSO_4.2H_2O$ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารจะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเจริญ

2.6.4 **แหล่งวิตามิน**

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

2.6.5 **พีเอชของอาหาร**

Tittster (1940); Champagne และคณะ (1989); Crespo และคณะ (1990) และ Yang และคณะ (1994) พบว่า พีเอชที่เหมาะสมแก่การเจริญอยู่ระหว่าง 6.5-7.0

Prescott และ Dunn (1959) ได้ทำการทดลองพบว่า *Propionibacterium* sp. สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0

Seshadri และ Mukhopadhyay (1993) ได้ทำการศึกษาพบว่า ที่พีเอช 4.0 จุลินทรีย์ *Propionibacterium acidipropionici* ไม่สามารถเจริญได้ และถ้าพีเอชสูงกว่า 7.0 การเจริญจะลดลงอย่างรวดเร็ว

Vivian P. Lewis และ Shang-Tian Yang (1992) ได้มีการศึกษาผลของพีเอชที่ต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่า เมื่อใช้แลคเตทเป็นสารที่ใช้ในการหมัก ซึ่งมีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.0 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุด เมื่อเทียบกับแลคโตส และกลูโคส ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agnes และคณะ (1993) ทำการทดลองเรื่องผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยทำการศึกษาที่พีเอช 5.5 6.0 6.5 7.0 และ 7.5 เชื้อที่ได้ศึกษาได้แก่ *P. acidipropionici P. thoenii P. jensenii P. freudenreichii subsp. freudenreichii* และ*P. freudenreichii subsp. shermanii* พบว่า เชื้อ *P. acidipropionici* ที่ทำการหมักโดยใช้พีเอชเริ่มต้น 6.5 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

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

2.6.6 **อุณหภูมิในการเจริญ**

Cavin และคณะ (1985) ได้รายงานว่า โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส

Columban และคณะ (1993) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของ *Propionibacterium jensenii* คือ 30 องศาเซลเซียส

Chanpagne และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษาพบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิไปถึง 37 องศาเซลเซียส แต่อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติกจะลดลง

Hsu และ Yang (1991) กล่าวว่า ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกจะเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชมีค่าลดลง โดยจะเพิ่มขึ้นจาก 33% (w/w) ที่พีเอช 6.1-7.1 เป็น 63% (w/w) ที่พีเอช 4.5-5.0

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

จากการศึกษาของ Quesada-Chanto และคณะ (1994) พบว่าผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ*P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตวิตามินบี 12

Shang-Tian Yang และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 โดยใช้อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.7 **การให้อากาศ**

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

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

2.7 การใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

(ที่มา : http://www2.sat.psu.ac.th/centrallab/instru%20HPLC.htm)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) หรือที่นิยมเรียกว่า HPLC เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quatitative analysis) ที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง โดยสามารถใช้กับงานด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ในการวิเคราะห์ทางอาหาร ยา ยาฆ่าแมลง ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ฯลฯ สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณในระดับไมโครกรัม (μg) ในกรณีทั่วๆไป หรือละเอียดถึงพิโคกรัม (pg) เมื่อเลือกหน่วยตรวจวัดที่เหมาะสม

HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) สูบของเหลวหรือตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile Phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แล้วจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) สัญญาณที่ตรวจวัดได้ซึ่งอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ โดยสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) ประกอบด้วยพีค (peaks) ของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารผสม

2.7.1 ส่วนประกอบที่สำคัญของ HPLC

2.7.1.1 **Mobile phase reservoir**

- ใช้บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)
- แก้ว / stainless steel
- มีเครื่องกรองฝุ่น/สิ่งสกปรก

2.7.1.2 **Degasser**

- ขจัดฟองอากาศในสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1.3 **Pump**

- การแยกสารใน HPLC อาศัยการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก

- ทำให้เกิดความด้านทานการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน

ปั๊มที่ใช้ควรทำให้เกิดความดันได้สูงประมาณ 6000 psi (lbs/in^2) และมี อัตราการไหล (flow rate) อยู่ในระหว่าง 0.1-10 ml/min

2.7.1.4 **Sample injection system**

- manual (ใช้ microsyring)

- automatic sampler injector

2.7.1.5 **Column**

1. **Analytical column**

ความยาว 10-30 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-10 มม. วัสดุที่ใช้ทำภาชนะบรรจุ เช่น stainless steel , polyethylene , แก้ว และอื่น ๆ ส่วนPacking material ที่อยู่ภายใน ได้แก่ silica based , resins , gels , bonded phases

2. **Guard column**

นิยมใช้ต่อก่อนเข้า Analytical column เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของ Analytical column จะทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับตัวทำละลาย ส่วนประกอบของวัสดุบรรจุจะคล้ายคลึงกับ Analytical column แต่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าและราคาไม่แพงมากนัก

2.7.1.6 **Detector**

เครื่องตรวจวัดสำหรับ HPLC ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่

1. **Ultraviolet-Visible detector**: อาศัยการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง เช่น Diode array detector

2. **Fluorescence detector**: ใช้กับสารที่สามารถ fluorescence ได้

3. **Refractive index detectors (RI detector)**: ใช้วัดปริมาณสารใดก็ได้ที่มีค่าดรรชนีหักเห ต่างจากเฟสเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. **Electrochemical detectors**: ใช้วัดการสูญเสียหรือได้รับอิเล็คตรอนของสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์

5. **Conductivity detectors:** ใช้วัดความสามารถในการนำกระแสไฟฟ้า

2.7.2 การใช้ HPLC ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ

2.7.2.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ(Qualitative analysis)

ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมาได้ ทำโดยการเปรียบเทียบค่า Retention time (RT) กับสารมาตรฐาน โดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจะต้องทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน เช่น อุณหภูมิ ชนิดของคอลัมน์ ชนิดและอัตราการไหล (flow rate) ของเฟสเคลื่อนที่

ถ้าสารตัวอย่างและสารมาตรฐานมีค่า RT เท่ากัน เป็นสารเดียวกัน วิเคราะห์เพิ่มเติมโดยเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ และ / หรือ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่

2.7.2.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis)

หลังจาก HPLC แยกสารออกมาเป็นพีก (peak) ต่าง ๆ สามารถวัดปริมาณของสารในแต่ละพีกได้โดย

1. **วัดความสูงของพีก (Peak height)** เทียบกับความสูงของพีกของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ

2. **วัดพื้นที่พีก (Peak area)** เทียบกับพื้นที่ของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

3.1.1 อุปกรณ์เครื่องมือ

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท Shimadzu รุ่น UV-1601
2. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ของบริษัท Shimadzu
    - 2.1 UV-is detector รุ่น SPDAVF
    - 2.2 ปั๊ม รุ่น LC-10AC VP
    - 2.3 Degasser รุ่น DGU-12A
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ของบริษัท Hermle รุ่น Z 383K
4. เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น Hiclave HV-50
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius รุ่น BP 221 S
6. เครื่องวัดพีเอช ของบริษัท Cyberscan รุ่น EP 2000
7. ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท เมเจอร์ ไซแอนติฟิก โปรดักส์ จำกัด
8. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของบริษัท Shel lab รุ่น Model 2020
9. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของบริษัท Memmert รุ่น D 06062 Model 600
10. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Binder รุ่น Control E2

3.1.2 สารเคมี

1. สารสกัดยีสต์ (yeast extract)
2. ทริปทิเคส ซอย บรอท (trypticase soy broth)
3. แลคโตส (lactose)
4. อาหารสำเร็จรูป เอ็มอาร์เอส (MRS)
5. วุ้น (agar)
6. น้ำกลั่น
7. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)
8. แมงกานีสซัลเฟส ($MnSO_4$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)
10. กรดซัลฟูริก เข้มข้น (conc.H_2SO_4)
11. สารละลายฟีนอล 5%
12. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4)
13. กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4)
14. เมธทานอล

3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

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

3.2.1.1 การเก็บรักษาเชื้อในการวิจัย

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) เขี่ยเชื้อจำนวน 1 เข็ม แล้วจิ้ม (stab) ลงบนอาหารแข็ง (MRS agar) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นพันด้วยพาราฟิล์มปิดทับปากหลอดทดลองให้สนิท เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อหรือลงในอาหารใหม่ (Subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.2.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูป ลงในอาหารเหลว (MRS broth) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เก็บนำหมักไปค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษา มีองค์ประกอบดังนี้

สารสกัดยีสต์	10	กรัมต่อลิตร
ทริปทิเคส ซอย บรอท	5	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลแลคโตส	20	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Minor element ซึ่งประกอบด้วย

ไดโพแทสเซียสไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัมต่อลิตร

นำอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้ว ไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.2.3 **การศึกษาสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965** ในอาหารสังเคราะห์ ตามสูตรในข้อ 3.2.2

3.2.3.1 **ผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก**

เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 (ที่เตรียมจากข้อ 2.1.2) ลงในอาหารที่เตรียมไว้ตามสูตรอาหารในข้อ 2.2 ซึ่งได้ทำการปรับพีเอชของอาหารให้เท่ากับ 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 โดยปริมาณอาหาร รวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรฟลาสก์ (ปริมาตรอาหาร 190 มล. เติมหัวเชื้อ 10 มล. ลงในฟลาสก์ 250 มล.) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชม. ทำการวิเคราะห์ชีวมวลตามวิธี A.O.A.C. (2000) วัดน้ำหนักแห้ง ปริมาณกรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก กรดแลคติก (โดยเครื่อง HPLC) และน้ำตาลแลคโตส ตามวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois, 1956) และทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

3.2.3.2 **ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก**

เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 (ที่เตรียมจากข้อ 2.1.2) ลงในอาหารที่เตรียมไว้ตามสูตรอาหารในข้อ 2.2 ปรับพีเอชของอาหารที่เหมาะสมจากการทดลอง 2.4.1 โดยปริมาณอาหาร รวมกับหัวเชื้อคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาตรฟลาสก์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 30 35 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชม. ทำการวิเคราะห์ชีวมวลตามวิธี A.O.A.C. (2000) วัดน้ำหนักแห้ง ปริมาณกรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก กรดแลคติก (โดยเครื่อง HPLCและน้ำตาลแลคโตส ตามวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois, 1956) และทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

3.2.4 การวิเคราะห์ผล

3.2.4.1 **วัดชีวมวลตามวิธี AOAC (2000)** โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.2 **วัดชีวมวลโดยวัดน้ำหนักแห้ง** โดยนำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง นำใส่โถดูดความชื้นทิ้งให้เย็นวัดน้ำหนักของชีวมวลที่ได้

3.2.4.3 **การวัดกรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก และกรดแลคติก วัดด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)** นำน้ำหมักไปกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตรใช้ Inertsil C8-3 column และใช้ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส (ตรวจหาจากส่วนใส ของตัวอย่างจากการปั่นเหวี่ยงจากข้อ 3.2.4.2)

3.2.4.4 **การวัดปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ลดลง ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois, 1956)**

3.2.4.5 **การวิเคราะห์ผลทางสถิติ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 12.0 for Window**

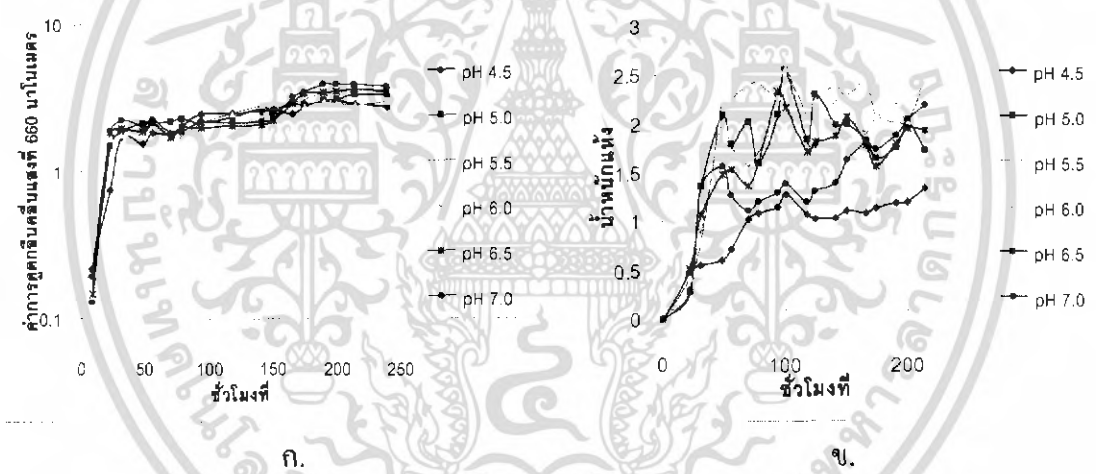
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

4.1.1 เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium Acidipropionicii* ATCC 4965 โดยใช้อาหารสังเคราะห์ ทำการหมักที่สภาวะนิ่ง เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชต่างๆ พบว่า กราฟการเจริญของเชื้อในแต่ละพีเอชมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งผลของค่าการดูดกลืนแสง (OD) และผลน้ำหนักแห้ง โดยเมื่อเชื้อมีการเจริญสูงสุด จะมีช่วงที่การเจริญเติบโตสูงสุด (maximum log) ณ ชั่วโมงที่ 70 และมีการเจริญเติบโตไปเรื่อยๆ ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) จนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 240 (รูปที่ 4-1)



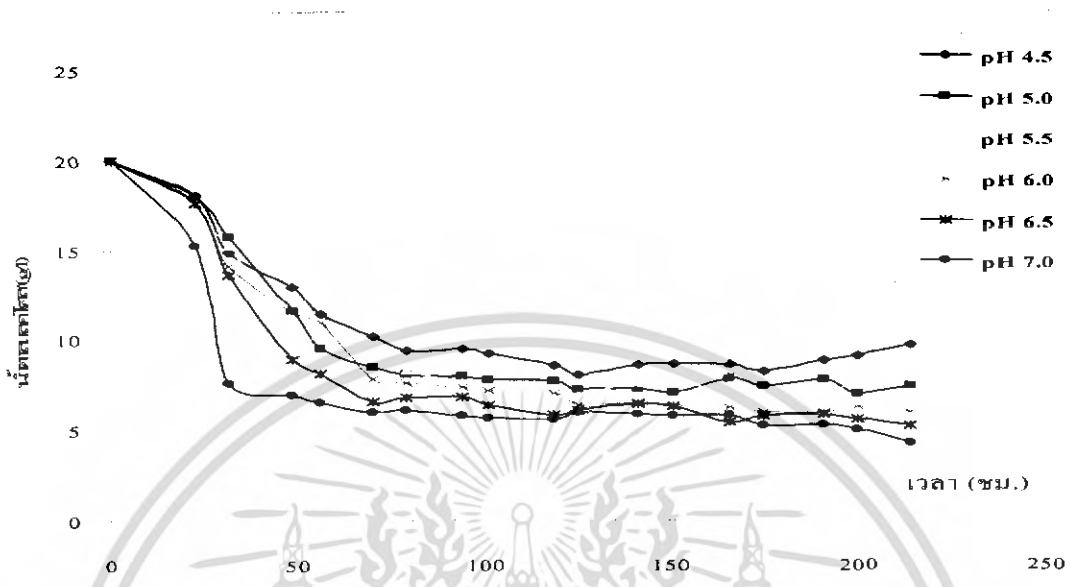
ก. ข.

รูปที่ 4-1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช
ก. ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
ข. ผลของน้ำหนักแห้ง

ส่วนค่าความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้เป็นกรดต่างๆนั้น มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก (รูปที่ 4-2) จากกราฟจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลแลคโตสมีค่าลดลงสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 70 จากนั้นจึงค่อยๆลดลง จนกระทั่งเริ่มคงที่ในช่วงท้ายของการหมัก แสดงว่า เชื้อมีการนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ในการเจริญเติบโตในช่วงแรก ก่อนที่จะทำการสังเคราะห์ออกมาเป็นกรดชนิดต่างๆ เมื่อทำการทดลองไปจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า การทดลองที่พีเอช 5.0 นั้น ปริมาณของน้ำตาลแลคโตสลดลงเหลือ 7.42 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 62.9 ของสารตั้งต้น



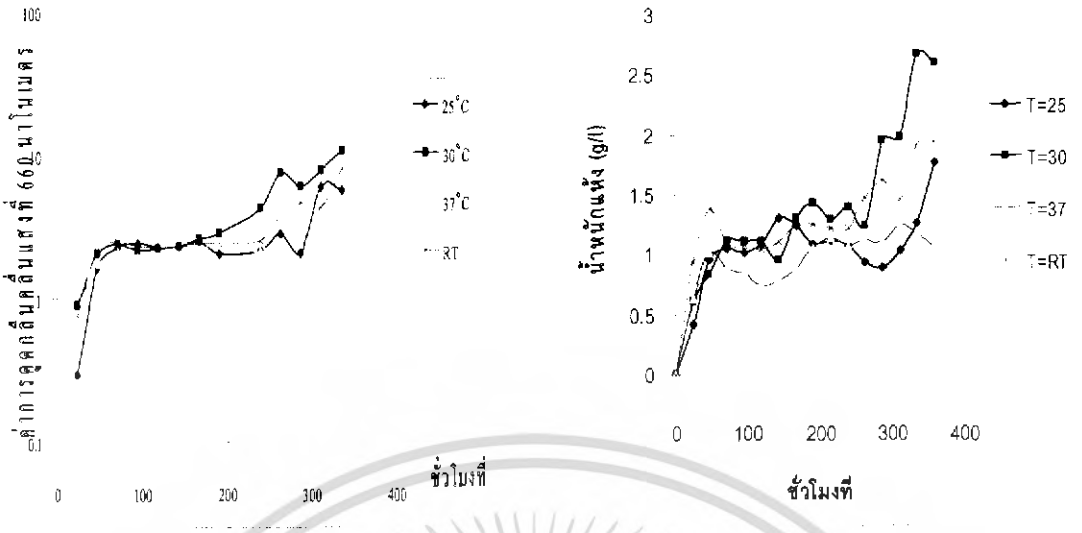
รูปที่ 4-2 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช

4.1.2 เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิการบ่ม

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิการบ่มต่างๆ พบว่า กราฟการเจริญของเชื้อในแต่ละอุณหภูมินั้นมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งผลของค่าการดูดกลืนแสง และผลน้ำหนักแห้ง โดยเชื้อจะมีช่วงการเจริญสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งใกล้เคียงกับผลของการเจริญเติบโตเมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชต่างๆ และมีการเจริญเติบโตไปเรื่อยๆ จนกระทั่งเสร็จสิ้นการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 336 (รูปที่ 4-3)

สำหรับการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการวัดปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น จากกราฟจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลแลคโตสมีค่าลดลงสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 96 จากนั้นจึงค่อยๆลดลง จนกระทั่งเริ่มคงที่ในช่วงท้ายของการหมัก แสดงว่า เชื้อมีการนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ในการเจริญเติบโตในช่วงแรก เมื่อทำการทดลองไปจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่า การทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนั้น ปริมาณของน้ำตาลแลคโตสลดลงเหลือ 2.65 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไปร้อยละ 86.75 ของสารตั้งต้น แสดงว่า เชื้อสามารถใช้สารตั้งต้นในกระบวนการหมักได้เป็นอย่างดี (รูปที่ 4-4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



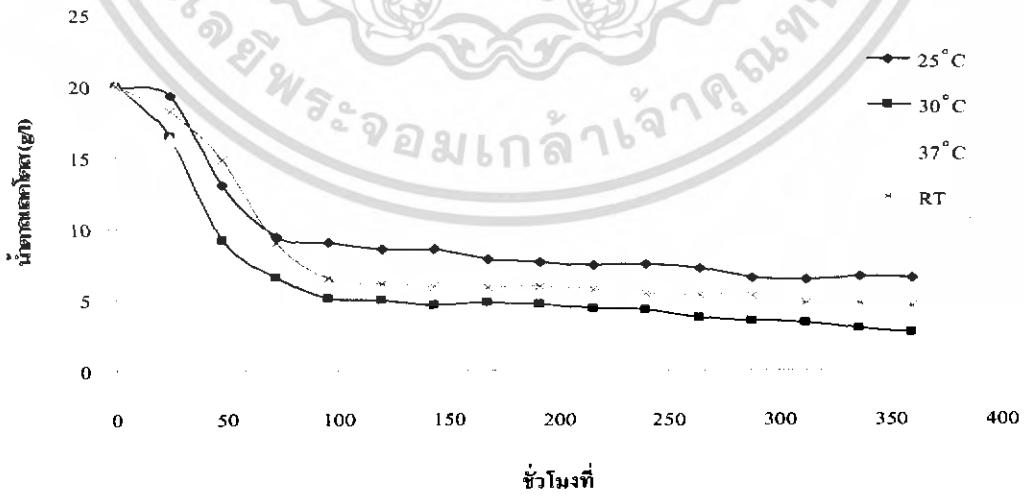
ก. ข.

รูปที่ 4-3 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ

ก. ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

ข. ผลของน้ำหนักแห้ง

โดยที่จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ทั้งจากการทดลองเมื่อศึกษาผลของพีเอช และการทดลองเมื่อศึกษาผลของอุณหภูมินั้น ข้อมูลที่ได้จาก ผลของค่าการดูดกลืนแสง ผลของน้ำหนักแห้ง และผลจากการวัดปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป ได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน



รูปที่ 4-4 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ

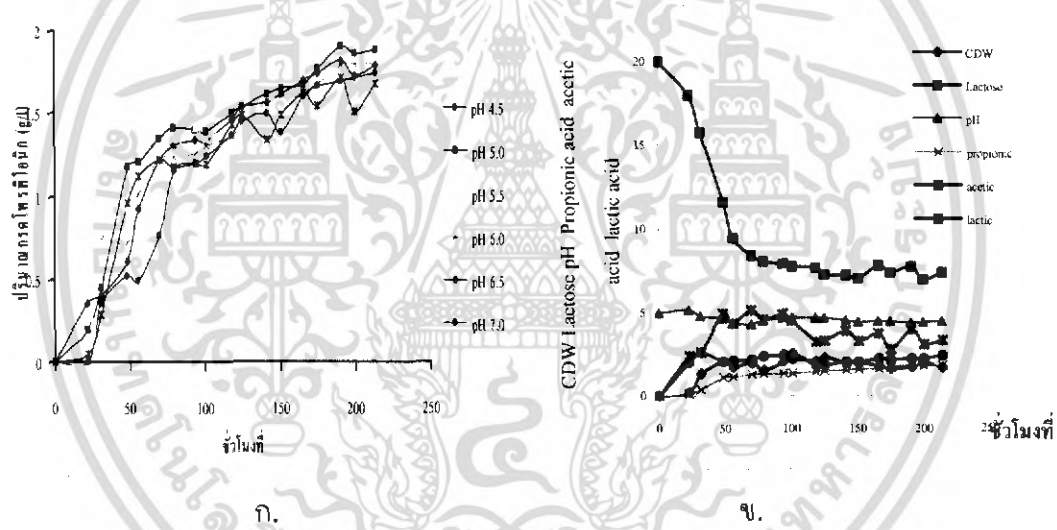
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาสภาวะต่างๆที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักโดยทำการหาค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionicii* ATCC 4965 ในอาหารสังเคราะห์ แล้วทำการปรับสภาวะต่างๆที่ใช้ในการศึกษา ได้ผลการทดลองดังนี้

4.2.1 ผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

ทำการหมักโดยใช้อาหารสังเคราะห์ เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 และทำการปรับพีเอชของอาหารให้เท่ากับ 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลซียส แล้วทำการเก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง จากผลการวิเคราะห์พบว่า ที่พีเอช 5.0 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด คือ 1.902 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 191 รองลงมา คือที่พีเอช 4.5 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 1.816 กรัมต่อลิตรดังรูปที่ 4-5 ก.



ก. ข.

รูปที่ 4-5 แสดงปริมาณผลผลิตเมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช

ก. ปริมาณผลผลิตกรดโพรพิโอนิกที่พีเอชต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่สภาวะความดัน 100 กิโลฟอร์ส (Kgf.) อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช3) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

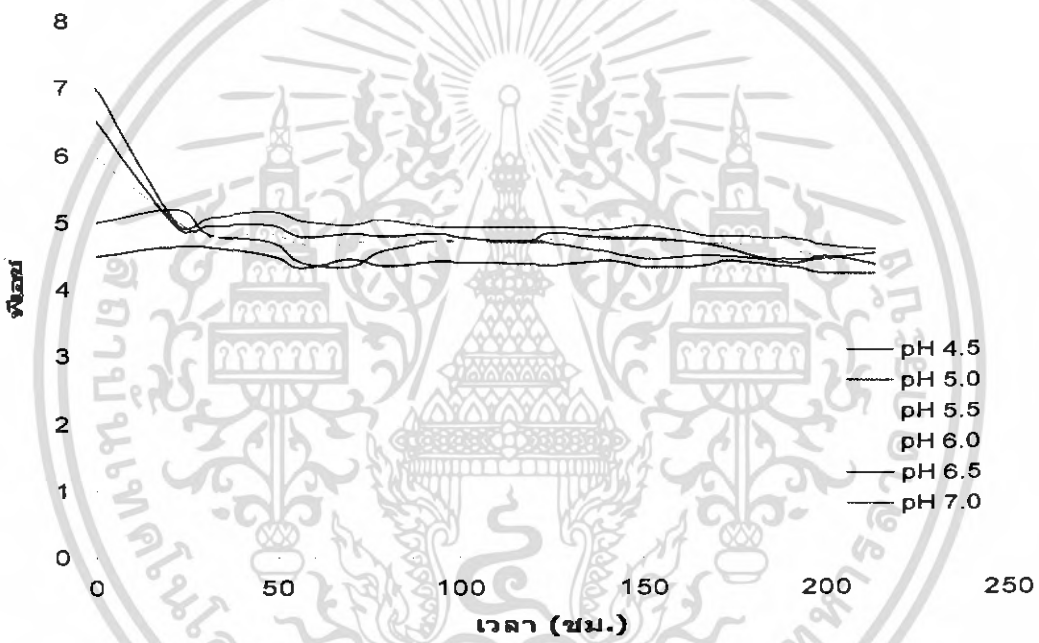
ข. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช กับปริมาณผลผลิตกรดต่างๆ เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชที่ค่าพีเอช 5.0

ในกระบวนการหมักของแบคทีเรียโพรพิโอนิกนั้น จะให้ผลผลิตออกมาเป็นกรดอินทรีย์ผสม ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆที่เชื้อสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ ดังรูปที่ 4-5 ข.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อสังเกตจากกราฟการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก จะพบว่า ที่สภาวะพีเอช 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และที่สภาวะพีเอช 4.5 และ 5.0 มีค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย จนถึง ณ ชั่วโมงที่ 70 ค่าพีเอชของอาหาร จึงเริ่มมีค่าคงที่ ที่พีเอชประมาณ 4.3 ถึง 4.9 โดยมีค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่สอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตของเชื้อ

สำหรับความสามารถในการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อชนิดนี้ เมื่อใช้สภาวะที่พีเอช 5.0 จะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 191 มีค่าอัตราการผลิต เท่ากับ 0.0110 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าอัตราการผลิตที่สูงกว่าที่สภาวะพีเอชอื่นๆ และมีค่าผลได้ของผลผลิตเท่ากับ 0.1296 กรัมต่อกรัมสับสเตรท



รูปที่4-6 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช

จากผลการทดลองที่ได้ เมื่อนำไปเปรียบเทียบค่าทางสถิติแล้วพบว่า ที่ค่าพีเอช 5.0 5.5 และ 6.0 นั้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ได้มีรายงานของ Sheng – Tsiung Hsu และ Shang – Tian Yang (1991) กล่าวไว้ว่า ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกจะเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชมีค่าลดลง โดยจะเพิ่มขึ้นร้อยละ 33 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่พีเอช 6.1 – 7.1 เป็นร้อยละ 63 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่พีเอช 4.5 – 5.0 ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่พีเอช 5.0 มาใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4-1 แสดงผลการทดลอง พีเอชของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ไป ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลผลิต ของกระบวนการหมัก เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอชต่างๆ

พีเอช ของ อาหาร	ชั่วโมงการหมัก (hr.)	พีเอช	น้ำหนักแห้ง (g/l)	น้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป (g/l)	% น้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (g/l)	อัตราการผลิต ($g/l\,h^{-1}$)	ผลได้ ของ ผลผลิต (Yp/s)
pH 4.5	191	4.31	1.200	11.13	55.65	1.816 a	0.0105	0.1373
pH 5.0	191	4.41	1.770	12.23	61.15	1.902 bc	0.0110	0.1296
pH 5.5	200	4.54	2.032	12.53	62.65	1.661 bcd	0.0098	0.1149
pH 6.0	200	4.44	2.000	13.70	68.50	1.795 bcd	0.0104	0.1135
pH 6.5	191	4.75	1.810	14.17	70.85	1.710 cd	0.0098	0.1009
pH 7.0	191	5.25	1.890	14.75	73.75	1.690 cd	0.0097	0.0881

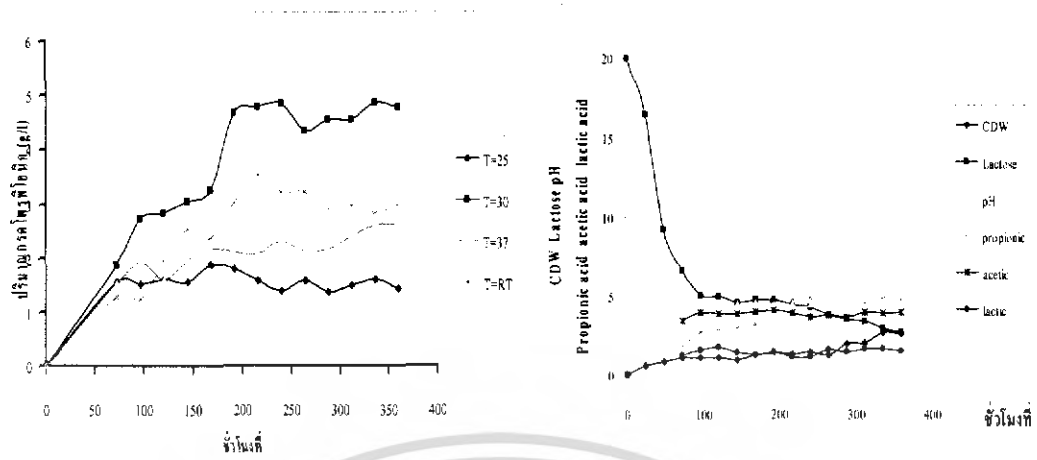
หมายเหตุ : ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

4.2.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

เมื่อทราบสภาวะของพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกคือที่พีเอช 5.0 แล้ว จึงทำการทดลอง โดยทำการเปลี่ยนสภาวะของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเป็นที่ 25 30 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง จากผลการวิเคราะห์ พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ใช้ในการบ่ม ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุด คือ 4.840 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 216 รองลงมา คือที่อุณหภูมิห้อง ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 3.530 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4-7 ก.

ส่วนปริมาณผลผลิตของกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆที่เชื้อสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ เช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติก แสดงดังรูปภาพที่ 4-7 ข.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 4-7 แสดงปริมาณผลผลิตเมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ

ก. ปริมาณผลผลิตกรดโพรพิโอนิกที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่สภาวะความดัน 100 กิโลฟอร์ส (Kgf.) อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พี-เอช3) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

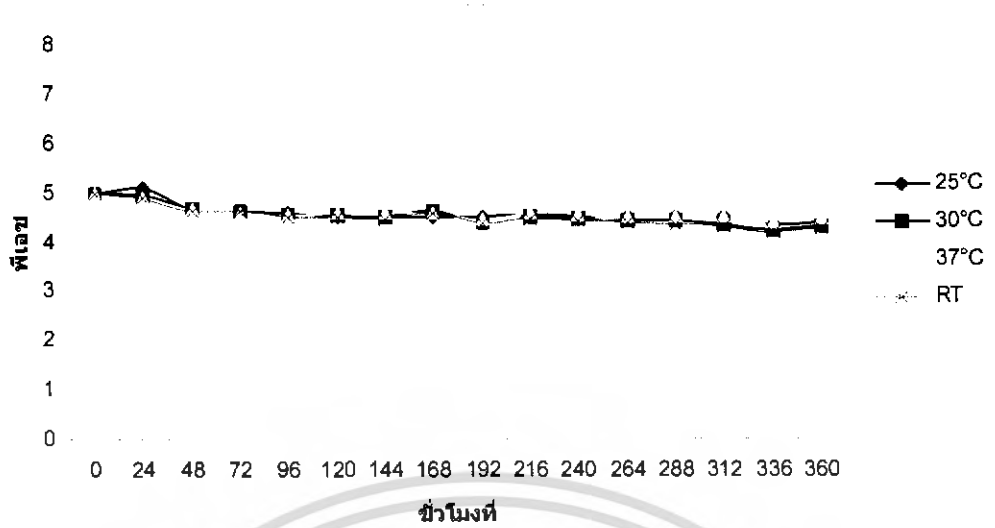
ข. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช กับปริมาณผลผลิตกรดต่างๆ เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เมื่อสังเกตจากกราฟการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อให้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.0 จะพบว่า ทุกสภาวะอุณหภูมิการบ่ม จะมีค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงในช่วงแรก โดยมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และค่อยๆลดลง จนถึง ณ ชั่วโมงที่ 70 ค่าพีเอชของอาหารจึงเริ่มมีค่าคงที่ ที่พีเอชประมาณ 4.2 ถึง 4.5โดยมีค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตของเชื้อ

สำหรับความสามารถในการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อชนิดนี้ เมื่อใช้สภาวะที่พีเอช 5.0 และที่อุณหภูมิการบ่ม 30 องศาเซลเซียส จะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 216 มีค่าอัตราการผลิต เท่ากับ 0.0169 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าอัตราการผลิตที่สูงกว่าที่สภาวะอุณหภูมิการบ่มอื่นๆ และมีค่าผลได้ของผลผลิต เท่ากับ 0.2516 กรัมต่อกรัมสับสเตรท

จากผลการทดลองที่ได้เมื่อนำไปเปรียบเทียบค่าทางสถิติแล้ว พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสนั้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ได้มีรายงานของ Shang –Tain Yang และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 โดยใช้อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่4-8 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ

ตารางที่ 4-2 แสดงผลการทดลอง พีเอชของอาหาร น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ใช้ไป ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ อัตราการผลิต และผลได้ของผลผลิต ของกระบวนการหมัก เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิการบ่มต่างๆ

อุณหภูมิการบ่ม	ชั่วโมงการหมัก (hr.)	พีเอช	น้ำหนักแห้ง (g/l)	น้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป (g/l)	% น้ำตาลแลคโตสที่ถูกใช้ไป	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (g/l)	อัตราการผลิต ($g/l\,h^{-1}$)	ผลได้ของผลผลิต (g/gsub.)
25°C	168	4.52	1.240	12.14	60.70	1.87 a	0.0061	0.1249
30°C	216	4.50	1.290	15.60	78.00	4.84 b	0.0169	0.2516
37°C	336	4.40	1.175	14.54	72.70	2.58 b	0.0088	0.1510
อุณหภูมิห้อง	216	4.47	1.220	14.33	71.65	3.53 a	0.0111	0.1850

หมายเหตุ : ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพนั้น มีข้อดีอยู่หลายประการ นอกจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จะไม่มีความเป็นพิษสามารถนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารได้แล้ว ยังมีค่าใช้จ่ายในการผลิตที่ต่ำกว่าการผลิตด้วยกระบวนการทางเคมี สำหรับจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณมากที่ใช้สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ คือ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ซึ่งจะให้ผลผลิตออกมาในรูปของกรดผสม โดยมีกรดที่สำคัญ ได้แก่ กรดโพรพิโอนิก กรดแลคติก กรดอะซิติก เป็นต้น จึงได้นำมาใช้ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อชนิดนี้ต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่ง แล้วศึกษาผลของพีเอช และผลของอุณหภูมิการบ่มต่างๆ

โดยที่จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ทั้งจากการทดลองเมื่อศึกษาผลของพีเอช และการทดลองเมื่อศึกษาผลของอุณหภูมินั้น ข้อมูลที่ได้จาก ผลของค่าการดูดกลืนแสง ผลของน้ำหนักแห้ง และผลจากการวัดปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป ได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน คือมีช่วงการเจริญสูงสุด อยู่ที่ 72 ชั่วโมง และสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้สูงสุดถึงร้อยละ 86.75 ของสารตั้งต้น

และจากการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกด้วยเครื่อง HPLC พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุด คือ 4.840 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 216 ของระยะเวลาการหมัก โดยมีค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.0169 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของผลผลิตมีค่าเท่ากับ 0.2516 กรัมต่อกรัมสับสเตรท

สำหรับผลผลิตการหมักที่ดีนั้น ควรใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น แต่มีช่วงเวลาการผลิตยิ่งนานยิ่งดีเพื่อจะได้มีช่วงระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ยาวนาน และเชื้อที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักสามารถใช้สารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตให้ได้มากที่สุด โดยมีผลผลิตอื่นๆ น้อยที่สุด รวมถึงสภาวะการหมักซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มผลผลิตเช่นเดียวกัน เช่นในการทดลองครั้งนี้ควรทำการหมักที่สภาวะนิ่ง ให้อยู่ในสภาพไร้อากาศมากที่สุด เพื่อให้มีสภาวะการหมักที่เหมาะสมต่อเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ให้สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกให้ได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
เอกสารอ้างอิง

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

สมใจ ภัสสัตบางกูร. 2527. *การศึกษาวิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์และการนำไปปรับใช้ในการผลิตสารเมตาบอไลท์จากแบคทีเรียโปรปิโอนิก*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ตารางการใช้วัตถุเจือปนอาหาร. [Online]. Available: http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/ntf/DirtyFood3Attach.html

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

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

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

Cavin, J.F., Saint, C. and Divice, C. 1985. Continuous product of emmental cheese flavours and propionic acid starters by immobilized cell of a propionic acid bacterium. *Biotechnol. Lett.* 7 : 821 – 826.

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

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

Crespo JPSG . 1990. Modelling of immobilized cell reaction for propionic and production. *Biotechnol Bioeng*. 36 : 705 – 716.

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

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

Helena, L., Hans, J. and Johan, S. 2004. Antifungal effect of dairy propionabacteria-contribution of organic acid. *International J. of Food Microbiol.*

Hsu, S.T. and Yang, S.T. 1991. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acidipropionici :effect of pH. *Biotechnol. and Bioeng.* 38 : 571-578.

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

Menon, A. and Shemin, D. 1967. Concurrent decrease of enzymic activites concerned with the synthesis of coenzyme B_{12} and of propionic acid in Propionibacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 121 : 304 – 310.

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

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

Playne, M.J. 1985. Propionic and butyric acids. *In M. Moo-Young (ed.), Comprehemsive biotechnology*. Pergamon Press, Oxford. 3 : 733 – 380.

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

Quesada-Chanto, A., Afschar, AS., and Wagner, F. 1994. Microbial production of propionic acid and vitamin B_{12} using molasses or sugar. *Appl Microbiol Biotechnol.* 41 : 378-383.

Seshadri, N. and Mukhopadhyan, S.N. 1993. Influenece of environmental parameters on propionic acid upstream bioprocessing by *Propionibacterium acidopropionici*. *J. Biotech.* 29 : 321 – 328.

Shaposhrikov, V.N. and Vorob'eva, L.I. 1963. Development of propionic acid bacterium and synthetic and natural media. *Microbiology.* 32 : 99 – 104.

Supaporn Suwannakham and Shang-Tian Yang. 2005. Effect of Carbon Sources on Propionic Acid Fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*. [Online]. Available: http://aiche.confex.com/aiche/2005/techprogram/P14371.HTM

Thompson, TE., Conrad, R. and Zeikus, JG. 1984. Regulation of carbon and electron flow in *Propionispira arboris*: Physiological function of hydrogenase and its role in homopropionate fermentation. *FEMS Microbiol Lett.* 22 : 265 – 271.

Tittsler, R.P. 1940. The fluence of hydrogen ion concentration up on the growth of *Propionibacterium* spp. *J. Bacteriol.* 39 : 95 – 96.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

Yang, S. and Huang, Y. 1995. A novel recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose. *Biotechnol. Bioeng.* 45 : 379 – 380.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การใช้วัตถุเจือปนอาหาร

แนบท้ายประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย

ลงวันที่ 3 พฤศจิกายน 2547

ตารางที่ 7-1 ตารางการใช้วัตถุเจือปนอาหาร

ชื่อและกลุ่มหน้าที่ในอาหาร	ชนิดของอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่ให้ใช้ได้ (มก.ต่อ 1 กก.)
กรดโปรปิโอนิก ชื่ออื่น : - Propionic acid - Propanoic acid กลุ่มหน้าที่ : - กันรา	น้ำตาลปีบ	- 2,000
	โพรเซสชีส	- 3,000
	ผลิตภัณฑ์นม ยกเว้น นมจืดชนิดเหลว นมเปรี้ยวไม่ปรุงแต่ง ครีมพาสเจอร์ไรส์ ครีมสเตอริไลส์ ครีมยูเอชที วิปปิ้งครีม และครีมไขมันต่ำ ยกเว้นโพรเซสชีส	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ประเภทน้ำผสมน้ำมัน (อิมัลชั่น) เช่น เนยเทียม มิ นารีน รวมทั้งขนมหวานทำนองนี้	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ไอศกรีม	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลไม้ที่ผ่านกรรมวิธี เช่น ผลไม้แห้ง ผลไม้ผ่านกรรมวิธีแคนนิ่งขนมหวานจากผลไม้ เป็นต้น	- ปริมาณที่เหมาะสม
	พืชผัก สาหร่าย ถั่วเปลือกแข็งและเมล็ดพืชต่าง ๆ ที่ผ่านกรรมวิธี เช่น พืชผักแห้ง พืชผักที่ผ่านกรรมวิธีแคนนิ่ง เป็นต้น ยกเว้นกรรมวิธีเยือกแข็งและหมักดอง	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เช่น ลูกกวาด ลูกอม ช็อกโกแลต หมากฝรั่ง เป็นต้น	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ธัญพืชอาหารเช้า ขนมหวานจากธัญพืช แป้งสำหรับชุบอาหารทอด และผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง	- ปริมาณที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เช่น ขนมปัง ขนมเค้ก คุกกี้ ขนมพาย เป็นต้น	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์เนื้อ ยกเว้นเนื้อสด	- ปริมาณที่เหมาะสม
	สัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ ยกเว้นสัตว์น้ำสดและสัตว์น้ำเยือกแข็ง	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ไข่ ยกเว้นไข่สด ไข่เหลว และไข่เยือกแข็ง	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ประเภทซอส ซุป สลัด และผลิตภัณฑ์โปรตีนสกัด	- ปริมาณที่เหมาะสม
	อาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร	- ปริมาณที่เหมาะสม
	เครื่องดื่ม ยกเว้นน้ำผักผลไม้ น้ำแร่ธรรมชาติ ชา กาแฟ เครื่องดื่มสมุนไพรชนิดชงและเครื่องดื่มจากธัญพืช	- ปริมาณที่เหมาะสม
แคลเซียมโปรปิโอเนต ชื่ออื่น : - Calcium propionate - Calcium propanoate กลุ่มหน้าที่ : - กันรา	โพรเซสชีส	- 3,000
	ผลิตภัณฑ์นม ยกเว้น นมจืดชนิดเหลว นมเปรี้ยวไม่ปรุงแต่ง ครีมพาสเจอร์ไรส์ ครีมสเตอริไลส์ ครีมยูเอชที วิปปิ้งครีม ครีมไขมันต่ำ และโพรเซสชีส	- ปริมาณตามความเหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ประเภทน้ำผสมน้ำมัน (อิมัลชั่น) เช่น เนยเทียม มินารีน รวมทั้งขนมหวานทำนองนี้	- ปริมาณตามความเหมาะสม
	ไอศกรีม	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลไม้ที่ผ่านกรรมวิธี เช่น ผลไม้แห้ง ผลไม้ผ่านกรรมวิธีแคนนิ่งขนมหวานจากผลไม้ เป็นต้น	- ปริมาณที่เหมาะสม
	พืชผัก สาหร่าย ถั่วเปลือกแข็งและเมล็ดพืชต่าง ๆ ที่ผ่านกรรมวิธี เช่น พืชผักแห้ง พืชผักที่ผ่านกรรมวิธีแคนนิ่ง เป็นต้น ยกเว้นกรรมวิธีเยือกแข็งและหมักดอง	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เช่น ลูกกวาด ลูกอม ช็อกโกแลต หมากฝรั่ง เป็นต้น	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ธัญพืชอาหารเช้า ขนมหวานจากธัญพืช แป้งสำหรับชุบอาหารทอด และผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เช่น ขนมปัง ขนมเค้ก คุกกี้ ขนมพาย เป็นต้น	- ปริมาณที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	ผลิตภัณฑ์เนื้อ ยกเว้นเนื้อสด	- ปริมาณที่เหมาะสม
	สัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ ยกเว้นสัตว์น้ำสดและสัตว์น้ำเยือกแข็ง	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ไข่ ยกเว้นไข่สด ไข่เหลว และไข่เยือกแข็ง	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ประเภทซอส ซุป สลัด และผลิตภัณฑ์โปรตีนสกัด	- ปริมาณที่เหมาะสม
	อาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร	- ปริมาณที่เหมาะสม
	เครื่องดื่ม ยกเว้นน้ำผักผลไม้ น้ำแร่ธรรมชาติ ชา กาแฟ เครื่องดื่มสมุนไพรชนิดชงและเครื่องดื่มจากธัญพืช	- ปริมาณที่เหมาะสม
โซเดียมโปรปิโอเนต ชื่ออื่น : - Sodium propionate - Sodium propanoate กลุ่มหน้าที่ : - กันเสีย - กันรา	ผลิตภัณฑ์นม ยกเว้น นมจืดชนิดเหลว นมเปรี้ยวไม่ปรุงแต่ง ครีมพาสเจอร์ไรส์ ครีมสเตอริไลส์ ครีมยูเอชที วิปปิ้งครีม และครีมไขมันต่ำ	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ประเภทน้ำผสมน้ำมัน (อิมัลชั่น) เช่น เนยเทียม มินารีน รวมทั้งขนมหวานทำนองนี้	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ไอศกรีม	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลไม้ที่ผ่านกรรมวิธี เช่น ผลไม้แห้ง ผลไม้ผ่านกรรมวิธีแคนนิ่ง ขนมหวานจากผลไม้ เป็นต้น ยกเว้นที่มีข้อกำหนดไว้เป็นการเฉพาะ	- ปริมาณที่เหมาะสม
	พืชผัก สาหร่าย ถั่วเปลือกแข็งและเมล็ดพืชต่าง ๆ ที่ผ่านกรรมวิธี เช่น พืชผักแห้ง พืชผักที่ผ่านกรรมวิธีแคนนิ่ง เป็นต้น ยกเว้นกรรมวิธีเยือกแข็งและหมักดอง	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เช่น ลูกกวาด ลูกอม ช็อกโกแลต หมากฝรั่ง เป็นต้น	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ธัญพืชอาหารเช้า ขนมหวานจากธัญพืช แป้งสำหรับชุบอาหารทอด และผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เช่น ขนมปัง ขนมเค้ก คุกกี้ ขนมพาย เป็นต้น	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์เนื้อ ยกเว้นเนื้อสด	- ปริมาณที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	สัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ ยกเว้นสัตว์น้ำสดและสัตว์น้ำเยือกแข็ง	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ไข่ ยกเว้นไข่สด ไข่เหลว และไข่เยือกแข็ง	- ปริมาณที่เหมาะสม
	ผลิตภัณฑ์ประเภทซอส ซุป สลัด และผลิตภัณฑ์โปรตีนสกัด	- ปริมาณที่เหมาะสม
	อาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร	- ปริมาณที่เหมาะสม
	เครื่องดื่ม ยกเว้นน้ำผักผลไม้ น้ำแร่ธรรมชาติ ชา กาแฟ เครื่องดื่มสมุนไพรชนิดชงและเครื่องดื่มจากธัญพืช	- ปริมาณที่เหมาะสม

หมายเหตุ : ปริมาณที่เหมาะสม หมายถึง ปริมาณที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดผลที่ต้องการ ภายใต้กระบวนการผลิตที่ดี (GMP)

ที่มา : http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/ntf/DirtyFood3Attach.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1. อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

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

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ด้วย 1.0 นอร์มัลกรดไฮโดรคลอริก และ 1.0 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

สารสกัดเนื้อ(meat extract)	10	กรัม
สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตด (CH_3COONa)	5	กรัม
แอมโมเนียมอะซิเตด (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเครต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

วิธีการ

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ด้วย 1.0 นอร์มัลกรดไฮโดรคลอริก และ 1.0 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาตั้งตรง ทิ้งให้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์น้ำตาลแลคโตส

วิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dobois, 1956)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. คิวเวตแก้ว
3. ปิเปต

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (Reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)
2. ฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายแลคโตสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งแลคโตสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแลคโตสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 7-2

ตารางที่ 7-2 การเจือจางสารละลายแลคโตสที่ระดับความเจือจางต่างๆ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

หลอดที่	สารละลายแลคโตส (400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารลายแลคโตสมาตรฐาน (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

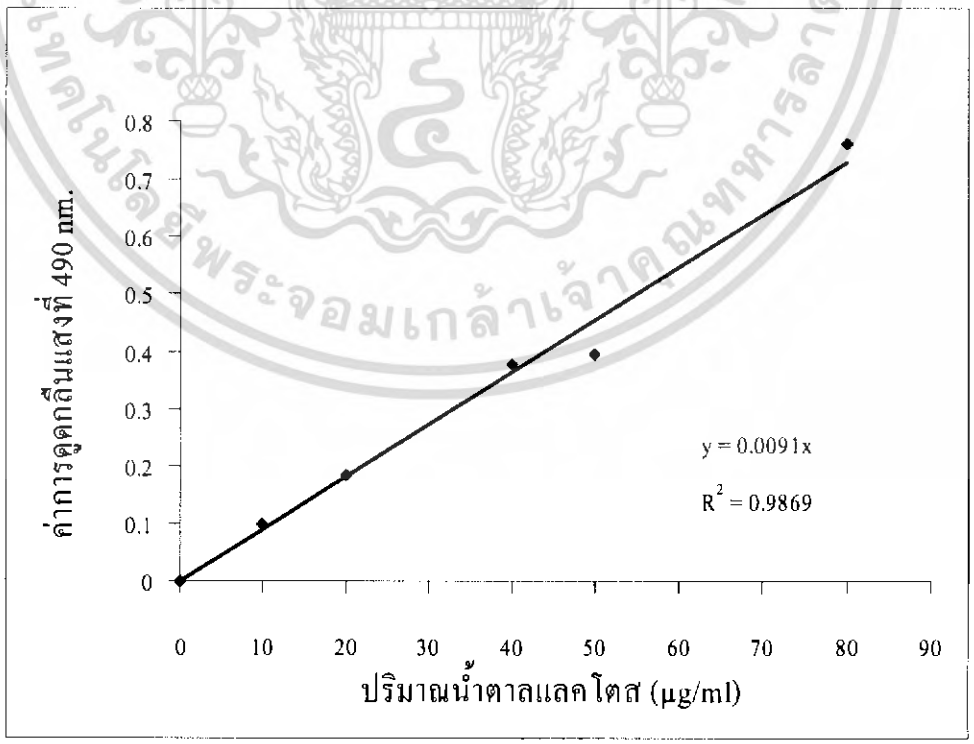
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. ปีเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายแลคโตสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5 เปอร์เซนต์ลงไป 1 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็วโดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าค่อยๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของแลคโตสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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

กราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตส



รูปที่ 7-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.
การใช้เครื่อง HPLC

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 Flow 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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

Rheodyne 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**)

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ขั้นตอนการปิดเครื่อง

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

Note : กรณีที่จะหยุดใช้ เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)

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

Note

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

Ex การล้างเครื่อง โดยมี mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็น buffer solution และ mobile phase ที่เก็บ column เป็น 70% MeOH

Buffer solution 30 นาที

↓

น้ำกลั่น **HPLC** 30นาที

↓

70% MeOH 30 นาที

↓

ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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**

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-save]

เลือก S เมื่อต้องการตั้งชื่อ File สำหรับ save จะปรากฏ

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 อัตโนมัติถ้าต้องการแก้ไขให้กลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis file
6. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณและให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START

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

การเตรียม Mobile phase

Mobile phase ที่ใช้ 20 mM potassium phosphate buffer: pH 3.0

โดยเตรียมสารเคมีดังนี้

A: 0.1 M KH_2PO_4 13.7 g/l เก็บในขวดสีชา

B: 0.5 M H_3PO_4 3.4 ml/100ml เก็บในขวดสีชา

คำนวณปริมาณสารละลาย A จากสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

Mobile phase (เตรียมเมื่อใช้) เตรียมจากสารละลาย A ปริมาตรตามที่คำนวณได้ เติมน้ำกลั่น DI ปรับพีเอชด้วยสารละลาย B และปรับปริมาตรตามที่ต้องการ นำไปกรองด้วย filter membrane และทำการ degassed ด้วยเครื่อง Sonicated ประมาณ 10-15 นาทีก่อนใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

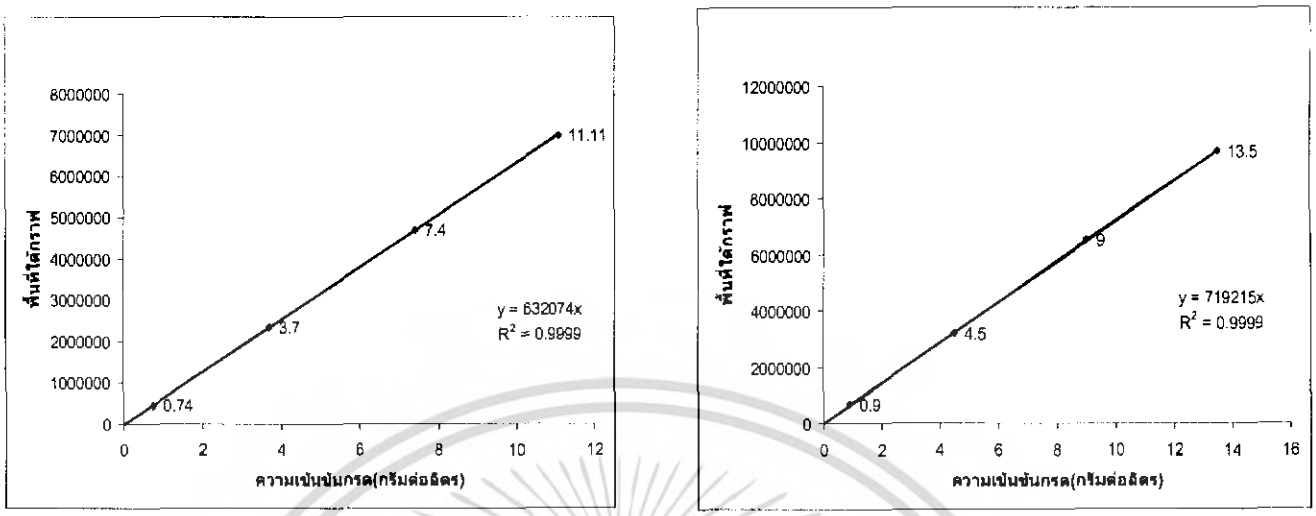
ข้อมูลผลการทดลอง

1. ลักษณะพีคของกรดแต่ละชนิด ที่ตรวจสอบได้จากเครื่อง HPLC

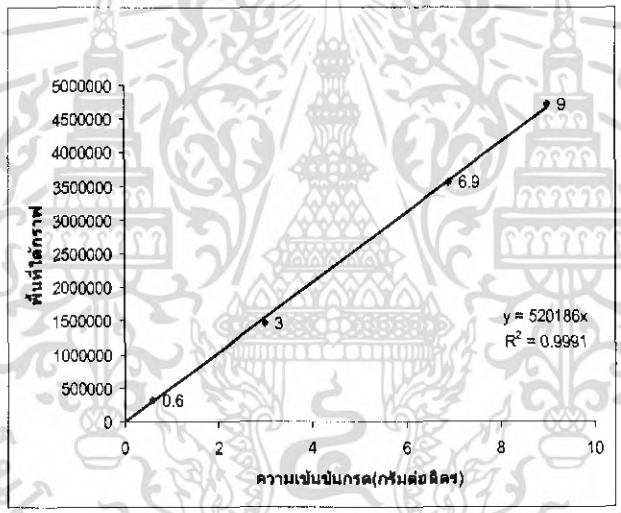
รูปที่ 7-2 แสดงพีคของกรดมาตรฐานแต่ละชนิด ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยที่ กรดแลคติก มีค่า retention time อยู่ประมาณนาทีที่ 6 กรดอะซิติก มีค่า retention time อยู่ประมาณนาทีที่ 7 และกรดโพรพิโอนิก มีค่า retention time อยู่ประมาณนาทีที่ 18 เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การหาค่ากราฟมาตรฐานของกรดต่างๆ



ก. ข.



ค.

รูปที่ 7-3 แสดงกราฟมาตรฐานกรดชนิดต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ก. กราฟมาตรฐานกรดโพรพิโอนิก

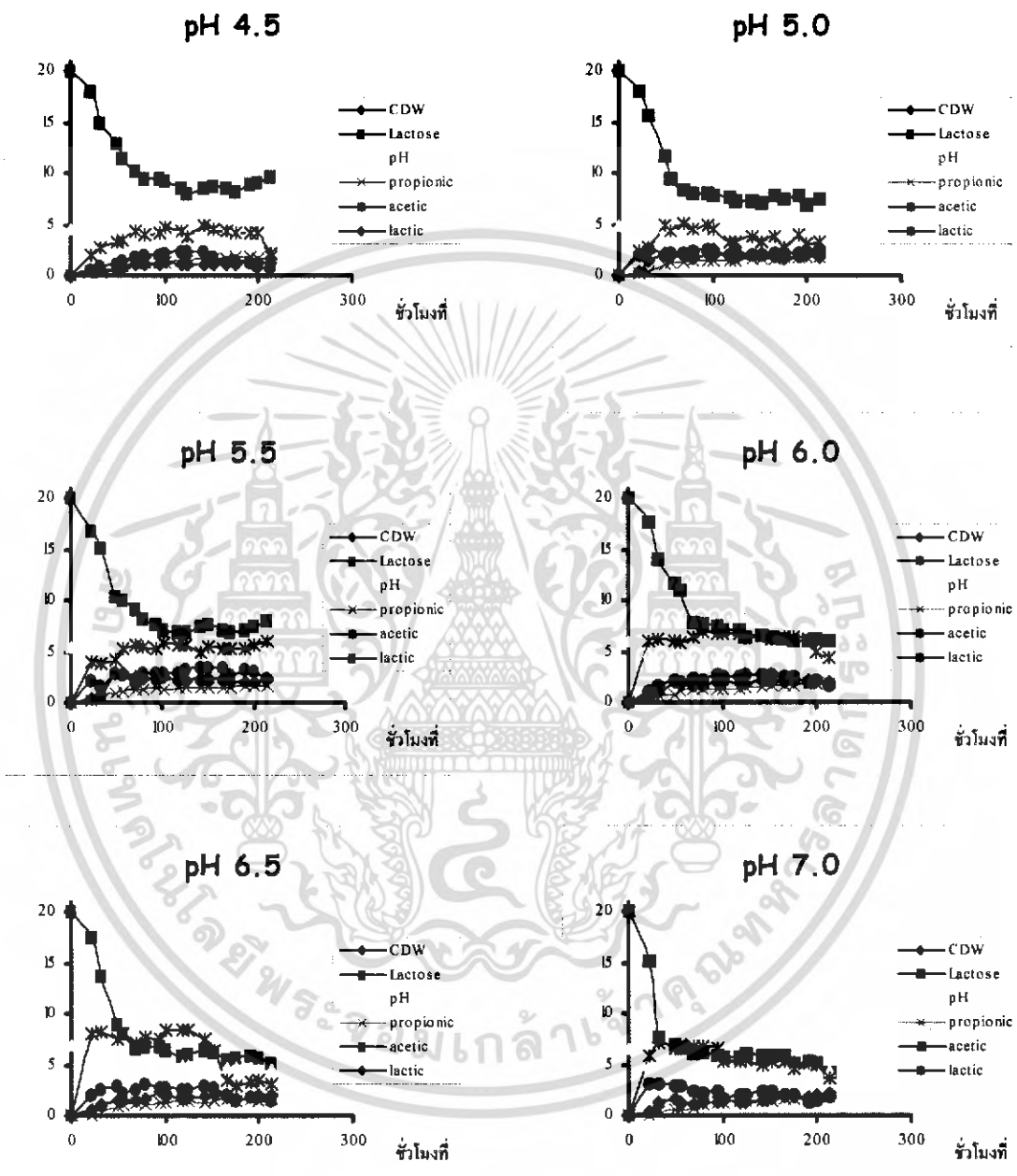
ข. กราฟมาตรฐานกรดแลคติก

ค. กราฟมาตรฐานกรดอะซิติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

ผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก



รูปที่ 7-4 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช กับปริมาณผลผลิตกรดต่างๆ เมื่อทำการศึกษาผลของพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-3 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 4.5

Time	CDW (g/l)	Lactose (g/l)	pH	ปริมาณกรด (g/l)		
				Propionic acid	Acetic acid	Lactic acid
0	0	20.00	4.50	0	0	0
22.5	0.480	18.05	4.66	0.360	1.934	0.570
31.5	0.562	14.91	4.63	0.404	2.664	0.870
48.5	0.612	13.00	4.49	0.614	3.331	1.170
56	0.720	11.47	4.32	0.929	3.537	1.530
70	1.030	10.19	4.46	1.222	4.453	1.879
79	1.099	9.43	4.35	1.303	4.074	2.030
94	1.161	9.53	4.42	1.342	4.274	2.081
101	1.290	9.28	4.39	1.330	4.679	2.130
118.5	1.086	8.58	4.38	1.470	4.350	2.379
125	1.030	8.11	4.35	1.535	3.877	2.400
141.5	1.040	8.63	4.41	1.565	4.947	2.412
151	1.120	8.68	4.32	1.614	4.614	1.900
166	1.100	8.63	4.34	1.700	4.467	1.363
175	1.150	8.21	4.42	1.742	4.131	1.370
191	1.200	8.87	4.31	1.816	4.143	1.264
200	1.210	9.15	4.21	1.723	4.214	0.900
214	1.350	9.72	4.22	1.788	2.187	0.820

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-4 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 5.0

Time	CDW (g/l)	Lactose (g/l)	pH	ปริมาณกรด (g/l)		
				Propionic acid	Acetic acid	Lactic acid
0	0	20.00	5.00	0	0	0
22.5	0.279	18.00	5.19	0.200	2.438	2.037
31.5	1.370	15.76	4.81	0.450	2.654	2.623
48.5	2.104	11.65	4.70	1.180	4.989	2.077
56	1.803	9.52	4.40	1.210	4.400	2.139
70	2.032	8.47	4.34	1.350	5.191	2.223
79	1.600	8.12	4.57	1.410	4.641	2.413
94	2.110	7.96	4.73	1.400	4.951	2.471
101	2.570	7.77	4.70	1.390	4.521	2.240
118.5	1.854	7.70	4.70	1.500	3.255	2.050
125	2.310	7.28	4.69	1.536	3.314	1.860
141.5	2.000	7.26	4.54	1.616	3.914	2.050
151	2.010	7.07	4.45	1.650	3.301	2.048
166	1.828	7.84	4.49	1.670	3.756	2.250
175	1.660	7.42	4.47	1.768	2.814	2.180
191	1.770	7.77	4.41	1.902	3.993	2.250
200	2.020	7.00	4.43	1.857	3.111	2.250
214	1.740	7.42	4.51	1.880	3.356	2.440

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-5 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 5.5

Time	CDW (g/l)	Lactose (g/l)	pH	ปริมาณกรด (g/l)		
				Propionic acid	Acetic acid	Lactic acid
0	0	20.00	5.50	0	0	0
22.5	0.425	16.88	5.24	0.110	3.930	2.108
31.5	0.780	15.20	4.90	0.750	3.774	1.675
48.5	2.850	10.35	4.74	0.930	4.220	2.939
56	2.850	10.00	4.48	1.100	5.220	2.666
70	2.620	9.10	4.57	1.220	5.600	2.064
79	2.427	8.26	4.81	1.270	5.511	3.003
94	2.296	7.67	4.78	1.410	5.362	3.000
101	2.580	7.09	4.80	1.348	5.860	2.907
118.5	2.100	6.86	4.82	1.440	5.579	3.000
125	2.240	6.93	4.79	1.384	5.730	3.220
141.5	2.390	7.56	4.75	1.411	4.889	3.480
151	2.296	7.63	4.56	1.480	5.480	3.540
166	2.420	7.14	4.54	1.440	5.280	3.410
175	2.089	7.00	4.53	1.470	5.321	2.733
191	2.032	7.21	4.52	1.607	5.247	3.290
200	2.032	7.47	4.54	1.661	5.665	3.160
214	2.460	8.05	4.53	1.652	6.047	2.297

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-6 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 6.0

Time	CDW (g/l)	Lactose (g/l)	pH	ปริมาณกรด (g/l)		
				Propionic acid	Acetic acid	Lactic acid
0	0	20	6	0	0	0
22.5	0.495	17.63	5.01	0.509	6.022	1.100
31.5	0.910	14.12	4.80	0.750	6.154	1.710
48.5	2.070	11.62	4.83	0.725	6.040	2.210
56	1.774	11.00	4.67	1.020	5.860	1.980
70	1.580	7.84	4.70	1.230	6.468	2.340
79	1.726	7.63	4.73	1.240	6.993	2.240
94	2.090	7.42	4.71	1.260	6.841	2.750
101	2.180	7.19	4.70	1.304	6.810	2.550
118.5	1.819	7.07	4.70	1.360	6.740	2.550
125	1.774	6.44	4.76	1.440	6.331	2.790
141.5	2.260	6.51	4.74	1.550	6.521	2.800
151	2.100	6.37	4.73	1.600	6.145	2.760
166	1.923	6.23	4.67	1.600	6.324	2.520
175	2.075	6.00	4.67	1.670	6.394	2.570
191	2.220	6.00	4.58	1.790	6.136	2.100
200	2.000	6.30	4.44	1.795	4.986	2.140
214	2.089	5.95	4.33	1.795	4.317	1.600

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-7 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 6.5

Time	CDW (g/l)	Lactose (g/l)	pH	ปริมาณกรด (g/l)		
				Propionic acid	Acetic acid	Lactic acid
0	0	20.00	7.00	0	0	0
22.5	0.520	17.58	4.96	0.050	8.100	2.000
31.5	1.080	13.65	5.07	0.290	8.147	2.520
48.5	1.486	8.96	5.15	0.960	7.414	2.920
56	1.545	8.12	5.00	1.120	7.981	2.100
70	1.380	6.58	4.95	1.220	7.115	2.480
79	1.611	6.79	5.02	1.180	7.737	3.050
94	2.350	6.79	4.92	1.200	7.423	2.700
101	2.180	6.34	4.92	1.190	8.458	2.650
118.5	1.726	5.88	4.92	1.430	8.311	2.600
125	1.819	6.09	4.91	1.490	8.347	2.550
141.5	1.880	6.4	4.88	1.340	7.444	2.940
151	2.080	6.3	4.93	1.490	6.331	2.740
166	1.795	5.39	4.79	1.620	3.393	2.090
175	1.570	5.74	4.78	1.540	3.001	1.550
191	1.810	5.83	4.74	1.710	3.335	1.790
200	1.970	5.60	4.64	1.510	3.412	1.890
214	1.949	5.18	4.57	1.680	3.145	1.380

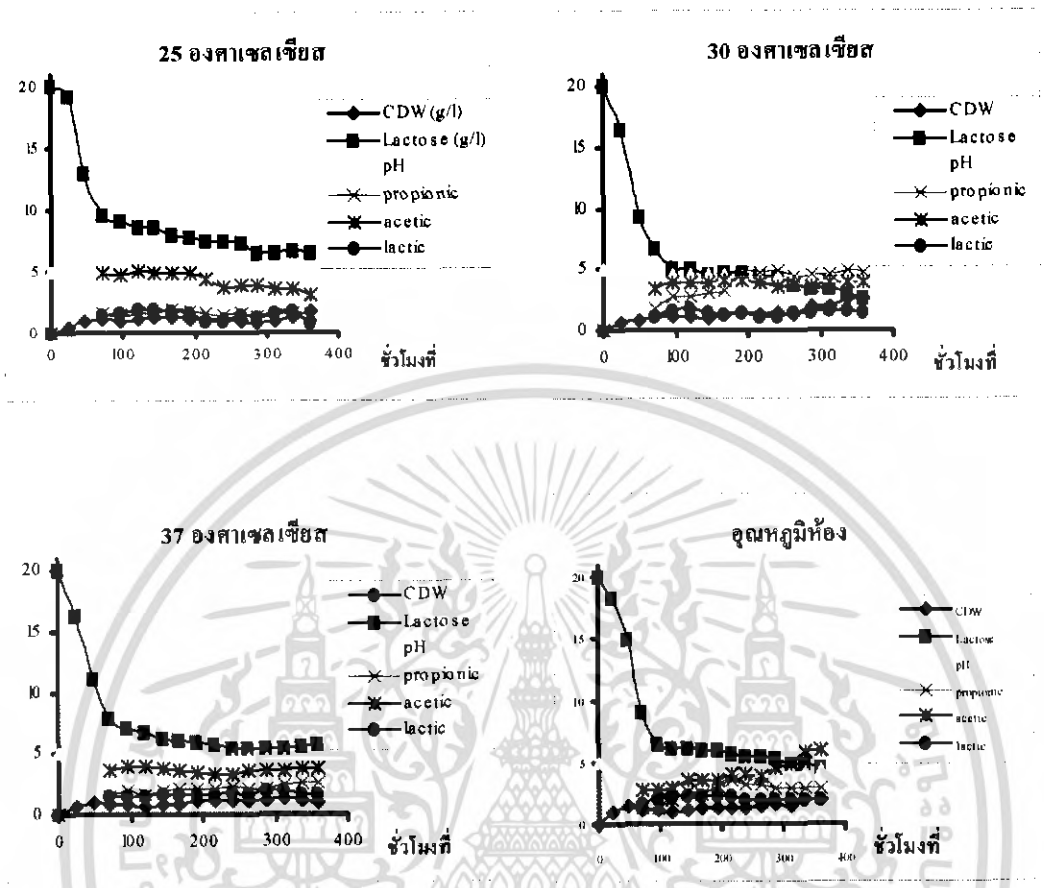
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-8 ผลของพีเอชที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่พีเอช 7.0

Time	CDW (g/l)	Lactose (g/l)	pH	ปริมาณกรด (g/l)		
				Propionic acid	Acetic acid	Lactic acid
0	0	20.00	6.50	0	0	0
22.5	0.305	15.23	4.91	0	5.770	3.056
31.5	1.361	7.59	4.95	0.360	7.130	3.050
48.5	1.570	6.93	4.95	0.520	6.570	2.956
56	1.270	6.51	4.78	0.490	6.890	2.893
70	1.120	5.95	4.83	0.760	6.800	2.424
79	1.210	6.13	4.80	1.160	6.812	2.240
94	1.300	5.81	4.81	1.200	6.487	2.290
101	1.400	5.68	4.75	1.240	5.211	1.681
118.5	1.211	5.60	4.72	1.370	5.244	1.968
125	1.312	5.95	4.84	1.450	5.411	2.075
141.5	1.400	5.88	4.75	1.490	5.001	2.290
151	1.630	5.81	4.75	1.380	5.300	2.434
166	1.810	5.81	4.68	1.600	5.288	1.945
175	1.750	5.18	4.58	1.660	4.573	2.085
191	1.890	5.25	4.35	1.690	5.110	1.212
200	2.060	5.04	4.48	1.710	5.000	1.519
214	2.203	4.27	4.36	1.740	3.714	1.749

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก



รูปที่ 7-5 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช กับปริมาณผลผลิตกรดต่างๆ เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิการบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-9 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Time	CDW (g/l)	Lactose (g/l)	pH	ปริมาณกรด (g/l)		
				Propionic acid	Acetic acid	Lactic acid
0	0	20.00	5.00	0	0	0
24	0.420	19.26	5.12	-	-	-
48	0.960	13.00	4.66	-	-	-
72	1.060	9.46	4.63	1.540	4.877	1.390
96	1.010	9.02	4.57	1.500	4.680	1.555
120	1.090	8.56	4.52	1.600	4.980	1.930
144	1.300	8.57	4.52	1.540	4.779	1.900
168	1.240	7.86	4.52	1.870	4.830	1.802
192	1.090	7.71	4.52	1.790	4.880	1.614
216	1.120	7.44	4.53	1.570	4.340	1.009
240	1.080	7.50	4.52	1.380	3.680	0.933
264	0.940	7.23	4.50	1.570	3.926	1.395
288	0.887	6.52	4.50	1.360	3.886	1.310
312	1.039	6.43	4.49	1.480	3.473	1.660
336	1.260	6.61	4.36	1.600	3.540	1.730
360	1.770	6.51	4.39	1.410	3.026	0.868

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-10 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Time	CDW (g/l)	Lactose (g/l)	pH	ปริมาณกรด (g/l)		
				Propionic acid	Acetic acid	Lactic acid
0	0	20.00	5.00	-	-	-
24	0.610	16.44	4.95	-	-	-
48	0.840	9.21	4.68	-	-	-
72	1.120	6.61	4.62	1.870	3.4571	1.214
96	1.110	5.06	4.55	2.710	3.9516	1.576
120	1.110	5.00	4.53	2.820	3.9200	1.720
144	0.950	4.62	4.52	3.040	3.8700	1.393
168	1.300	4.79	4.62	3.250	4.0400	1.326
192	1.430	4.71	4.39	4.660	4.0900	1.420
216	1.290	4.40	4.49	4.760	3.8700	1.086
240	1.400	4.26	4.47	4.840	3.6257	1.087
264	1.240	3.74	4.40	4.320	3.7500	1.540
288	1.950	3.47	4.42	4.540	3.6000	1.436
312	1.980	3.38	4.33	4.540	3.9598	1.650
336	2.670	2.94	4.21	4.850	3.9200	1.620
360	2.600	2.65	4.29	4.760	3.9500	1.492

หมายเหตุ: - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-11 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Time	CDW (g/l)	Lactose (g/l)	pH	ปริมาณกรด (g/l)		
				Propionic acid	Acetic acid	Lactic acid
0	0	20	5.00	-	-	-
24	0.630	16.35	4.90	-	-	-
48	1.010	11.06	4.67	-	-	-
72	0.890	7.86	4.59	1.532	3.5861	1.485
96	0.840	7.05	4.55	1.910	3.9625	1.502
120	0.730	6.66	4.59	1.592	3.8900	1.520
144	0.780	6.12	4.57	1.947	3.8000	1.570
168	0.880	5.97	4.57	2.170	3.5788	1.620
192	1.060	5.85	4.46	2.100	3.3500	1.603
216	1.140	5.75	4.60	2.060	3.3100	1.670
240	1.080	5.39	4.55	2.288	3.3204	1.710
264	1.120	5.36	4.52	2.100	3.5700	1.674
288	1.100	5.39	4.52	2.140	3.6200	1.944
312	1.240	5.45	4.50	2.375	3.6346	1.921
336	1.175	5.46	4.40	2.580	3.7000	1.689
360	1.050	5.68	4.47	2.600	3.7500	1.547

หมายเหตุ: - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-12 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกรดโพรพิโอนิก ที่อุณหภูมิห้อง

Time	CDW (g/l)	Lactose (g/l)	pH	ปริมาณกรด (g/l)		
				Propionic acid	Acetic acid	Lactic acid
0	0	20.00	5.00	-	-	-
24	0.940	18.21	4.90	-	-	-
48	1.390	14.85	4.63	-	-	-
72	1.100	9.00	4.61	1.280	2.6700	1.596
96	1.080	6.48	4.49	1.233	2.7600	2.074
120	1.040	6.14	4.51	1.920	2.8400	2.089
144	1.110	6.02	4.48	2.513	3.5500	2.250
168	1.250	5.92	4.59	2.360	3.6000	2.198
192	1.250	6.00	4.40	2.980	3.5500	2.320
216	1.220	5.67	4.47	3.530	3.9327	2.267
240	1.222	5.45	4.43	3.200	3.9400	1.865
264	1.482	5.38	4.38	3.210	3.9100	1.860
288	1.610	5.31	4.36	2.880	4.4300	1.880
312	1.460	4.82	4.32	2.960	4.7700	1.980
336	1.910	4.73	4.19	2.820	5.8049	1.982
360	1.930	4.53	4.25	2.960	5.9176	1.980

หมายเหตุ: - ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

4. การวิเคราะห์ผลปริมาณกรดโพรพิโอนิกทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ตารางที่ 7-13 การวิเคราะห์ ANOVA เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสม

ANOVA

PH_PH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10421.821	5	2084.364	42.093	.000
Within Groups	5050.865	102	49.518		
Total	15472.686	107			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-14 การเปรียบเทียบผลทางสถิติด้วยวิธี Tukey HSD และ LSD เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสม

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PH_PH

	(I) PH	(J) PH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	PH4.5	PH5.0	20.45287*	2.34564	.000	13.6397	27.2661
		PH5.5	25.66156*	2.34564	.000	18.8484	32.4747
		PH6.0	26.92394*	2.34564	.000	20.1108	33.7371
		PH6.5	27.30691*	2.34564	.000	20.4937	34.1201
		PH7.0	27.45203*	2.34564	.000	20.6388	34.2652
	PH5.0	PH4.5	-20.45287*	2.34564	.000	-27.2661	-13.6397
		PH5.5	5.20869	2.34564	.238	-1.6045	12.0219
		PH6.0	6.47107	2.34564	.073	-.3421	13.2843
		PH6.5	6.85404*	2.34564	.048	.0409	13.6672
		PH7.0	6.99916*	2.34564	.040	.1860	13.8123
	PH5.5	PH4.5	-25.66156*	2.34564	.000	-32.4747	-18.8484
		PH5.0	-5.20869	2.34564	.238	-12.0219	1.6045
		PH6.0	1.26238	2.34564	.994	-5.5508	8.0756
		PH6.5	1.64535	2.34564	.981	-5.1678	8.4585
		PH7.0	1.79047	2.34564	.973	-5.0227	8.6037
	PH6.0	PH4.5	-26.92394*	2.34564	.000	-33.7371	-20.1108
		PH5.0	-6.47107	2.34564	.073	-13.2843	.3421
		PH5.5	-1.26238	2.34564	.994	-8.0756	5.5508
		PH6.5	.38297	2.34564	1.000	-6.4302	7.1962
		PH7.0	.52809	2.34564	1.000	-6.2851	7.3413
	PH6.5	PH4.5	-27.30691*	2.34564	.000	-34.1201	-20.4937
		PH5.0	-6.85404*	2.34564	.048	-13.6672	-.0409
		PH5.5	-1.64535	2.34564	.981	-8.4585	5.1678
		PH6.0	-.38297	2.34564	1.000	-7.1962	6.4302
		PH7.0	.14512	2.34564	1.000	-6.6681	6.9583
	PH7.0	PH4.5	-27.45203*	2.34564	.000	-34.2652	-20.6388
		PH5.0	-6.99916*	2.34564	.040	-13.8123	-.1860
		PH5.5	-1.79047	2.34564	.973	-8.6037	5.0227
		PH6.0	-.52809	2.34564	1.000	-7.3413	6.2851
		PH6.5	-.14512	2.34564	1.000	-6.9583	6.6681
LSD	PH4.5	PH5.0	20.45287*	2.34564	.000	15.8003	25.1054
		PH5.5	25.66156*	2.34564	.000	21.0090	30.3141
		PH6.0	26.92394*	2.34564	.000	22.2714	31.5765
		PH6.5	27.30691*	2.34564	.000	22.6543	31.9595
		PH7.0	27.45203*	2.34564	.000	22.7995	32.1046
	PH5.0	PH4.5	-20.45287*	2.34564	.000	-25.1054	-15.8003
		PH5.5	5.20869*	2.34564	.029	.5561	9.8613
		PH6.0	6.47107*	2.34564	.007	1.8185	11.1236
		PH6.5	6.85404*	2.34564	.004	2.2015	11.5066
		PH7.0	6.99916*	2.34564	.004	2.3466	11.6517
	PH5.5	PH4.5	-25.66156*	2.34564	.000	-30.3141	-21.0090
		PH5.0	-5.20869*	2.34564	.029	-9.8613	-.5561
		PH6.0	1.26238	2.34564	.592	-3.3902	5.9149
		PH6.5	1.64535	2.34564	.485	-3.0072	6.2979
		PH7.0	1.79047	2.34564	.447	-2.8621	6.4430
	PH6.0	PH4.5	-26.92394*	2.34564	.000	-31.5765	-22.2714
		PH5.0	-6.47107*	2.34564	.007	-11.1236	-1.8185
		PH5.5	-1.26238	2.34564	.592	-5.9149	3.3902
		PH6.5	.38297	2.34564	.871	-4.2696	5.0355
		PH7.0	.52809	2.34564	.822	-4.1245	5.1807
	PH6.5	PH4.5	-27.30691*	2.34564	.000	-31.9595	-22.6543
		PH5.0	-6.85404*	2.34564	.004	-11.5066	-2.2015
		PH5.5	-1.64535	2.34564	.485	-6.2979	3.0072
		PH6.0	-.38297	2.34564	.871	-5.0355	4.2696
		PH7.0	.14512	2.34564	.951	-4.5075	4.7977
	PH7.0	PH4.5	-27.45203*	2.34564	.000	-32.1046	-22.7995
		PH5.0	-6.99916*	2.34564	.004	-11.6517	-2.3466
		PH5.5	-1.79047	2.34564	.447	-6.4430	2.8621
		PH6.0	-.52809	2.34564	.822	-5.1807	4.1245
		PH6.5	-.14512	2.34564	.951	-4.7977	4.5075

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7-15 การวิเคราะห์ ANOVA เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม

ANOVA

T

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	36733.520	3	12244.507	23.436	.000
Within Groups	27168.144	52	522.464		
Total	63901.664	55			

ตารางที่ 7-16 การเปรียบเทียบผลทางสถิติด้วยวิธี Tukey HSD และ LSD เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสม

Multiple Comparisons

Dependent Variable: T

	(I) TIME	(J) TIME	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	T= 25	T= 30	35.80899*	8.63931	.001	12.8794	58.7386
		T= 35	45.89701*	8.63931	.000	22.9674	68.8266
		T= RT	-16.89015	8.63931	.218	-39.8197	6.0394
	T= 30	T= 25	-35.80899*	8.63931	.001	-58.7386	-12.8794
		T= 35	10.08802	8.63931	.650	-12.8416	33.0176
		T= RT	-52.69914*	8.63931	.000	-75.6287	-29.7695
	T= 35	T= 25	-45.89701*	8.63931	.000	-68.8266	-22.9674
		T= 30	-10.08802	8.63931	.650	-33.0176	12.8416
		T= RT	-62.78716*	8.63931	.000	-85.7168	-39.8576
	T= RT	T= 25	16.89015	8.63931	.218	-6.0394	39.8197
		T= 30	52.69914*	8.63931	.000	29.7695	75.6287
		T= 35	62.78716*	8.63931	.000	39.8576	85.7168
LSD	T= 25	T= 30	35.80899*	8.63931	.000	18.4729	53.1450
		T= 35	45.89701*	8.63931	.000	28.5610	63.2331
		T= RT	-16.89015	8.63931	.056	-34.2262	.4459
	T= 30	T= 25	-35.80899*	8.63931	.000	-53.1450	-18.4729
		T= 35	10.08802	8.63931	.248	-7.2480	27.4241
		T= RT	-52.69914*	8.63931	.000	-70.0352	-35.3631
	T= 35	T= 25	-45.89701*	8.63931	.000	-63.2331	-28.5610
		T= 30	-10.08802	8.63931	.248	-27.4241	7.2480
		T= RT	-62.78716*	8.63931	.000	-80.1232	-45.4511
	T= RT	T= 25	16.89015	8.63931	.056	-.4459	34.2262
		T= 30	52.69914*	8.63931	.000	35.3631	70.0352
		T= 35	62.78716*	8.63931	.000	45.4511	80.1232

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้