

การผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อยับยั้งเชื้อราและยีสต์
โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965
ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจีเนต โดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต

PRODUCTION OF PROPIONIC ACID FOR ANTI-FUNGAL ACTIVITY
BY CALCIUM ALGINATE IMMOBILIZATION OF
Propionibacterium acidipropionici ATCC 4965 USING WHEY AS SUBSTRATE

พรวิสาข์ ยูนประยงค์
PORWISA YOOPRAYONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของแผนกศึกษากาแฟและชาของวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กำแพงแสน

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KMUTL-2008-SC-M-020-424

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อยับยั้งเชื้อราและยีสต์
โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965
ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต

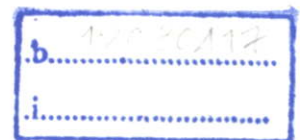
PRODUCTION OF PROPIONIC ACID FOR ANTIFUNGAL ACTIVITY
BY CALCIUM ALGINATE IMMOBILIZATION OF
Propionibacterium acidipropionici ATCC 4965 USING WHEY AS SUBSTRATE



พรวิสาข์ ยู่นประยงค์

PORNWISA YOONPRAYONG

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 87039
วัน,เดือน,ปี..... 3.0...ค.ค... 2552



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2551

KMITL-2008-SC-M-020-424

**PRODUCTION OF PROPIONIC ACID FOR ANTIFUNGAL ACTIVITY
BY CALCIUM ALGINATE IMMOBILIZATION OF
Propionibacterium acidipropionici ATCC 4965 USING WHEY AS SUBSTRATE**

PORNWISA YOONPRAYONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2008

KMITL-2008-SC-M-020-424

COPYRIGHT 2008

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อยับยั้งเชื้อราและยีสต์โดยเชื้อ <i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วย แคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต
นักศึกษา	นางสาวพรวิสาข์ ยุ่นประยงค์
รหัสประจำตัว	49068303
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2551
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

การเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเวย์เป็นส่วนประกอบหลัก เติบโตและผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เร็วกว่าและมากกว่าการผลิตในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ซึ่งได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 14.33 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 336 ของการหมัก และเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเม็ดเจล พบว่า ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อหมักโดยใช้เซลล์ตรึงที่มีการควบคุมระยะทางจากปลายสายยางที่ปล่อยสารละลายจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ในการขึ้นรูปเม็ดเจล ในช่วงระยะ 4 ถึง 6 เซนติเมตร และควบคุมอัตราการไหลของสารละลายเจล 7 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่า เซลล์ตรึงซึ่งเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ร่วมกับการใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 นอร์มัล เพื่อรักษาระดับ pH ที่ 6.5 มีปริมาณการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด และมีศักยภาพความคงตัว โดยสามารถหมักกรดโพรพิโอนิกได้ 2 รอบการหมัก ให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดรวม 29.24 กรัมต่อลิตร (ปริมาณกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 15.85 ± 0.25 กรัมต่อลิตร และ 13.39 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ในการหมักรอบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) มากกว่าเซลล์อิสระที่ระยะเวลาการหมัก 216 ชั่วโมงเท่ากัน กรดโพรพิโอนิกที่ได้จากการหมัก มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์เช่นเดียวกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายในทางการค้าซึ่งผลิตด้วยกระบวนการทางเคมี

Thesis	PRODUCTION OF PROPIONIC ACID FOR ANTIFUNGAL ACTIVITY BY CALCIUM ALGINATE IMMOBILIZATION OF <i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC 4965 USING WHEY AS SUBSTRATE
Student	Miss Pornwisa Yoonprayong
Student ID.	49068303
Degree	Master of Science
Program	Applied Biology
Year	2008
Thesis advisor	Assoc. Prof. Sukjai Choojun

ABSTRACT

The improvement of propionic acid production fermented by calcium alginate immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 using whey as substrate was studied. In whey medium added with 1% CaCO₃ was fermented by free cells of *P. acidipropionici* ATCC 4965 in a 2 litres fermentor, was produced 15.16±0.24 g/l propionic acid which was higher and faster than fermentation in a 2 litres flask at 30°C for 216 hours. The highest propionic acid was produced by immobilized *P. acidipropionici* ATCC 4965 which was performed by adjusting the distance between tube tip and surface of CaCl₂ solution among 4 - 6 cm. and gel solution's flow rate of 7 ml/min. Fermentation by immobilized cells in a 2 litres fermentor using 1% CaCO₃ and 5 N KOH to control the pH at 6.5 gave the highest propionic acid and they had consistent potential to recycle 2 rounds of fermentation and produced the total of 29.24 g/l propionic acid (15.85±0.25 g/l and 13.39±0.25 g/l propionic acid from batch 1 fermentation and batch 2 fermentation, respectively) and this amount was higher than those from free cells in a 2 liters fermentor at 216 hours fermentation time. Fermented propionic acid was able to inhibit growth of fungi the same as commercial propionic acid from the chemical process.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่ได้เสียสละเวลาเพื่อให้ความรู้ คำแนะนำ แนวทางในการดำเนินงานค้นคว้าวิจัย รวมถึงแนวทางในการแก้ไขปัญหาระหว่างการดำเนินงาน อีกทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. พรรณี จิตาภิชิต รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ และ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการดำเนินงานค้นคว้าวิจัย และสละเวลาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณะอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้

ขอขอบพระคุณ บริษัท Minor Cheese Limited ที่อนุเคราะห์เวย์ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นำมาใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ สถาบันกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณ บัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้ออุปการะ สารเคมี ให้คำแนะนำ รวมทั้งอำนวยความสะดวกในเรื่องต่างๆ ตลอดมา และขอขอบคุณ นางสาวอุทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือ ตลอดระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้การสนับสนุนทั้งด้านทุนทรัพย์และเป็นกำลังใจให้ตลอดมา ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

พรวิสาข์ ยूनประยงค์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญรูป.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
2.1 คุณสมบัติของกรดโพรฟิโอนิก	4
2.2 ความสำคัญของกรดโพรฟิโอนิก	4
2.3 กระบวนการผลิตกรดโพรฟิโอนิก	6
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดโพรฟิโอนิก	9
2.5 วิธีการเกิดกรดโพรฟิโอนิก	11
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรฟิโอนิก	14
2.7 เวย์	18
2.8 ระบบตรึงเซลล์	25
2.9 อัลจิเนต	29
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	32
3.1 อุปกรณ์	32
3.2 วัสดุคิบ	33

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	33
3.4 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต กรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ <i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC 4965	34
3.5 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ <i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC4965 ในลักษณะเซลล์อิสระในฟลาสก์และในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	35
3.6 การศึกษาการตรึงเซลล์ <i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC 4965 โดยวิธีหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	36
3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเม็ดเจลของเซลล์ตรึง <i>Propionibacterium</i> <i>acidipropionici</i> ATCC 4965 เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก	36
3.8 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงของเชื้อ <i>Propionibacterium</i> <i>acidipropionici</i> ATCC 4965 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร และในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร.....	38
3.9 การศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึง <i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC 4965 โดยการนำมาใช้ซ้ำ เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร	39
3.10 การศึกษาปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สะสมในเซลล์ตรึง <i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC 4965	40
3.11 การสกัดกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้	40
3.12 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์ของกรดโพรพิโอนิก ที่ผลิตได้ เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายในทางการค้าโดยวิธี paper disc agar diffusion method.....	41
3.13 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ	41
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล.....	42
4.1 ผลการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต กรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ <i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC 4965	42

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก	5
2.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ <i>Propionibacterium</i> สายพันธุ์ต่างๆ	10
2.3 องค์ประกอบโดยประมาณของสวิตเวย์และแอซิดเวย์	19
2.4 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในนม เคซีน และเวย์	20
2.5 องค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์	21
2.6 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในโปรตีนอ้างอิงของ FAO จากไข่ นม และเวย์	21
4.1 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 จากอาหาร 6 ชุดทดลอง	42
4.2 ค่า P-value ของการเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระ ของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 โดยใช้อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 1 ในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธี T-test ณ ชั่วโมงที่ 216	51
4.3 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ ในการศึกษา ระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เมื่อทำการ เลี้ยงเซลล์ครึ่ง <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 336 ชั่วโมง.....	53
4.4 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ จากการศึกษา อัตราการไหลที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเม็ดเจล	55
4.5 ค่า P-value ของการเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการหมักเซลล์ครึ่งเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ระหว่างการใช้อาหารเวย์ที่เติม แคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 1 และอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต หมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธี T-test ณ ชั่วโมงที่ 336	59
4.6 ค่า P-value ของการเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการหมักเซลล์ครึ่งเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ระหว่างการเติมโพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ ในการควบคุม pH และการไม่เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยใช้วิธี T-test ณ ชั่วโมงที่ 192	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.7 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ ผลผลิต และอัตราการผลิต ในการเลี้ยงเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร กวนที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	65
4.8 ค่า p-value ของการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ของกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยวิธี T-test	70

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก 4
2.2	สูตรโมเลกุลของเกลือของกรดโพรพิโอนิก 5
2.3	เชื้อ <i>Propionibacterium spp.</i> 9
2.4	วิธีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสโดยเชื้อ <i>Propionibacterium</i>12
2.5	การสร้างซัคซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์13
2.6	วิธีอะครีเลตของการสร้างโพรพิโอเนต13
2.7	เวย์18
2.8	สูตรโครงสร้างของน้ำตาลแลคโตสที่ถูกไฮโดรไลซ์ 19
2.9	ขั้นตอนการผลิตและการใช้ประโยชน์ของ whey permeate 22
2.10	ความเป็นไปได้ที่จะนำเวย์มาใช้ประโยชน์ 24
2.11	โครงสร้างโมเลกุลของอัลจินต.....29
4.1	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จำนวนเซลล์ และค่า pH ในการ เลี้ยงเชื้อ <i>P.acidipropionici</i> ATCC 4965 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 336 ชั่วโมง ในอาหาร MRS43
4.2	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จำนวนเซลล์ และค่า pH ในการ เลี้ยงเชื้อ <i>P.acidipropionici</i> ATCC 4965 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 336 ชั่วโมง ในอาหารตัดแปลง.....44
4.3	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จำนวนเซลล์ และค่า pH ในการ เลี้ยงเชื้อ <i>P.acidipropionici</i> ATCC 4965 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 336 ชั่วโมง ในอาหารเวย์45
4.4	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาล และค่า pH ในการหมักเซลล์อิสระของ เชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 โดยใช้อาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 336 ชั่วโมง ในฟลาस्कขนาด 2 ลิตร.....49
4.5	ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและ ปริมาณน้ำตาล ในการหมักเซลล์อิสระของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 โดยใช้อาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 336 ชั่วโมง ในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....50

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6 ลักษณะเม็ดเจลที่ขึ้นรูปโดยใช้ระยะทางจากปลายสายยางถึงผิวหน้าสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 2 4 5 6 8 10 15 และ 20 เซนติเมตร.....	52
4.7 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากเซลล์ตรึง <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 เมื่อกำหนดระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2 ถึง 20 เซนติเมตร หมักในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 336 ชั่วโมง	52
4.8 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 ที่กำหนดค่าอัตราการผลิตของสารละลายเจลเท่ากับ 5 6 และ 7 มิลลิลิตรต่ออนาที.....	54
4.9 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาล และค่า pH ในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 ในอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร.....	56
4.10 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาล จำนวนเซลล์ และค่า pH ในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 ในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร.....	57
4.11 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 ในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 และอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร.....	58
4.12 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาล และค่า pH ในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 โดยใช้อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่มีการควบคุม pH ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 นอร์มัล กวนที่ความเร็ว 100 รอบต่ออนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง	60
4.13 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณน้ำตาล ในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ควบคุม pH ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 นอร์มัล กวนที่ความเร็ว 100 รอบต่ออนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 216 ชั่วโมง	61

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.14 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการควบคุม pH ด้วย โพรแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และ ไม่มีการควบคุม pH ด้วยโพรแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ในระยะเวลาการหมัก 192 ชั่วโมง.....	62
4.15 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ในการหมักเซลล์ตรึง <i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รอบการหมักที่ 1 และ 2	64
4.16 ผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา อายุ 4 วัน ด้วยวิธี paper disc agar diffusion method เปรียบเทียบระหว่างกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้า กับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ	68
4.17 ผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อยีสต์ อายุ 4 วัน ด้วยวิธี paper disc agar diffusion method เปรียบเทียบระหว่างกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้า กับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ	69

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดโพรพิโอนิกจัดเป็นวัตถุกันเสียทางชีวภาพ (biopreservatives) ชนิดหนึ่ง เนื่องจากเป็นกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสกุล *Propionibacterium* sp. มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทราและแบคทีเรียบางชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้โพรพิโอนเนตในการยับยั้งยีสต์ในสกุล *Candida* sp. และ *Zygosaccharomyces bailii* ที่เป็นต้นเหตุให้ผลิตภัณฑ์ประเภทเนยแข็งและโยเกิร์ตเน่าเสีย (Schwenninger และ Meile. 2004) สำหรับกรดโพรพิโอนิกเองมีการใช้เป็นส่วนผสมในยาควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจ สารให้กลิ่นรส และตัวทำละลาย (Himmi และคณะ. 2000) และมีการนำกรดโพรพิโอนิกไปใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ โดยนิยมใช้ในรูปของเกลือแคลเซียม เกลือโซเดียม และเกลือโพแทสเซียม (Yang และคณะ. 1993) ซึ่งในปัจจุบันการใช้กรดโพรพิโอนิกในอาหารสัตว์มีความสำคัญมากยิ่งขึ้น เนื่องจากมีข้อตกลงของสหภาพยุโรป ให้เพิกถอนการอนุญาตใช้สารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโต แม้ว่ายังไม่มี การออกข้อบังคับ แต่ในทางปฏิบัติ นั้น การใช้สารปฏิชีวนะเพื่อเร่งการเจริญเติบโต (antibiotic growth promoter ; AGPs) มีปริมาณลดลง ผู้เลี้ยงสัตว์ที่ต้องการจำหน่ายผลิตผลจึงต้องค้นหาสารอื่นเพื่อนำมาทดแทนสารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ โดยมีความพยายามค้นหาโมเลกุลสารประกอบที่มีคุณสมบัติด้านเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ หนึ่งในสารที่ให้ผลดีคือกรดอินทรีย์ ทั้งในรูปกรดโดยตรงหรือเกลือของกรด ซึ่งกรดโพรพิโอนิกก็เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่อยู่ในความสนใจ เนื่องจากการทำงานของกรดโพรพิโอนิกซึ่งมีการแตกตัวภายในเซลล์ของผนังลำไส้ ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สาร secretin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นการหลั่งน้ำย่อยออกจากตับอ่อน โดยมีผลต่อการย่อยที่ดีและส่งผลในทางบวกต่อสมรรถนะการแสดงออกของสัตว์ (Dibner. 2004)

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตทางการค้านิยมใช้กระบวนการทางเคมีโดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารโพรเพนในรูปของเหลว (liquid-phase propane) หรือโพรพิโอนัลดีไฮด์ (propionaldehyde) แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์มีความยุ่งยากซับซ้อน อีกทั้งยังมีสารที่ก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมจากขั้นตอนดังกล่าวอีกด้วย จึงมีการศึกษาเพื่อพัฒนาปรับปรุงการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้แบคทีเรียสกุล *Propionibacterium* spp. ซึ่งมีผลดีคือต้นทุนในการผลิตต่ำกว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีความเป็นพิษ และเนื่องจากเป็นสารที่ได้จากกระบวนการทางชีวภาพจึงเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในการนำมาใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพมีข้อจำกัดตรงที่

ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกระบวนการหมักมีปริมาณน้อย ระยะเวลาในการหมักค่อนข้างนาน (Ozadali และคณะ. 1995) เช่น การหมักแบบกะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกร้อยละ 1-3 ในระยะเวลาในการหมัก 7-14 วัน (Steven และคณะ. 1994) เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญช้าและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตออกมาจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Lueck. 1980) ดังนั้นจึงมีความพยายามในการเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นระบบการหมักแบบกึ่งกะ (Hettinga และคณะ. 1992) ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (Blanc และคณะ. 1989) การใช้การตรึงเซลล์ (Suwannakham และ Yang. 2005) เป็นต้น

สำหรับการตรึงเซลล์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในระบบการหมักจากจุลินทรีย์ มีการนำวิธีนี้มาใช้ในระบบการผลิตกรดอินทรีย์ กรดอะมิโน เอนไซม์ แอลกอฮอล์ ยาปฏิชีวนะ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการใช้เซลล์ตรึงกับเซลล์อิสระ พบว่าระบบการใช้เซลล์ตรึงสามารถควบคุมกระบวนการหมักได้ง่ายกว่าการใช้เซลล์อิสระ และให้ผลผลิตดีกว่า อีกทั้งมีความคงตัวมากกว่าเซลล์อิสระ (Jianlong. 2000)

เวย์เป็นผลิตภัณฑ์ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง ซึ่งในต่างประเทศได้มีการแปรรูปเวย์ให้มีมูลค่ามากขึ้นโดยนำมาใช้ในรูปแบบของเวย์เข้มข้น เวย์ผง หรือนำไปผสมอาหารแห้งสำหรับผู้ที่เน้นการบริโภคโปรตีน สำหรับประเทศไทย แม้ความนิยมในการบริโภคอาหารประเภทนมเนยยังไม่แพร่หลายมาก แต่ปัจจุบันเริ่มมีการสนับสนุนจากภาครัฐให้เน้นการบริโภคนมมากขึ้น อีกทั้งอาหารหลายชนิดที่เป็นที่นิยมในปัจจุบันมีเนยเป็นส่วนประกอบ ทำให้โรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องมีการผลิตวัตถุดิบ (เนย) ออกมาป้อนตลาดมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเวย์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ได้นี้อย่างจริงจัง เวย์ที่ได้จึงต้องนำไปกำจัดโดยปล่อยทิ้งออกมาพร้อมน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง และเป็นผลทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงเป็นอีกแนวทางในการใช้ประโยชน์จากเวย์ เพื่อศึกษาการเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์ตรึงของแบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาการเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต
- 1.2.2 ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเวย์ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยวิธีการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต
- 1.2.3 ศึกษาศักยภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงโดยการนำมาใช้ซ้ำ (cell recycling) เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก

1.2.4 ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายในทางการค้า

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยระบบตรึงเซลล์กับเซลล์อิสระของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับฟลาस्कเปรียบเทียบกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ศึกษาศักยภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงในการนำมาใช้ซ้ำเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก วิเคราะห์หาปริมาณชีวมวล กรดโพรพิโอนิก และน้ำตาลทั้งหมดในช่วงระยะการหมัก ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายในทางการค้าโดยวิธีการวิเคราะห์ paper disc agar diffusion method

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้การผลิตเนยแข็ง

1.4.2 ทราบถึงผลผลิตกรดในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะเป็แนวทางในการพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรม และเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าของเวย์ในโพรพิโอนิกที่ได้จากกระบวนการหมักเวย์โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 จากการผลิตด้วยระบบตรึงเซลล์

1.4.3 ทราบถึงศักยภาพของเซลล์ตรึงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อประโยชน์ในการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

1.4.4 เป็นการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเวย์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการผลิตเนยแข็งมาใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในเชิงพาณิชย์

1.4.5 เป็นการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายในทางการค้า

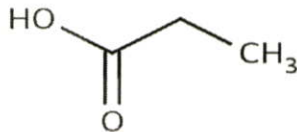
บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกจัดเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ได้จากการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต โดยแบคทีเรีย (Prescott และคณะ. 1959) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทรา นอกจากนี้ยังพบกรดโพรพิโอนิกตามธรรมชาติได้ในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ในเหงื่อของคน และในอาหารประเภทหมักดอง เป็นต้น (Lind และคณะ. 2004)

กรดโพรพิโอนิกมีสูตรโมเลกุลคือ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ สูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิกแสดงดังตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สูตร โครงสร้าง โมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก

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

2.2 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่ไม่แตกตัว มีประโยชน์ในการทำลายจุลินทรีย์โดยจะไปละลายสารภายในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีการตั้งสมมติฐานว่า กรดโพรพิโอนิกสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยไปรบกวนการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ ส่งผลให้สภาพภายในเซลล์มีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ช่วยในการยับยั้งการเจริญและทำให้จุลินทรีย์ตายได้ในที่สุด สำหรับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของกรดโพรพิโอนิก ทำให้มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ 3.4 ถึง 4.5 โดยที่ pH 4 จะมีโมเลกุลของกรดและเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 88 ในขณะที่ pH 6 จะมีโมเลกุลของกรดและเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 6.7 ซึ่งกรดที่ไม่แตกตัวนี้ทำให้เกิดการยับยั้งการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ อีกทั้งกรดโพรพิโอนิกจะมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นเมื่อมีแอนไอออนไปรบกวนการแตกตัวของกรด กรดโพรพิโอนิกที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะอยู่ในรูปของเกลือ ได้แก่ เกลือโซเดียม แคลเซียม และโพแทสเซียม (ศิวาพร. 2535) สูตรโมเลกุลของเกลือของกรดโพรพิโอนิกแสดงดังรูปที่ 2.2

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COONa}$
โซเดียม โพรพิโอเนต

$(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO})_2\text{Ca}$
แคลเซียม โพรพิโอเนต

รูปที่ 2.2 สูตร โมเลกุลของเกลือของกรดโพรพิโอนิก

ที่มา : ศิวาพร (2535)

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ	กรดโพรพิโอนิก
น้ำหนักโมเลกุล	74.08
Conversion factor	1 พีพีเอ็มเท่ากับ 3.02 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตรเท่ากับ 0.33 พีพีเอ็ม ที่ 25 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	(- 20) ถึง (-22) องศาเซลเซียส
จุดเดือด	141.1 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น	0.992 – 0.994
การละลายน้ำ	สามารถละลายน้ำได้
ค่า pH	2.9
การละลายในสารละลาย	สามารถละลายได้ในเอทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ และ คลอโรฟอร์ม
ความดันบรรยากาศ	2.55
ความดันไอ	0.32 ถึง 0.4 กิโลปาสกาล
อัตราการระเหย	ไม่ระเหย
อุณหภูมิวิกฤติ	339 องศาเซลเซียส
ค่าความเป็นกรด	กรดอ่อน pKa 4.87
ความดันวิกฤติ	5370 กิโลปาสกาล
ความคงตัว	มีความคงตัว
การกัดกร่อนเหล็ก	สามารถกัดกร่อน เหล็กกล้า นิกเกิล โครเมียม และตะกั่ว
สถานะที่ควรหลีกเลี่ยง	อุณหภูมิเกิน 50 องศาเซลเซียส
วัตถุที่ควรหลีกเลี่ยง	สารออกซิไดส์ กรดแก่ Reactive metal Reducing agent

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

กรดโพรฟิโอนิกมีความปลอดภัยในการใช้ในอาหาร จึงไม่ได้กำหนดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในอาหาร ยกเว้นในอาหารบางประเภทซึ่งกำหนดความเข้มข้นสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ได้ดังนี้ ผลิตภัณฑ์โพรเซสซีส ให้ใช้ได้ปริมาณสูงสุดไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับผลิตภัณฑ์ประเภทขนมปัง ให้ใช้ได้ปริมาณสูงสุดไม่เกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 1 กิโลกรัม (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2527 ฉบับที่ 84 เรื่องวัตถุเจือปนในอาหาร)

มีรายงานการใช้กรดโพรฟิโอนิกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดังนี้

ประวัติและคณะ (2525) รายงานว่าการใช้กรดโพรฟิโอนิกร้อยละ 1.5 ในเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 26 สามารถป้องกันเชื้อราไม่ให้เจริญในระยะเวลา 1 เดือน และตรวจไม่พบสารอะฟลาทอกซิน และในการใช้สารผสมระหว่างกรดโพรฟิโอนิกกับแอมโมเนียมบิสโพรฟิโอเนตในอัตราส่วน 8 ต่อ 2 พบว่าที่ระดับของสารผสม 6 ลิตรต่อเมล็ดข้าวโพด 1 ตัน สามารถควบคุมการสร้างอะฟลาทอกซินได้ตลอดระยะเวลาการทดลอง 12 สัปดาห์

Vandegraft และคณะ (1975) รายงานการใช้กรดโพรฟิโอนิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 กับเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 28 พบว่าตลอดการทดลอง 29 สัปดาห์ ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* กับ *Aspergillus ochraceus* และไม่พบสารอะฟลาทอกซิน B₁ กับสารโอคราทอกซินเลย

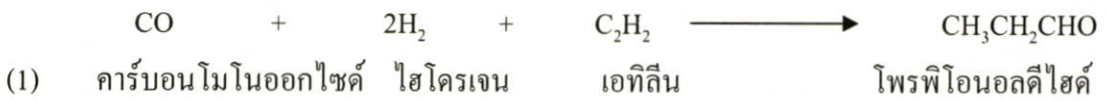
Buchanan และ Ayres (1976) รายงานว่าการใช้กรดโพรฟิโอนิก 0.1 กรัมต่อ 100 มิลลิกรัมของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มี pH 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* และการสร้างอะฟลาทอกซินได้บางส่วน แต่ถ้าเพิ่มเป็น 0.2 กรัม จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและการสร้างอะฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 7 วัน

2.3 กระบวนการผลิตกรดโพรฟิโอนิก

กรดโพรฟิโอนิกสามารถผลิตได้ 2 วิธี ดังนี้

2.3.1 กระบวนการผลิตกรดโพรฟิโอนิกด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี

ในปัจจุบันการผลิตกรดโพรฟิโอนิกในเชิงพาณิชย์นิยมใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากใช้เวลาในการผลิตสั้น และได้ผลผลิตตามต้องการ โดยใช้ปฏิกิริยาการออกซิเดชันของโพรฟิโอนอลดีไฮด์ที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียส ดังสมการที่ 1 และ 2



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

2.3.2 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium* อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากผลผลิตที่ได้มีปริมาณน้อย โดยมีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องดังนี้

Woskow และ Glatz (1991) รายงานผลการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคโตสจากหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* สายพันธุ์ P9 และ 200910 ในสภาพการหมักแบบกะและกึ่งกะ พบว่าเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* สายพันธุ์ 200910 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกปริมาณ 47 กรัมต่อลิตร สูงกว่าผลผลิตที่ได้จากสายพันธุ์ P9 และให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกและวิตามินบี 12 จากซูโครส พบว่าปริมาณของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 มิลลิกรัม ธาตุโคบอลต์ 0.75 มิลลิกรัม และ 5, 6 ไคเมทิลเบนซิมิดาโซล 0.3 มิลลิกรัม เป็นปริมาณแร่ธาตุที่จำเป็นนอกเหนือจากแหล่งไนโตรเจน ฟอสเฟต และแมกนีเซียมที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของซูโครสที่ปริมาณ 30 ถึง 170 กรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลให้เกิดการยับยั้งจากซัพสเตรต และสำหรับการผลิตเพื่อให้ได้กรดโพรพิโอนิกนั้นต้องทำในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนการผลิตวิตามินบี 12 นั้นต้องทำในสภาวะที่มีอากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ pH 6.5

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก ได้แก่ กลูโคสและแลคเตดจาก corn steep liquor (CSL) โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* สายพันธุ์ P200910 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเนตและเชื้ออิสระในสภาพการหมักแบบกะ กึ่งกะ และต่อเนื่อง พบว่าการหมักแบบกะจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดในเวลา 36 ชั่วโมง การใช้แลคเตดเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตของกรดสูงกว่าการใช้กลูโคส ส่วนการหมักแบบกึ่งกะ จะใช้เวลาในการหมักนาน 250 ชั่วโมง ปริมาณสูงสุดของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้กลูโคสเท่ากับ 57 กรัมต่อลิตร สูงกว่าการใช้แลคเตดที่ได้ผลผลิต

45.6 กรัมต่อลิตร และในสภาพการหมักทั้งแบบกะและแบบต่อเนื่อง เซลล์ที่ถูกตรึงด้วย แกลเซียมอัลจินเตจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าเซลล์อิสระ

Ozadali และคณะ (1995) รายงานการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* สายพันธุ์ P9 ในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่เปรียบเทียบกับการใช้ corn steep liquor พบว่าผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเท่ากับ 34.5 กรัมต่อลิตร ในเวลา 146 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ น้อยกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ 35 กรัมต่อลิตร ในเวลา 108 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ corn steep liquor

Babirato และคณะ (1997) เปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิก 3 ชนิด คือ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ ATCC25562 *P. acnes* สายพันธุ์ ATCC6919 และ *Clostridium propionicum* สายพันธุ์ ATCC25522 โดยใช้กลีเซอรอล กลูโคส และกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *P. acidipropionici* สายพันธุ์ ATCC25562 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดโดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

Rickert และคณะ (1998) ศึกษาการตรึงเซลล์ *P. thoenii* สายพันธุ์ P20 ด้วยแคลเซียมอัลจินเต เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกในสภาพการหมักแบบกะ โดยใช้กลูโคสและแลคเตตเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ปริมาณของกลูโคสเท่ากับ 75 กรัมต่อลิตร และแลคเตต 42 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตโพรพิโอนีนตสูงสุดที่ 34 กรัมต่อลิตร และ 22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีอัตราการใช้กลูโคสและการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่ pH 6.0 แต่ผลผลิตที่ได้สูงสุดเมื่อควบคุม pH เท่ากับ 7.0

Himmi และคณะ (2000) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* spp. *shermanii* พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด โดย *P. acidipropionici* มีความสามารถใช้สารตั้งต้นได้เร็วกว่า คือ 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดสูงกว่า คือ 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อมีการผลิตกรดอะซิติก ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตกรดโพรพิโอนิกในปริมาณที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณของกรดอะซิติกที่ได้จะมากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 2 เท่า ส่วนเชื้อ *P. freudenreichii* เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการใช้กลีเซอรอลกับการสร้างผลผลิต จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดียิ่งสำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *P. acidipropionici*

Martinez และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ มีการเติมกลูโคสและแลคเตต ซึ่งกลูโคสและแลคเตตจะถูกใช้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การใช้กลูโคสและแลคเตตร่วมกัน จะเพิ่มอัตราการผลิตโพรพิโอนีนต่ออะซิเตต (P/A) และยังเป็น การเพิ่มส่วนของธาตุคาร์บอนสำหรับที่จะนำไปใช้ในการผลิตชีวมวล ผลผลิตของโพรพิโอนีนต่ออะซิเตตเท่ากับ 7.6 เมื่อใช้แลคเตตและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน

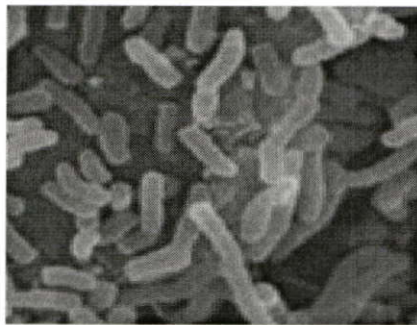
4 โมลาร์ อัตราส่วนโพรพิโอเนตต่ออะซิเตตเท่ากับ 1.34 เมื่อใช้แลคเตดอย่างเดี่ยว และ 1.85 เมื่อใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียว

Suwannakham และ Yang (2005) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ ATCC 4875 เปรียบเทียบระหว่างการใช้เซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักแบบ fibrous bed โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักแบบ fibrous bed ให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 71.8 ± 0.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระถึงร้อยละ 20 – 59

2.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

แบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกจัดอยู่ในสกุล *Propionibacterium* เรียกว่าเป็น propionic acid bacteria (Quesada-Chanto. 1994) พบครั้งแรกโดยแยกได้จากเนยสวิส ซึ่งในกระบวนการหมักจะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ทำให้เกิดลักษณะรูพรุนในเนือเนยแข็ง

แบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์อะคะเลส มีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ รูปร่างกลม ท่อนยาว อาจพบในลักษณะเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่ มีการเจริญแบบแฟคัลเททีฟแอนแอโรบ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30 – 37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิก ชักซินิก แอซีติก และคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมัก เจริญเติบโตช้า แบคทีเรียประเภทนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่มีความสำคัญด้านอุตสาหกรรมหรือกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นม มีจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ *Propionibacterium freudenreichii* *P. thoenii* *P. jensenii* *P. acidipropionici* *P. coccooides* และ *P. cyclohexanicum* ซึ่งกลุ่มนี้ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง การผลิตวิตามินบี 12 การผลิตกรดโพรพิโอนิกเป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สองคือกลุ่มที่เจริญบนผิวหนังมนุษย์ หรือกลุ่มที่ทำให้เกิดสิว เช่น *P. acnes* ซึ่งไม่มีบทบาทในด้านอุตสาหกรรมนัก ลักษณะของเชื้อ *Propionibacterium* แสดงดังรูปที่ 2.3 และข้อมูลการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.3 เชื้อ *Propionibacterium* spp.

ตารางที่ 2.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ

Species	Strain reference	Propionic acid (70 h) g/l	pH
<i>P. acidipropionici</i>	ATCC 4965	9.8	4.65
	CNRZ 287	7.5	4.67
	CNRZ 721	2.0	5.67
	CNRZ 733	0.0	4.40
<i>P. thoenii</i>	ATCC 4871	8.0	4.62
<i>P. jensenii</i>	ATCC 4870	0.0	5.82
	CNRZ 83	2.0	5.10
	ATCC 4867	0.0	5.10
	CNRZ 731	0.0	4.11
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	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
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	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

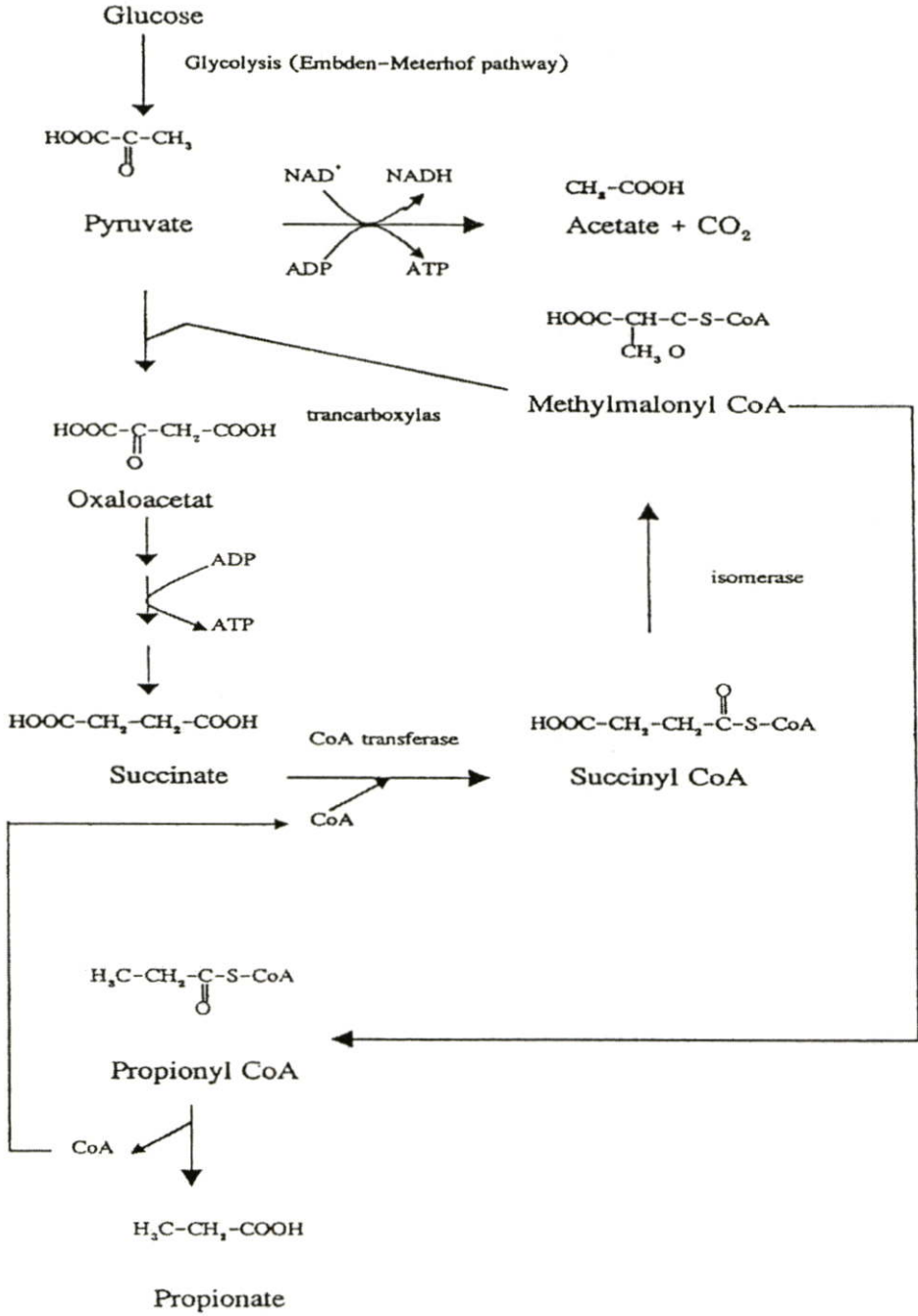
ที่มา : Colomban และคณะ (1993)

2.5 วิธีการเกิดกรดโพรพิโอนิก

การผลิตกรดโพรพิโอนิกเกิดขึ้นได้จากหลายวิธี ซึ่งคาร์บอนจากแหล่งต่างๆจะถูกใช้ในการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Propionibacterium* โดยเริ่มจากสารตัวกลางที่สำคัญคือ ไพรูเวท ออกซาโลอะซิเตต มาเลท ซักซิเนต และโพรพิโอเนต ตามลำดับดังรูปที่ 2.4

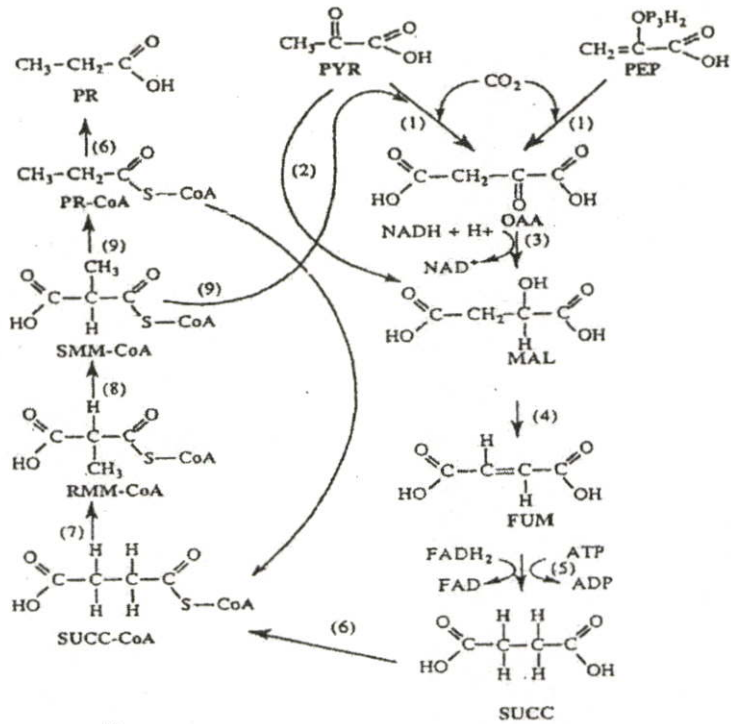
การสร้างซักซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ แสดงดังรูปที่ 2.5 โดยเริ่มต้นจากการสร้างออกซาโลอะซิเตตด้วยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้กับไพรูเวทหรือให้กับ ฟอสโฟอินอลไพรูเวท (PEP) และถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอล-มาเลท (L-malate) โดยการทำงานของเอนไซม์มาลิกดีไฮโดรจีเนส (malic dehydrogenase) ซึ่งกรดมาลิกที่ได้จะถูกดึงน้ำออกโดยเอนไซม์ฟูมาเรส (fumarase) ทำให้ได้กรดฟูมาริก (fumaric acid) ปฏิกริยานี้ผันกลับได้ จากนั้นกรดฟูมาริกจะถูกเปลี่ยนให้เป็นซักซิเนตโดยเอนไซม์ฟูมาเรตรีดักซ์เตส (fumarate reductase) ซึ่งซักซิเนตจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในกระบวนการ โดยทำปฏิกริยากับเอนไซม์โคเอทรานเฟอร์เรส (CoA transferase) ได้ซักซินิลโคเอ (succinyl CoA) ปฏิกริยาต่อไปซักซินิลโคเอจะเปลี่ยนเป็นอาร์-เมทิล มาโลนิลโคเอ (R-methyl malonyl CoA) โดยเอนไซม์อาร์-เมทิล มาโลนิลมิวเตส (R-methyl malonylmutease) หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนอาร์-เมทิลมาโลนิลโคเอไปเป็น เอสเมทิลมาโลนิลโคเอ (S-methyl malonyl CoA) ซึ่งคาร์บอนของเอส-เมทิลมาโลนิลโคเอจะถูกย้ายออกไปรวมกับไพรูเวท ทำให้เกิดการสร้างออกซาโลอะซิเตต เมื่อคาร์บอนเคลื่อนย้ายออกไปจะทำให้ได้โพรพิโอนิลโคเอ (propionyl CoA) จากนั้นโคเอ (CoA) จะถูกย้ายออกจากโมเลกุลเพื่อนำไปใช้กับซักซินิลตัวต่อไป ทำให้ได้กรดโพรพิโอนิกออกมาในที่สุด

วิธีอะครีเลต (Acrylate) ของการสร้างโพรพิโอเนต รายละเอียดของวิธีนี้แสดงในรูปที่ 2.6 กรดโพรพิโอนิกจะถูกสร้างขึ้นตามลำดับ เริ่มต้นจากการเปลี่ยนรูปของแอล-แลกเตต (L-lactate) ไปเป็นแอล-แลกทิลโคเอ (L-lactryl CoA) โดยปฏิกริยาของเอนไซม์โคเอทรานเฟอร์เรส (CoA transferase) จากนั้นแอล-แลกทิลโคเอ จะเปลี่ยนรูปไปเป็น อะคริลิลโคเอ (Acrylyl CoA) โดยปฏิกริยาของเอนไซม์ดีไฮเดรเตส อะคริลิลโคเอ (dehydratase acrylyl CoA) และเปลี่ยนเป็นโพรพิโอนิลโคเอโดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของฟลาโวโปรตีน (flavo protein) ซึ่งโพรพิโอนิลโคเอจะย้ายโมเลกุลโคเอไปให้แอล-แลกเตตเพื่อสร้างแอล-แลกทิลโคเอ และเกิดเป็นกรดโพรพิโอนิกอิสระ สำหรับการสร้างอะซิเตตและคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดควบคู่ไปกับการสร้างโพรพิโอเนต



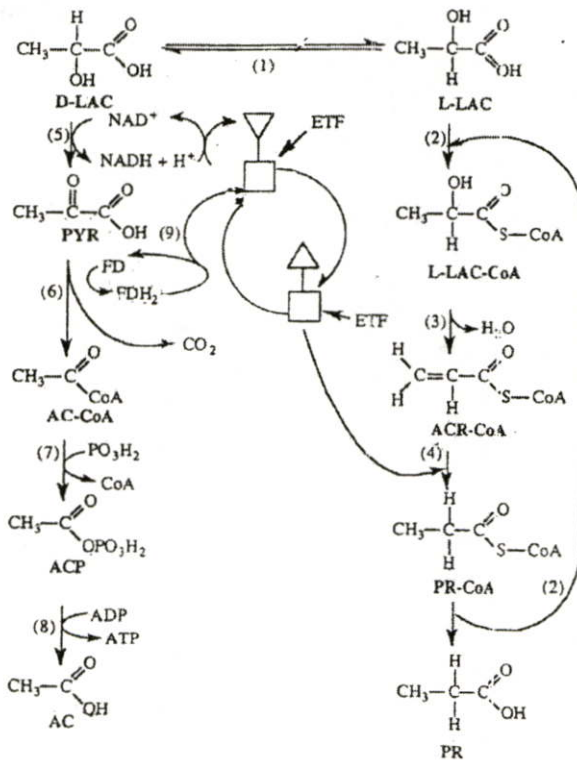
รูปที่ 2.4 วิธีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสโดยเชื้อ *Propionibacterium*

ที่มา : Papoutsakis และ Meyer (1985)



รูปที่ 2.5 การสร้างซัคซิเนตและไพรูไวเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

ที่มา : Daniel (1995)



รูปที่ 2.6 วิธีอะครีเลตของการสร้างไพรูไวเนต

ที่มา : Daniel (1995)

Champange และคณะ (1989) ศึกษาพบว่าเชื้อ *P. shermanii* สายพันธุ์ B-123 ที่ถูกตรึงใน แคลเซียมอัลจินเตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วยหางนมและแลคเตดในการผลิตกรดโพรพิโอนิก จะใช้แลคเตดในการเจริญได้ดีกว่าแลคโตสที่มีอยู่ในหางนม เนื่องจากหางนมที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักนี้ได้มาจากการผลิตเนยแข็งที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus* และ *Propionibacterium acidipropionici* ซึ่งมี pH ค่อนข้างเป็นกรด จึงต้องทำให้เป็นกลางด้วยการเติม โซเดียมหรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ก่อนที่จะทำการหมักด้วยเชื้อ *P. shermanii* B-123 และพบว่า อัตราการหมักจะสูงขึ้นเมื่อปรับ pH ของหางนมด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยความเข้มข้นของ แลคเตดที่ใช้อยู่ระหว่างร้อยละ 1-2

Lewis และ Yang (1992) ศึกษากระบวนการหมักกรดโพรพิโอนิกจาก *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 ที่ถูกตรึง โดยใช้แลคโตส กลูโคส และแลคเตด เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้ pH เริ่มต้นเท่ากัน แลคเตดจะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงกว่า แหล่งคาร์บอนอื่น

Suwanakham และ Yang (2005) ศึกษากระบวนการหมักกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* โดยใช้กลูโคส ซอร์บิทอล กลูโคเนต และไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ซอร์บิทอลให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด โดยการใช้ซอร์บิทอลสามารถเพิ่มอัตราการผลิตกรด โพรพิโอนิก เพิ่มปริมาณของกรดโพรพิโอนิกสุดท้าย และเพิ่มอัตราส่วนระหว่างโพรพิโอเนต ต่ออะซิเตต นอกจากนี้ยังลดผลผลิตของอะซิเตตและซักซิเนตอีกด้วย

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

Prescott และ Dunn (1959) พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีผลต่ออัตราการหมักและอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก โดย *Propionibacterium shermanii* สามารถใช้แหล่ง ไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด สารสกัดยีสต์ เป็นต้น แต่สารสกัดยีสต์เป็นแหล่ง ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

Colomban และคณะ (1993) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตโพรพิโอนิก โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด โปรตีนเวย์เข้มข้น เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าปริมาณ กรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

Yang และคณะ (1994) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปไนเวย์ ในการผลิตกรด โพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ สารสกัดยีสต์และทรีปติกเอสซอบรอต พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อใช้สารสกัดยีสต์ และทรีปติกเอสซอบรอตเติมลงไปไนเวย์ปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

2.6.3 แหล่งเกลือแร่

Gebgardt และคณะ (1970) รายงานว่าโคบอลต์มีอิทธิพลต่อการเจริญของเซลล์ โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโคบอลต์ร้อยละ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเชื้อ *Propionibacterium shermanii* ร้อยละ 55 - 60 ของน้ำหนักแห้ง แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโคบอลต์การเจริญของเชื้อจะลดลง

Quesada-Chanto และคณะ (1994) รายงานว่าเหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium shermanii* โดยปริมาณ $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญ

2.6.4 แหล่งวิตามิน

Thompson (1943) ทำการศึกษาพบว่า กรดแพนโททินิกและไบโอติน เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของ *Propionibacterium shermanii* และ โดย *Propionibacterium jensenii*

2.6.5 pH ของอาหาร

Lewis และ Yang (1992) ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าเมื่อใช้แลคเตดเป็นสารที่ใช้ในการหมักซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.6 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ pH เริ่มต้น 6.0 และ 5.5

Colomban และคณะ (1993) ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยทำการศึกษาเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium freudenreichi* subsp. *freudenreichii*, *Propionibacterium freudenreichi* subsp. *shermanii* ที่ pH 5.5 6.0 6.5 7.0 และ 7.5 พบว่าเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ที่ทำการหมักโดยใช้ pH เริ่มต้น 6.5 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

2.6.6 อุณหภูมิ

Cavin และคณะ (1985) รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Propionibacterium* sp. อยู่ระหว่าง 30 -35 องศาเซลเซียส

Colomban และคณะ (1993) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์ โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 5958 โดยทำการทดลองอุณหภูมิในการหมักแบบกะ ในช่วง 20 - 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณผลผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการหมักสูงสุด

Quesada-Chanto และคณะ (1994) รายงานว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* NRRL B3569 จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตวิตามินบี 12 Himmi และคณะ (2000) ศึกษาพบว่าในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอล โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 255562 ในการหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการใช้ซับสเตรตสูงสุด 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเท่ากับ 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.6.7 การให้อากาศ

Menon และ Shemin (1967) ศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ เชื้อ *Propionibacterium shermanii* ภายใต้สภาวะมีอากาศ อัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกจะต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ศึกษาการให้อากาศในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* NRRL B3569 พบว่า มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกดีที่สุดในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตกรดแอซีติก และการผลิตวิตามินบี 12 จะเพิ่มมากขึ้น

2.6.8 แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO₃)

O'Brien และคณะ (1990) รายงานว่า การเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 1.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเวย์ผงเป็นส่วนประกอบหลัก มีปริมาณผลผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อผสมของ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* เท่ากับ 0.88 กรัมต่อกรัมซับสเตรต

Michelson และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* SIM-7DSM 14043 เปรียบเทียบกับเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073 เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณ 50 กรัมต่อลิตรในอาหารที่ใช้ทำการหมัก พบว่าเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ผลิตกรดแลกติกได้ 52 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 และเชื้อ *Bacillus coagulans* ผลิตกรดแลกติกได้ 56 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 10

สุรนารถ (2550) ศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต ที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์ ในการหมักแบบกะ โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม CaCO₃ ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 20.66 กรัมต่อลิตร สูงกว่าอาหารที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งให้ผลผลิต 11.30 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากอาหารที่มีการเติม แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 1.5 2 และ 2.5 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

2.7 เวย์ (Whey)

เวย์ (Whey) คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ เอาโปรตีนเคซีน (Casein) และไขมันเกือบทั้งหมด ออกจากนม เป็นผลพลอยได้จากการทำเนยแข็ง ส่วนประกอบของเวย์ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของ น้ำนมที่นำมาใช้ทำเนยแข็ง โดยทั่วไปเวย์มีปริมาณแลคโตสร้อยละ 4-5 โปรตีนร้อยละ 1 และ เกลือแร่ร้อยละ 1 (Roukas. 1998)

เวย์มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีค่อนข้างเขียวอมเหลือง (Marshall, 1982) การเก็บเวย์ไว้ ชั่วระยะเวลาหนึ่ง จะมีน้ำตาลแลคโตสลดลง และมีกรดแลคติกเพิ่มขึ้น โดยปกติเวย์จะนำไปใช้ โดยตรง หรืออาจทำให้อยู่ในรูปของเวย์เข้มข้น หรือเวย์ผงเสียก่อน แล้วนำไปใช้ผสมอาหารแห่ง สำหรับคน บางครั้งนำเวย์ไปใช้ผลิตน้ำตาลแลคโตสเป็นอุตสาหกรรมได้ ลักษณะของเวย์แสดงดัง รูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 เวย์

ที่มา : [www. food.oregonstate.edu/ images/cheese/whey.jpg](http://www.food.oregonstate.edu/images/cheese/whey.jpg)

2.7.1 ประเภทของเวย์

เวย์แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามความเป็นกรด (Titable acidity) ได้แก่

1. สวีทเวย์ (Sweet whey) เป็นผลผลิตพลอยได้จากการบวกรวมการผลิตเนยแข็งชนิดแข็ง เช่น เชดดาร์ (Cheddar cheese) เกาดาร์ (Gouda cheese) สวิส (Swiss cheese) เป็นต้น มีค่าความเป็น กรดประมาณร้อยละ 0.10 – 0.20 และมีค่า pH ระหว่าง 5.8 – 6.1

2. แอซิดเวย์ (Acid whey) เป็นผลผลิตพลอยได้จากการตกตะกอนนม โดยการเติมกรดหรือ เกลือแร่ลงไปโดยตรงในการผลิตเนยแข็งชนิดอ่อน เช่น คอทเทจ (Cottage) เป็นต้น มีค่าความ เป็นกรดประมาณร้อยละ 0.40 – 0.60 และมีค่า pH ระหว่าง 4.0 – 5.0 (Kosikowski. 1977)

สรุปองค์ประกอบที่แตกต่างของเวย์ทั้งสองชนิดดังตารางที่ 2.3

2. โปรตีน

โปรตีนในเวย์เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนในน้ำนมซึ่งเป็นโปรตีนตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง ดังแสดงในตารางที่ 2.4 โปรตีนในเวย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ เบตาแลคโตโกลบูลิน (Beta-lactoglobulin) และ แอลฟาแลคทอลบูมิน (Alpha-lactalbumin) โดยเบตาแลคโตโกลบูลินจะมีอยู่ประมาณร้อยละ 50-60 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือเจือจาง สามารถตกตะกอนได้ด้วยเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) โปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในแง่การให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลว (วรรณ. 2532) ส่วน แอลฟาแลคทอลบูมิน มีอยู่ประมาณร้อยละ 15-20 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนได้เมื่อถูกความร้อน ส่วนที่เหลือ คือ ซีรัมอัลบูมิน อิมมูโนโกลบูลิน เอนไซม์ต่างๆ และ โปรตีนอื่นๆ (Webb และ Whitter. 1970) ความแตกต่างขององค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์แสดงไว้ในตารางที่ 2.5 และข้อมูลเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในโปรตีนอ้างอิงของ FAO โปรตีนจากไขมัน และเวย์แสดงดังตารางที่ 2.6 (Renner. 1983)

ตารางที่ 2.4 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในนม เคซีน และเวย์

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

ที่มา : Renner (1983)

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์

ชนิดของโปรตีนในเวย์	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโปรตีน	ค่า pH	น้ำหนักโมเลกุล คาลตัน x 10 ³
แอลฟาแลคโตโกลบูลิน	3.0	50	5.3 – 5.5	18.3
เบตาแลคทอโกลบูลิน	0.7	12	4.2 – 4.5	14
โปรตีนเอสเปปโดน	1.4	23	-	4.1 – 4.8
โบรวิน ซีรัม อัลบูมิน	0.3	5	5.1	69
อิมมูโนโกลบูลิน	0.6	10	5.5 – 8.3	15 – 1000
แลคโตเฟอร์รีน	0.05	0.8	9.0	81 – 84
แลคโตเพอร์ออกซิเดส	0.03	0.5	9.6	89

ที่มา : Marshall (1982)

ตารางที่ 2.6 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในโปรตีนอ้างอิงของ FAO จากไข่ นม และเวย์

กรดอะมิโนจำเป็น	ปริมาณ (กรัม/ 100 กรัมโปรตีน)			
	โปรตีน อ้างอิง	โปรตีนไข่	โปรตีนนม	โปรตีนเวย์
ทริปโตเฟน	1.0	1.5	1.4	2.3
ฟีนิลอะลานีน + ไทโรซีน	6.0	10.5	10.5	7.3
ลิวซีน	7.0	9.1	10.4	11.1
ไอโซลิวซีน	4.0	6.7	6.4	6.8
ทรีโอนีน	4.0	5.1	5.1	8.0
เมทไทโอนีน + ซีสทีน	3.5	5.9	3.5	4.8
ไลซีน	5.5	6.9	8.3	9.9
วาเลอีน	5.0	7.5	6.8	6.8
รวม	36.0	53.2	52.5	56.8

ที่มา : Renner (1983)

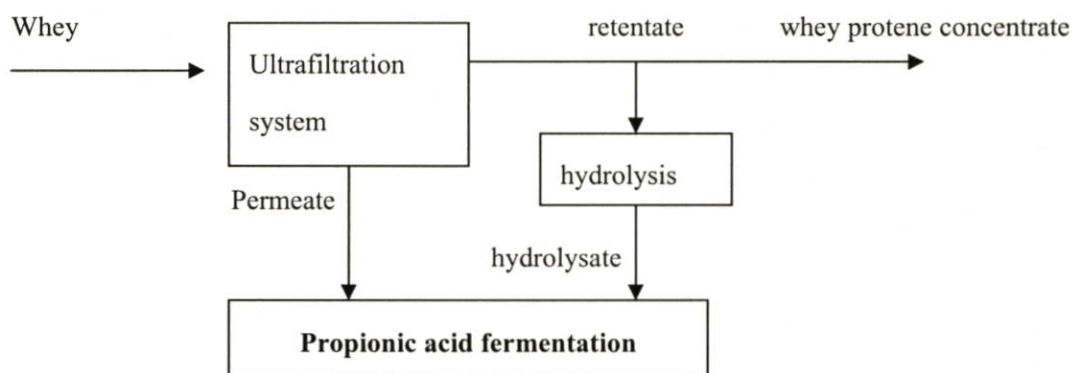
2.7.3 การใช้ประโยชน์จากเวย์

เนื่องจากเวย์ก่อให้เกิดปัญหาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นักวิจัยจึงได้ศึกษาหาทางนำเวย์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังมีรายงานการใช้ประโยชน์จากเวย์ดังนี้ (ชลัท. 2534)

Whey permeate

Whey permeate เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเวย์มาผลิตเป็นโปรตีนเวย์เข้มข้น มีน้ำตาลแลคโตสและไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้เป็นส่วนประกอบหลัก จึงมีความสนใจในการนำ

Whey permeate มาใช้แทนแหล่งคาร์บอนอื่นที่มีราคาแพงด้วยวิธีการทางชีวภาพ ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ขั้นตอนการผลิตและการใช้ประโยชน์ของ Whey permeate

ที่มา : Fitzpatrick และ Keefe (2001)

โปรตีนเวย์เข้มข้น

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่ละลายได้และโปรตีนที่ตกตะกอน มีวิธีการทำคือ นำเวย์มาทำให้มีสภาพเป็นกลาง ต่อมานำไปประเหยจนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับร้อยละ 62 ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกเพื่อเอาแลคโตสและเกลือแร่ออกมาให้เหลือแต่โปรตีนจากนั้นนำไปกรอง จะได้เป็นโปรตีนเวย์เข้มข้นสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 5 เดือน นำไปใช้ในการผลิตอาหารเด็ก ผลิตภัณฑ์ขนมอบและไอศกรีม (ชลัท. 2534)

ผลิตภัณฑ์แลคโตส

เวย์ที่สามารถนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์แลคโตสได้นั้นสามารถใช้ได้ทั้งเวย์สดและเวย์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกแล้ว ผลิตภัณฑ์แลคโตสสามารถนำมาผลิตเป็นลูกกวาด ใช้เป็นสารขจัดฟืนในยาสีฟัน ใช้เป็นสารป้องกันการจับตัวเป็นก้อน(ชลัท. 2534)

การผลิตเนยแข็งจากเวย์

นำเวย์มาระเหยภายใต้สภาพสุญญากาศจนมีความเข้มข้นร้อยละ 80 แล้วจึงลดอุณหภูมิ ก่อนที่จะบรรจุพิมพ์ ตัวอย่างเนยแข็งจากเวย์ ได้แก่ ไมซอสท์ (Mysost) จีทอสท์ (Gjetost) พูลทอสท์ (Putost) ซูพริ้ม (Supriam) เป็นต้น (ชลัท. 2534)

เอทานอลและเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์

เวย์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็งนำมาเป็นสารอาหารในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลได้ เนื่องจากมีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ แต่ปัญหาหลักในการใช้เวย์เป็นซับสเตรตคือ มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้แลคโตสได้และอัตราการใช้แลคโตสค่อนข้างช้า ซึ่งเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการผลิต ควรทำให้เวย์มีความเข้มข้นของแลคโตสร้อยละ 15 บางครั้ง

ต้องมีการกำจัดแร่ธาตุที่มีอยู่ในเวย์ (demineralization) หรือกำจัดโปรตีนออก เพื่อให้การหมักอยู่ในสภาพที่เหมาะสม มีการเติมสารอื่น ๆ ได้แก่ เกลือแร่ ไนโตรเจน ฟอสเฟต และวิตามิน

เครื่องคั้นไม่มีแอลกอฮอล์

เครื่องคั้นไม่มีแอลกอฮอล์ ผลิตโดยการผสมเวย์ที่พาสเจอร์ไรซ์และกำจัดกลืนแล้ว นำมาผสมกับน้ำผลไม้เข้มข้น สารให้กลิ่น สี รส และสารกันบูด

โปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein, SCP)

มีรายงานการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเวย์โดยใช้จุลินทรีย์ต่างๆ การใช้โปรตีนเซลล์เดียวเป็นอาหาร สิ่งที่ต้องคำนึงถึงมาก คือ functional properties ของโปรตีนเอง ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้แปรเปลี่ยนตามจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต ชับสเตรต และกระบวนการแปรรูป ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ยังต้องคำนึงการยอมรับของผู้บริโภค มีการเสนอให้ใช้คำว่า “Lactoprotein” สำหรับโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตจากเวย์

สารอื่น ๆ จากหางนม

โปรตีนในนมและแลคโตสมีบทบาทสำคัญต่อลักษณะเนื้อสัมผัส (texture) กลิ่นรส และสีในพวกขนมหวาน เบเกอรี่ ได้มีการพัฒนาสารทดแทนโกโก้โดยใช้ของแข็งจากเวย์และสารประกอบกลิ่นรสตามธรรมชาติหรือสังเคราะห์ สารทดแทนโกโก้ที่ใช้ในเครื่องคั้น ไอซิ่ง น้ำเชื่อม เป็นต้น การหมักเวย์เพื่อผลิตสารให้กลิ่นรสของชีอิว มีการผลิตเนยแข็งชนิดใหม่ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนจากนมและพืช ซึ่งแยกจากเมล็ดคั่วเมล็ด ถั่ว เมล็ดทานตะวัน และเมล็ดฝ้าย การแยกไรโบฟลาวินจากผลิตภัณฑ์นมหรือเวย์เป็นสิ่งที่น่าสนใจเช่นกัน เนื่องจากการสังเคราะห์ไรโบฟลาวินมีราคาแพง วิธีการแยกโดยให้หางนมผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ neutral resin ซึ่งจะดูดซับไรโบฟลาวินไว้ จากนั้นใช้อะซิโตนชะไรโบฟลาวินออก

โดยทั่วไปเวย์จะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง ถ้าเปรียบเทียบค่า BOD ระหว่างน้ำเสียที่ปล่อยลงแม่น้ำลำคลองควรบำบัดน้ำจมนมีค่า BOD เหลือประมาณ 20 แต่เวย์มีค่า BOD อยู่ระหว่าง 4,000 – 4,800 ซึ่งเป็นอันตรายค่อนข้างสูง (Scott, 1986) ดังนั้นถ้าไม่ลดการทำงานและการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะมีผลทำให้แลคโตสเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดแลกติกอย่างรวดเร็วทำให้ความเป็นกรดของเวย์สูงขึ้นและเกิดการเสื่อมเสียในที่สุด (ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ, 2526) ดังนั้นเพื่อคงรักษาคุณภาพของเวย์ (Alfa - Laval, 1987) ได้แนะนำวิธีเก็บรักษาเวย์ไว้ 2 ทาง คือ ทางตรงและทางอ้อม

การเก็บรักษาทางตรงทำได้ 3 วิธี คือ การใช้ความเย็นที่อุณหภูมิ 0 – 5 องศาเซลเซียส วิธีนี้สามารถเก็บรักษาได้นาน 10 – 15 ชั่วโมง การใช้ความร้อนโดยวิธีพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สามารถเก็บรักษาได้นานกว่าและวิธีสุดท้าย คือ การใช้สารเคมี ได้แก่ โซเดียมไบซัลเฟตหรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การเก็บรักษาทางอ้อมสามารถทำได้โดยนำเวย์ผ่านกระบวนการอย่างใดอย่างหนึ่งที่เหมาะสม ได้แก่ การทำเป็นเวย์ผงหรือเวย์เข้มข้น

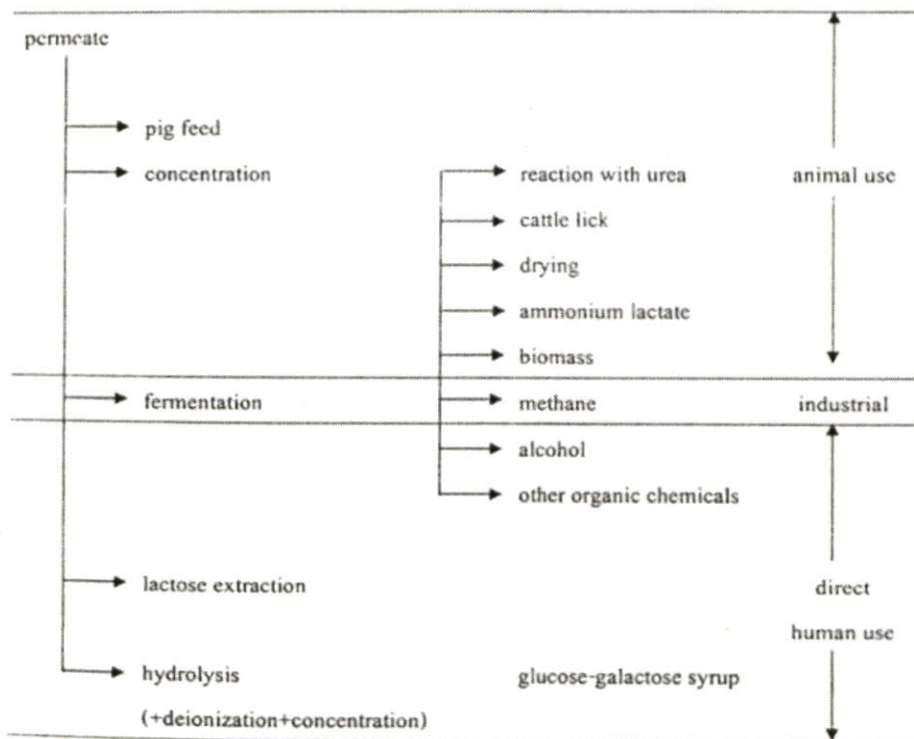
นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาวิจัยที่นำเวย์มาใช้ประโยชน์อื่นๆ ดังนี้

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

Champagne และคณะ(1988) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเซลล์ดั้งเดิมของเชื้อ *Propionibacterium shermanii* B-123 โดยใช้เวย์ที่ผ่านกระบวนการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus helveticus* var milano L-89 เป็นซับสเตรดในการทดลอง พบว่าผลผลิตกรดโพรพิโอนิกที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

Yang และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ร่วมกับเชื้อ *Streptococcus lactis* OSU No.588 โดยใช้เวย์เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ในถังหมักแบบ Fibrous Bed พบว่าได้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก ร้อยละ 46 ของปริมาณแลคโตสที่มี และเมื่อเติมยีสต์สกัดและทริปทิเคสขอยบรอตลงในอาหารเวย์ จะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตและผลผลิตให้สูงขึ้น

แผนผังความเป็นไปได้ในการนำเวย์มาใช้ประโยชน์แสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 ความเป็นไปได้ที่จะนำเวย์มาใช้ประโยชน์

ที่มา : Pedersen และ Werner (1978)

2.8 ระบบตรึงเซลล์ (บุษบา. 2542)

2.8.1 ความหมายของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขต หรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณที่ทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (Chibata และคณะ. 1978)

2.8.2 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการตรึงเซลล์กับวิธีอื่นๆ (Cheetham. 1980)

2.8.2.1 การเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมี

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับตัวเร่งทางเคมี คือ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะปกติ และใช้พลังงานต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง ปัญหาการเกิดมลภาวะมีน้อย แต่เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียบางประการ คือ ต้องการสารประกอบเชิงซ้อน เช่น โคแฟกเตอร์ต่างๆ ในการเกิดปฏิกิริยา และมีความคงทนน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี

2.8.2.2 การเปรียบเทียบกับเซลล์หรือเอนไซม์อิสระ

เซลล์ที่ถูกตรึงได้เปรียบกว่าเซลล์หรือเอนไซม์อิสระ คือ สามารถใช้เซลล์จำนวนมากๆ ศึกษาในถังปฏิกริยาขนาดเล็กได้ ในการผลิตควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย สามารถแยกผลผลิตออกได้สะดวก และไม่มีปัญหาในการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้ลดต้นทุนในการผลิตลงได้มาก แต่การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ และอาจสูญเสียความสามารถระหว่างการตรึงได้

2.8.2.3 การเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึง

การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงในกรณีที่กระบวนการผลิตนั้นต้องใช้ระบบเอนไซม์หลายชนิด โคแฟกเตอร์ และสารพลังงานสูงอื่นๆ นอกจากนี้การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงไม่ต้องใช้กระบวนการสกัดและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ จึงเป็นผลให้เอนไซม์ยังคงมีประสิทธิภาพสูง ทำให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้นและยังลดค่าใช้จ่ายอีกด้วย แต่การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งสามารถผลิตสารที่ไม่ต้องการออกมายับยั้งผลผลิตได้ และเซลล์ที่ถูกตรึงยังถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของซับสเตรตและผลผลิตโดยสารที่ใช้ตรึงเซลล์ นอกจากนี้อาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตจากตัวเซลล์หรือสารที่ถูกขับออกจากเซลล์ตรึง ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองเนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานานหรือเซลล์ร่วงไหลเนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงมีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น

2.8.3 การคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้น คุณสมบัติของสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีจึงมีข้อแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกัน คือ คุณสมบัติทางกลไก (mechanical properties) คุณสมบัติทางฟิสิกส์ ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมทางฟิสิกส์ สารเคมี การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ ความชอบน้ำ (hydrophilicity) ความซึมซาบ (permeability) ราคาและการยอมรับ

หลักในการพิจารณาคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์มีดังนี้

2.8.3.1 คุณสมบัติในการละลาย

ควรจะมีการละลายและผสมเซลล์ให้เข้ากับสารละลายของสารพอลิเมอร์ได้ง่าย และสารผสมที่ได้มีความคงตัวอยู่ในสถานะที่เป็นของเหลว

2.8.3.2 คุณสมบัติในการเกิดเจล

สารผสมที่ได้ควรจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเจลด้วยวิธีง่ายๆ ภายใต้สภาวะปกติ และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์หรือเซลล์จุลินทรีย์

2.8.3.3 คุณสมบัติของเจล

เจลที่ได้ควรมีความแข็งแรงและความคงตัวสูง ขนาดของรูที่อยู่ภายในเจลควรจะเล็กพอที่จะป้องกันการรั่วไหลของเซลล์ได้ แต่ซัพสเตรตและผลผลิตที่เกิดขึ้นสามารถซึมผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ

2.8.4 คุณสมบัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

2.8.4.1 ความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการผลิต เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงแตกต่างจากเซลล์อิสระ เนื่องจากสารตัวนำเป็นอุปสรรคต่อการซึมผ่านเข้าออกของสารอาหารและผลผลิต ในกรณีองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงมีโมเลกุลสูง ความสามารถของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมักจะต่ำลงด้วย (Chibata และคณะ. 1978)

2.8.4.2 ความเป็นกรดค้างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เมื่อเปรียบเทียบความเป็นกรดค้างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงอาจเปลี่ยนแปลงไปในทางด้านความเป็นกรด ความเป็นค้าง หรือไม่เปลี่ยนแปลงเลย

2.8.4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เซลล์ที่ถูกตรึงคงทนต่อความร้อนได้ดีกว่าเซลล์อิสระ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงมักมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระ

2.8.4.4 ความคงตัวของเซลล์ที่ถูกตรึง มีความคงทนในการใช้งานได้สูงกว่าเซลล์อิสระ คือสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีความสามารถทนต่อสารเคมีและการเสื่อมสภาพทางฟิสิกส์ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (Cheetham และคณะ. 1979)

2.8.5 วิธีการตรึงเซลล์แบบต่างๆ

วิธีการตรึงเซลล์แบ่งเป็น 3 วิธีหลักๆ ได้แก่ การยึดด้วยตัวนำ การเชื่อมแบบไขว้ และการห่อหุ้ม

2.8.5.1 การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) หมายถึง การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งวิธีที่นิยมใช้แบ่งย่อยได้เป็น 2 วิธี คือการดูดซับและการยึดด้วยแรงโควาเลนต์

การดูดซับ เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับกับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิก หรือพันธะไฮโดรเจน โดยอาศัยหลักทางเคมี เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย หรือยีสต์ ประกอบด้วย กรดไดอะมิโนไพเมลิก (diaminopimelic acid) และเฮกซามีน (hexosamines) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาไอออนิก (ionic interaction) กับตัวนำที่ใช้ได้ โดยแรงดูดซับนี้จะขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของเซลล์รวมทั้งปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องด้วย การตรึงเซลล์วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนและมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยน pH การเกิดฟองอากาศ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการผลผลิตที่ปราศจากการปนเปื้อนของเซลล์ สำหรับข้อเสียอีกประการคืออัตราการดูดซับของเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยตัวนำค่อนข้างต่ำ แต่อาจปรับแก้ไขได้โดยใช้สารที่มีรูพรุนเป็นตัวดูดซับ สารที่ใช้เป็นตัวดูดซับในวิธีนี้ได้แก่ เม็ดแก้ว (glass bead) เซลลูโลสดัดแปลง (modified cellulose) และแอนทราไซท์ (anthracite)

การยึดด้วยแรงโควาเลนต์ เป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่เชื่อมเซลล์โดยตรงกับแอคทีเวทซัพพอร์ต (activated support) โดยสารที่ใช้เชื่อมนั้นสามารถต่อกับส่วนประกอบที่ผิวเซลล์ ได้แก่ กลุ่มอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มไฮดรอกซิล กลุ่มอิมิดาโซล หรือกลุ่มฟีนอลของโปรตีน วิธีนี้มีข้อดี คือ เซลล์จะเชื่อมกับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดีและมีการรั่วไหลของเซลล์ได้น้อย แต่ก็มีข้อเสียเนื่องการวิธีนี้ใช้สภาวะค่อนข้างรุนแรงและความเป็นพิษของสารที่ใช้ อาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการเอนไซม์เพียงชนิดเดียวและเอนไซม์ที่ต้องการนั้นเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งไม่ต้องสัมผัสกับสารเคมีที่ใช้ระหว่างเตรียม สารที่ใช้เป็นตัวยึดเซลล์ด้วยวิธีนี้ได้แก่ ไททาเนียม (titanium) เม็ดแก้ว (glass bead) เซอร์โคเนียมไฮดรอกไซด์ (zirconium hydroxides) เป็นต้น

2.8.5.2 การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method) หมายถึง การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวก bi หรือ multifunctional reagent เช่น กลูทาร์ลดีไฮด์ (glutaraldehyde), โทลูอีน (Toluene), และไดไอโซไซยาเนต (diisocyanate) เป็นต้น (Chibata และคณะ. 1970)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ต่างจากวิธีอื่นๆ คือ เซลล์ไม่ได้ถูกตรึงอยู่กับสารที่เป็นตัวดูดซับหรือถูกห่อหุ้มอยู่ในเจล หรือในเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) แต่เป็นการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันโดยใช้สารเคมีภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างจะรุนแรง ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถ

ในการดำรงชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับใช้ในปฏิกิริยาเชิงเดี่ยวเท่านั้น

2.8.5.3 การห่อหุ้ม (entrapping method) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบคือ การห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูล (microcapsulation) และการห่อหุ้มแบบร่างแห (lattice type)

การห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูล หมายถึง การห่อหุ้มเซลล์ด้วยพอลิเมอร์เยื่อบางกึ่งซึมซาบได้ (semipermeable membrane) เช่น คอลลอยด์เยน หรือ ซิลิโคน ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้ซับสเตรตและผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงเซลล์วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่ไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นการใช้ประโยชน์จึงมีจำกัด นิยมใช้ในการผลิตยารักษาโรคและงานวิเคราะห์ทั่วไป (Cheetham. 1980)

การห่อหุ้มแบบร่างแห หมายถึงการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ไว้ในช่องว่าง 3 มิติ ในเจลของสารพอลิเมอร์ที่ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ (matrix) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์เกือบทุกชนิด ในขณะที่วิธีการอื่นมีความจำเพาะและข้อเสียเปรียบมากกว่า (Cheetham. 1980) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการห่อหุ้มนี้นิยมใช้สารพวก biochemically inert hydrogel เป็นตัวห่อหุ้ม โดยใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดโครงร่าง 3 มิติ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน โดยกลไกในการเกิดเจลนั้นมีหลายแบบ คือ การจับแบบโควาเลนต์ (covalent binding) เช่น การเกิดพอลิเมอร์ไรซ์ของพอลิอะคริลาไมด์ การใช้แรงไอออนิก เช่น แคลเซียมอัลจินเต การกระจาย (precipitation) โดย pH อุณหภูมิ หรือการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลาย เช่น คอลลาเจน คาราจีแนน พอลิสไตรีน สำหรับสารที่นิยมใช้เป็นตัวห่อหุ้มและประสบความสำเร็จในระดับอุตสาหกรรมมาแล้วได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ คาราจีแนน และแคลเซียมอัลจินเต

มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดอินทรีย์ ดังนี้

Champagne และคณะ (1989) รายงานผลการผลิตกรดอินทรีย์จากเชื้อ *Propionibacterium shermanii* B-123 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเต เลี้ยงเชื้อในเวย์ที่ผ่านการหมักจากเชื้อ *Lactobacillus helveticus* และทำให้เป็นกลางด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ จะมีปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ร้อยละ 0.8 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกรดแอซิดิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้อุณหภูมิในการหมัก 37 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้มีปริมาณลดลง ในขณะที่กรดแอซิดิกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงขึ้น อีกทั้งกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้มีผลทำให้เชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง

Yang และคณะ (1994) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์และแลคโตสโดยใช้เซลล์ตรึงของ *Propionibacterium acidipropionici* ในสภาวะการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเวย์ที่มีปริมาณแลคโตส 45 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 20 กรัมต่อลิตร

ในระยะเวลาการหมัก 55 ชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาณผลผลิตที่สูงกว่าและใช้เวลาในการหมักน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระ

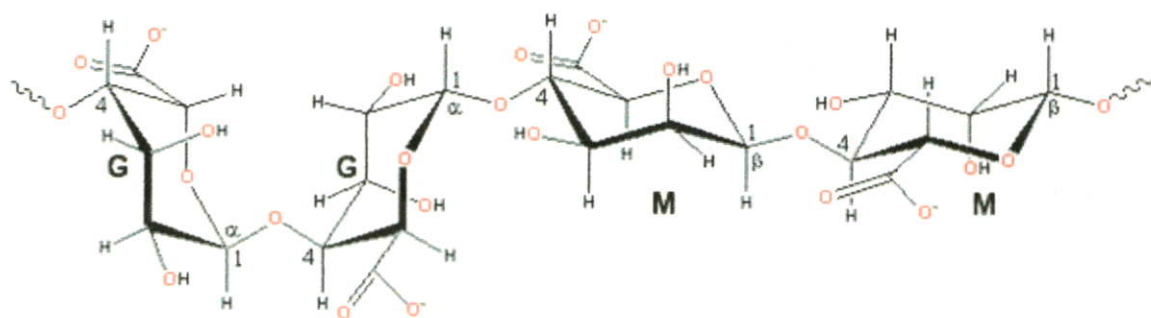
Rickert และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium thoenii* P20 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเต โดยใช้กลูโคสและแลคเตตเป็นซับสเตรต วิเคราะห์ผลที่รอบที่ 6 ของระยะการหมัก พบว่าเมื่อใช้กลูโคส ปริมาณ 75 กรัมต่อลิตร และแลคเตตปริมาณ 42 กรัมต่อลิตร จะได้ผลผลิตโพรพิโอนีต 34 กรัมต่อลิตร และ 22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Ates และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *Aspergillus niger* เปรียบเทียบระหว่างเซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเต โดยมีน้ำมันซิลิโคนช่วยในการเติมออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการใช้เซลล์ตรึงให้ผลผลิตกรดซิตริก 13 กรัมต่อลิตร มากกว่าการเลี้ยงเซลล์อิสระที่ให้ปริมาณผลผลิต 4 กรัมต่อลิตร และในการทดสอบประสิทธิภาพในการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ พบว่า เซลล์ตรึงของเชื้อ *Aspergillus niger* สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 4 รอบการหมัก แต่เมื่อปริมาณรอบการหมักเพิ่มขึ้น ผลผลิตที่ได้จะลดลง เนื่องจากการสะสมของกรดซิตริกในเม็ดเจล ทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ซิเตรท ซินเทส (citrate syntase) ที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก

Suwannakham และ Yang (2005) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ ATCC 4875 เปรียบเทียบระหว่างการใช้เซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักแบบ fibrous bed โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักแบบ fibrous bed ให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 71.8 ± 0.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระถึงร้อยละ 20 – 59

2.9 อัลจินเนต

เป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล หรือผลิตจาก *Ascophyllum* และ kelp มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลิเมอร์ร่วมของ D-manuronic acid และ L-guluronate acid โครงสร้างโมเลกุลของอัลจินเนตแสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 โครงสร้างโมเลกุลของอัลจินเนต

อัลจินเตสามารถเกิดเป็นเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะโพสิวาเลนต์ เช่น อลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}) และแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจินเตทำได้โดยผสมเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมอัลจินเต แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดเจลของแคลเซียมอัลจินเตขึ้นทันที และหลังจากนั้นควรแช่เจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อีก อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดเจลอย่างสมบูรณ์ (Bucke, 1982) คุณสมบัติของเจลที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของอัลจินเตที่ใช้ โดยอัลจินเตที่มี G residues สูงจะทำให้เกิดเจลที่มีความแข็งแรงสูงด้วย นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของไอออนของโลหะและปริมาณเซลล์ที่ใช้ด้วย (Cheetham และคณะ, 1979)

การใช้แคลเซียมอัลจินเตในการตรึงเซลล์มีข้อดีหลายประการ คือ ทำได้ง่ายภายใต้สภาวะปกติ สะดวก รวดเร็ว ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจินเตยังเป็นวิธีที่ปลอดภัย เนื่องจากแคลเซียมอัลจินเตเป็นสารที่ไม่เป็นพิษและยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารมาเป็นเวลานานแล้ว และเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเตสามารถแบ่งเซลล์ได้ภายในเจล ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวเร่งมีอยู่เป็นเวลานาน แต่เซลล์บางส่วนอาจหลุดออกนอกเจลได้ ทำให้เกิดการปนเปื้อนในผลผลิต และในบางสภาวะการใช้แคลเซียมอัลจินเตในการตรึงเซลล์อาจเกิดปัญหาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ใช้สารคีเลท (chelating agents) เช่น สารประกอบฟอสเฟต และ อีดีทีเอ (EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid) ซึ่งสามารถดึงแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ออกจากเจลได้ และธาตุที่มีประจุบวกบางชนิด เช่น แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) และโพแทสเซียมไอออน (K^+) ซึ่งสามารถเข้าไปแทนที่แคลเซียมไอออนได้ ทำให้เจลไม่คงตัว เกิดการละลายได้ อย่างไรก็ตามคุณสมบัติข้อนี้ของอัลจินเตสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาการตรวจนับการเจริญของเซลล์ภายในเจลได้ สำหรับการแก้ปัญหาการละลายของเจลเมื่อสารคีเลทนั้น ทำได้โดยใช้สตรอนเซียมหรือแบเรียมแทนแคลเซียม จะทำให้เกิดเจลที่มีความคงตัวมากกว่าแต่จะไม่เป็นที่ยอมรับในกรณีที่ผลผลิตที่ได้เกี่ยวข้องกับการใช้ในอาหาร (Cheetham และคณะ, 1979)

ปกติอัลจินเตจะถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการทำให้สารละลายข้นและคงตัว ปัจจุบันใช้เป็นสารตัวนำในการตรึงเอนไซม์ เซลล์จุลินทรีย์ และคลอโรพลาสต์ ไมโทคอนเดรีย และเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจินเตนิยมใช้ศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์ เช่น การย่อยสลายฟีนอล การผลิตแอลกอฮอล์ สารปฏิชีวนะ สเตียรอยด์ เป็นต้น และยังสามารถใช้สำหรับการจัดแต่งทรงผม ใช้ทำเหยื่อปลอมสำหรับตกปลา ช่วยในการย้อมสีเส้นใย และใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ดูแลรักษาบำรุง เช่น ยาสระผม เครื่องสำอาง สบู่เจล

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้อัลจินตในการตรึงเซลล์เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก มีดังนี้

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาการตรึงเซลล์ของเชื้อ *P. acidipropionici* P200910 เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยทำการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมอัลจินตที่ใช้ในการตรึงเซลล์ พบว่าโซเดียมอัลจินตความเข้มข้น 10-30 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินตน้อยกว่า 20 กรัมต่อลิตร จะทำให้เม็ดเจลมีความคงตัวน้อยลง

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท SHIMADZU รุ่น C-R7 Ae Plus (JAPAN)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่องอบลมร้อน ของบริษัท Binder

เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องวัด pH (ph meter) ของบริษัท Denver instrument รุ่น Model 215

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB-4000H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่อง peristaltic pump รุ่น PUMP drive PD 5201 ของบริษัท Heidolph

สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.89 มิลลิเมตร (TYGON TUBING 2-STOP) ของบริษัท Cole-Parmer Instrument

ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของบริษัท Phytotron climate simulator

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -70 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO รุ่น MDF-U 4086S

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ถังหมักขนาด 2 ลิตร (BIOSTAT B.)

ของ บริษัท B.Braun Biotech International GmbH, Germany

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^R

ฟลาสก์ (Erlenmyer flask) ของบริษัท PYREX^R

บีกเกอร์ (beaker) ของบริษัท PYREX^R

กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท PYREX^R

ปิเปตต์ (pipette)

คิวเวต (cuvette)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ยีสต์สกัด (yeast extract)

แลคโตส (lactose)

ทริปติกเคสซอยบรอต (trypticase soy broth)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

โคเดซิลเอมีน ($C_{12}H_{27}N$) ของบริษัท ACROS ORGANIC Code no. 117660010

ออกทานอล ($C_8H_{18}O$) ของบริษัท ACROS ORGANIC Code no. 118530010

กรดโพรพิโอนิก (CH_3CH_2COOH) ของบริษัท CARLO ERBA REAGENT s.r.l
Code no. 306254)

3.2 วัตถุดิบ

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

3.2.1 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

เก็บเวย์ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ก่อนใช้นำออกมาทำละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกโปรตีนออกจากเวย์ ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (ดัดแปลงจาก Kessler, 1981) แยกไขมันโดยกรองด้วยกระดาษกรอง Glass fiber (GC-50)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

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

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้วแทง (stap) ลงในอาหารแข็ง MRS : HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. India (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุก 2 สัปดาห์

3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ถ่ายเชื้อจำนวน 2 หลอดลงในอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่งเป็นเวลาอย่างน้อย 2 วัน เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Goswami และ Srivastava, 2000) ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จะได้หัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการวิจัย

3.4 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรด

โพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

ศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุด ดังนี้

- ชุดที่ 1 : ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในอาหาร MRS (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. India)
- ชุดที่ 2 : ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในอาหาร MRS (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. India) ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1
- ชุดที่ 3 : ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในอาหารดัดแปลง (สุรนารถ, 2550)
- ชุดที่ 4 : ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในอาหารดัดแปลงที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1 (สุรนารถ, 2550)
- ชุดที่ 5 : ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในอาหารเวย์ (สุรนารถ, 2550)
- ชุดที่ 6 : ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในอาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1 (สุรนารถ, 2550)

เตรียมอาหารแต่ละชุด (ภาคผนวก ก) ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตร 350 มิลลิลิตร (ร้อยละ 70) ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 (\pm 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกหนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2 ร้อยละ 5 (สุรนารถ, 2550) ลงในชุดการทดลองทั้ง 6 ชุด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Colomban และคณะ, 1993) ในสภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 336 ชั่วโมง วัดค่า pH ตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธีของ Dubois, 1956 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์

ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข) และวิเคราะห์การเจริญของเชื้อด้วยวิธี Total plate count (A.O.A.C. 2000 : ภาคผนวก ข)

3.5 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในลักษณะเซลล์อิสระ ในพลาสติกขนาด 2 ลิตรและในถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.5.1 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร

เลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 จากข้อ 3.4 มาศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับพลาสติกขนาด 2 ลิตร ดังนี้

เตรียมอาหารในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ปริมาตร 1.4 ลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 (\pm 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมห้วเชื้อจากข้อ 3.3.2 ร้อยละ 5 (สุรนาถ. 2550) ลงในชุดทดลองนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Colomban และคณะ. 1993) ในสถานะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 336 ชั่วโมง วัดค่า pH ตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธีของ Dubois. 1956 และน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธีของ Nelson. 1952 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข)

3.5.2 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 จากข้อ 3.4 มาศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ดังนี้

เตรียมอาหารในถังหมักขนาด 2 ลิตร (BIOSTAT B. : B.Braun Biotech International GmbH. Germany) ปริมาตร 1.4 ลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 (\pm 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมห้วเชื้อจากข้อ 3.3.2 ร้อยละ 5 (สุรนาถ. 2550) ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุม pH ที่ 6.5 กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที (Colomban และคณะ. 1993 ; Quesada-Chanto และคณะ. 1994 ; Goswami และ Srivastava. 2000) ไม่ต้องพ่นอากาศ เก็บน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง จนกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะคงที่ วัดค่า pH ตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

ทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธีของ Dubois. 1956 และน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธีของ Nelson. 1952 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข)

3.6 การศึกษาการตรึงเซลล์ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยวิธีหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (ดัดแปลงจากสุริย์. 2543)

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.3.2 ปริมาตรร้อยละ 5 นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 นำเซลล์ที่ปั่นแยกได้ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำเกลือที่ปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้นร้อยละ 1.7 ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

ดูดสารละลายเจลผ่านสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.89 มิลลิเมตร (TYGON TUBING 2-STOP) ของบริษัท Cole-Parmer Instrument ที่ประกอบเข้ากับเครื่อง peristaltic pump โดยปลายด้านหนึ่งของสายยางจุ่มอยู่ในสารละลายเจล ส่วนปลายอีกด้านอยู่เหนือสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับอัตราการไหลของสารละลายเจลให้เท่ากับ 7 มิลลิลิตรต่อนาที กดปุ่มเริ่มการทำงานของเครื่อง peristaltic pump เมื่อสารละลายเจลถูกปล่อยลงในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ เม็ดเจลของแคลเซียมอัลจิเนตจะเกิดขึ้นทันทีในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ จากนั้นนำเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ก่อนนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการศึกษาต่อไป

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเม็ดเจลของเซลล์ตรึง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก

3.7.1 การศึกษาระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเม็ดเจล

ศึกษาระยะทางที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์โดยทำการตรึงเซลล์ชื่อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ตามขั้นตอน 3.6 ซึ่งได้แบ่งการทดลองออกเป็น 8 ชุดทดลอง ดังนี้
ชุดที่ 1 : กำหนดระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของแคลเซียมคลอไรด์ 2 เซนติเมตร
ชุดที่ 2 : กำหนดระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของแคลเซียมคลอไรด์ 4 เซนติเมตร
ชุดที่ 3 : กำหนดระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของแคลเซียมคลอไรด์ 5 เซนติเมตร

- ชุดที่ 4 : กำหนดระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของแคลเซียมคลอไรด์ 6 เซนติเมตร
 ชุดที่ 5 : กำหนดระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของแคลเซียมคลอไรด์ 8 เซนติเมตร
 ชุดที่ 6 : กำหนดระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของแคลเซียมคลอไรด์ 10 เซนติเมตร
 ชุดที่ 7 : กำหนดระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของแคลเซียมคลอไรด์ 15 เซนติเมตร
 ชุดที่ 8 : กำหนดระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของแคลเซียมคลอไรด์ 20 เซนติเมตร

เตรียมอาหารในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 (\pm 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเซลล์ตรึงในรูปเม็ดเจลตามชุดทดลองแต่ละชุดที่เตรียมไว้ ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 336 ชั่วโมง วัดค่า pH ตลอดจนการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธีของ Dubois. 1956 และน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธีของ Nelson. 1952 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ปริมาณกรดโพธิ์ฟิโอนิกโดยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข)

3.7.2 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายเจล

เลือกระยะทางที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์จากข้อ 3.7.1 มาทำการศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายเจล (สารละลายแคลเซียมอัลจินเตความเข้มข้นร้อยละ 1.7 ผสมกับสารแขวนลอยของเซลล์) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดทดลอง ดังนี้

ชุดที่ 1 : กำหนดอัตราการไหลของสารละลายเจลเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อนาที

ชุดที่ 2 : กำหนดอัตราการไหลของสารละลายเจลเท่ากับ 6 มิลลิลิตรต่อนาที

ชุดที่ 3 : กำหนดอัตราการไหลของสารละลายเจลเท่ากับ 7 มิลลิลิตรต่อนาที

เตรียมอาหารในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 (\pm 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเซลล์ตรึงในรูปเม็ดเจลตามชุดทดลองแต่ละชุดที่เตรียมไว้ ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 336 ชั่วโมง วัดค่า pH ตลอดจนการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธีของ Dubois. 1956 และน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธีของ Nelson. 1952 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ปริมาณกรดโพธิ์ฟิโอนิกโดยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข)

3.8 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร และในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเม็ดเจลจากข้อ 3.7 มาทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร และในถังหมักขนาด 2 ลิตร ดังนี้

3.8.1 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ในอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

เตรียมอาหารในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ปริมาตร 1.4 ลิตร ไม่ต้องเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 (\pm 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเซลล์ตรึงในรูปเม็ดเจลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 336 ชั่วโมง วัดค่า pH ตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธีของ Dubois. 1956 และน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธีของ Nelson. 1952 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข)

3.8.2 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1

เตรียมอาหารในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ปริมาตร 1.4 ลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 (\pm 0.1) เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเซลล์ตรึงในรูปเม็ดเจลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 14 วัน เก็บน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 336 ชั่วโมง วัดค่า pH ตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธีของ Dubois. 1956 และน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธีของ Nelson. 1952 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข)

3.8.3 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 โดยไม่มีการควบคุม pH ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล

เตรียมอาหารในถังหมักขนาด 2 ลิตร (BIOSTAT B : B.Braun Biotech International GmbH, Germany) ปริมาตร 1.4 ลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 (\pm 0.1) เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ

1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเซลล์ตรึงในรูปเม็ดเจลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที (Colomban และคณะ. 1993 ; Goswami และ Srivastava, 2000) ไม่มีการเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อควบคุม pH ไม่ต้องพ่นอากาศ เก็บน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมงจนกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะคงที่ วัดค่า pH ตลอดจนการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธีของ Dubois. 1956 และน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธีของ Nelson. 1952 (ภาคผนวก ข) และวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข)

3.8.4 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ร่วมกับการใช้ ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 นอร์มัลในการควบคุม pH

เตรียมอาหารในถังหมักขนาด 2 ลิตร (BIOSTAT B. : B.Braun Biotech International GmbH, Germany) ปริมาตร 1.4 ลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 (\pm 0.1) เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเซลล์ตรึงในรูปเม็ดเจลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที ควบคุม pH 6.5 โดยใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในการควบคุมอัตโนมัติ (Colomban และคณะ. 1993 ; Quesada-Chanto และคณะ. 1994 ; Goswami และ Srivastava. 2000) ไม่ต้องพ่นอากาศ เก็บน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมงจนกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะคงที่ วัดค่า pH ตลอดจนการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธีของ Dubois. 1956 และน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธีของ Nelson. 1952 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข)

3.9 การศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึง *Propionibacterium acidipropionici*

ATCC 4965 โดยการนำมาใช้ซ้ำ เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

การศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ทำโดยเตรียมอาหารในถังหมักขนาด 2 ลิตร (BIOSTAT B. : B.Braun Biotech International GmbH, Germany) ปริมาตร 1.4 ลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 (\pm 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเซลล์ตรึงในรูปเม็ดเจลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการหมักโดยควบคุมสภาวะตามข้อ 3.8.3 เก็บน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมงจนถึงระยะที่ปริมาณกรดสูงสุดและคงที่ จากนั้นทำการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักออก

ล้างเซลล์ตรึงในรูปเม็ดเจลด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง นำอาหารเลี้ยงเชื้อชุดใหม่ที่ผ่านมาเชื้อแล้วเติมลงในถังหมักในปริมาณเท่าเดิม ควบคุมสภาวะในการหมักตามขั้นตอน 3.8.2 เก็บน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง ทำซ้ำจนกระทั่งปริมาณกรดโพรพิโอนิกลดลง บันทึกจำนวนครั้งของการหมักแบบกะในรูปของปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่เซลล์ตรึงสามารถผลิตได้ วัดค่า pH ตลอดการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธีของ Dubois. 1956 และน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธีของ Nelson. 1952 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข)

3.10 การศึกษาปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สะสมในเซลล์ตรึง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

การศึกษาปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สะสมในเซลล์ตรึงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยการนำเซลล์ตรึงที่ผ่านมาการหมักจนครบระยะเวลา 336 ชั่วโมง มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 2 รอบ จากนั้นเทน้ำกลั่นออก และเติมสารละลายฟอสเฟต-ซีเตรต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 7.0 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อละลายเจลกึ่งไว้นจนเม็ดเจลละลายตัวทั้งหมด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข)

3.11 การสกัดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ (ดัดแปลงจาก Zhong Gu และคณะ. 1998)

ทำการสกัดกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยการเติมโดเดซิลเอมีน (Dodecylamine) ร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ละลายในออกทานอล (2 – octanol) ในน้ำหมักในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกสารประกอบ acid-complex ที่สกัดได้ด้วยการกรองโดยใช้กระดาษกรอง Glass fiber (GC-50) นำสารประกอบ acid-complex ละลายน้ำ จากนั้นนำมากลั่นภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 60 มิลลิบาร์ ทดสอบความบริสุทธิ์ของสารที่สกัดได้ด้วยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข)

3.12 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์ของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายในทางการค้าโดยวิธี paper disc agar diffusion method (ดัดแปลงจาก Faria และคณะ. 2006)

ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์ของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ด้วยวิธี paper disc agar diffusion method โดยใช้เชื้อรา 7 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.* และ *Trichoderma sp.* และยีสต์ 7 ชนิด ได้แก่ *Candida albican*, *Candida sake*, *Pichia membranefacien*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Kluyveromyces marxianus* และ *Rhodotorula glutinis* ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) ด้วยวิธีการ spread plate โดยทำสารละลายสปอร์เชื้อรา ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และสารละลายเซลล์ยีสต์ ความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คูดสารละลายสปอร์ของเชื้อราและเชื้อยีสต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหาร PDA (เชื้อละ 3 ซ้ำ) ใช้แท่งแก้วทึบไฟ เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วอาหาร ใช้ไมโครปิเปตต์คูดสารละลายกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้า (CARLO ERBA REAGENT s.r.l : Code no. 306254) ในความเข้มข้นที่เท่ากัน และน้ำกลั่น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาหยดลงบนแผ่นกลม (paper disc : เตรียมจากกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่นั่งฆ่าเชื้อแล้ว) ซึ่งวางบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่ทำการ spread เชื้อราและเชื้อยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์วัดได้จากบริเวณการยับยั้ง (โซนใส) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิก ทั้ง 2 ชนิด

3.13 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองข้อ 3.4 ถึง 3.10 วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan new multiple rang test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การทดลองข้อ 3.12 วางแผนการทดลองแบบ pair samples T-test เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรด โพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

จากการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร 6 ชุดทดลอง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง พบว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุดคืออาหารชุดที่ 6 ซึ่งเป็นอาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 โดยให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 14.26 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโพรพิโอนิกในอาหารแต่ละชุดแสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965

จากอาหาร 6 ชุดทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อ	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)
ชุดที่ 1 อาหาร MRS	$4.75^d \pm 0.25$
ชุดที่ 2 อาหาร MRS + CaCO ₃ ร้อยละ 1	$12.52^b \pm 0.41$
ชุดที่ 3 อาหารดัดแปลง	$5.73^c \pm 0.08$
ชุดที่ 4 อาหารดัดแปลง + CaCO ₃ ร้อยละ 1	$13.0^b \pm 0.33$
ชุดที่ 5 อาหารเวย์	$6.04^c \pm 0.16$
ชุดที่ 6 อาหารเวย์ + CaCO ₃ ร้อยละ 1	$14.26^a \pm 0.16$

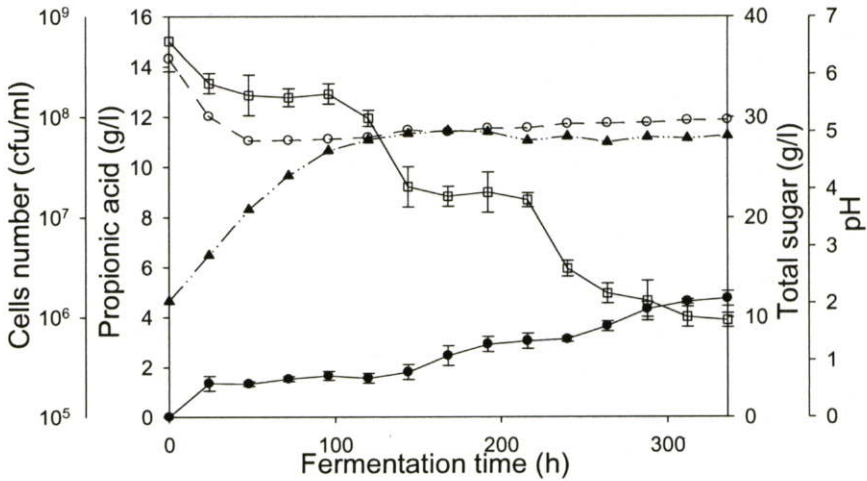
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันทางสถิติ

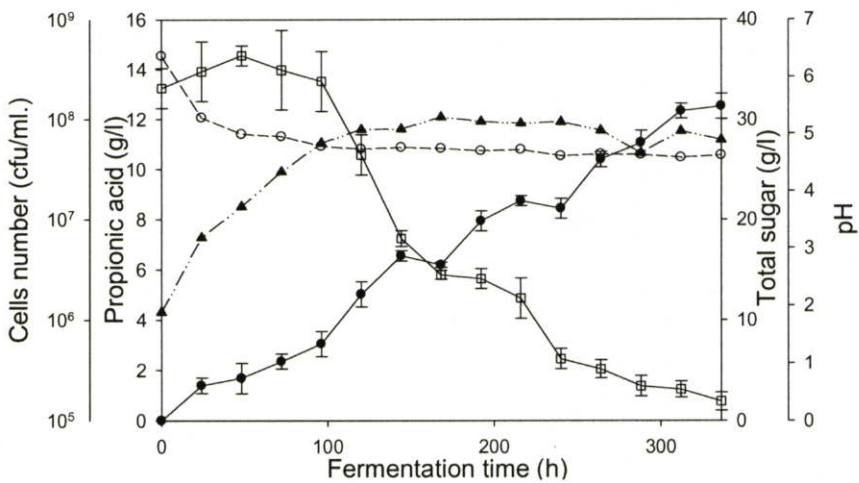
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของ

ค่าเฉลี่ยแบบ Duncan new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดโพรพิโอนิก \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.1a

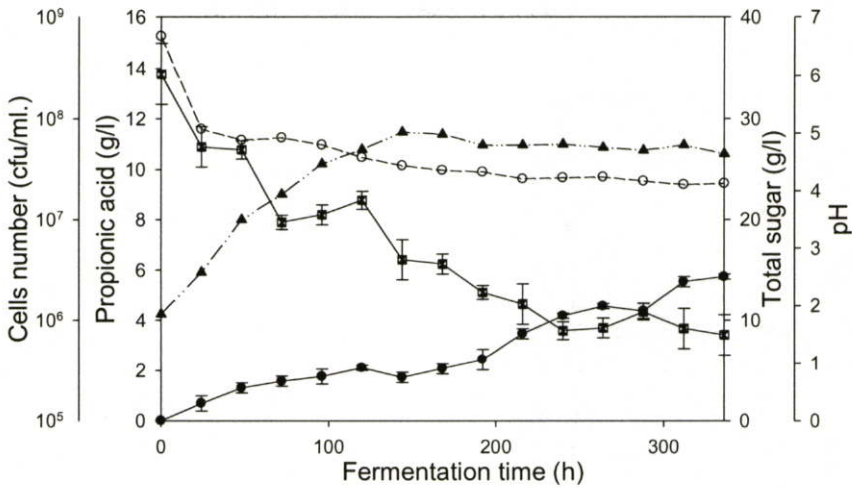


รูปที่ 4.1b

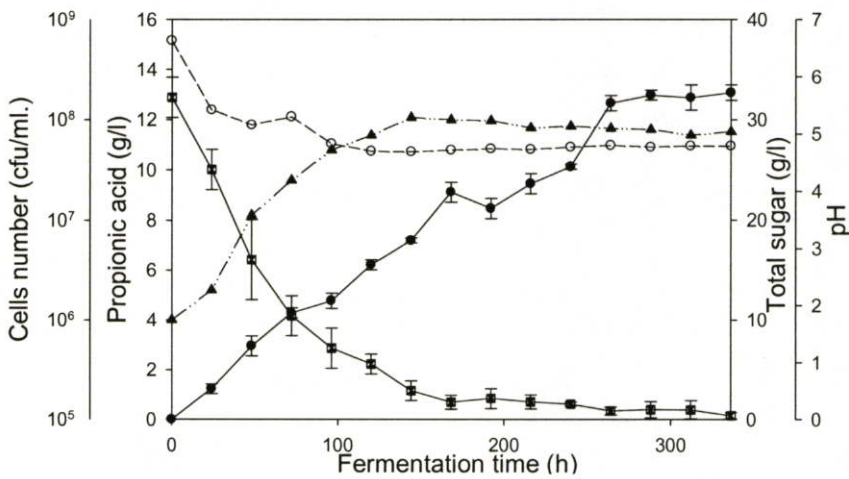
รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จำนวนเซลล์ และค่า pH ในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 336 ชั่วโมง ในอาหาร MRS

: 4.1a อาหาร MRS 4.1b อาหาร MRS+ CaCO₃ ร้อยละ 1

: (●) Propionic acid ; (□) Total sugar ; (▲) Cells number ; (○) pH



รูปที่ 4.2a



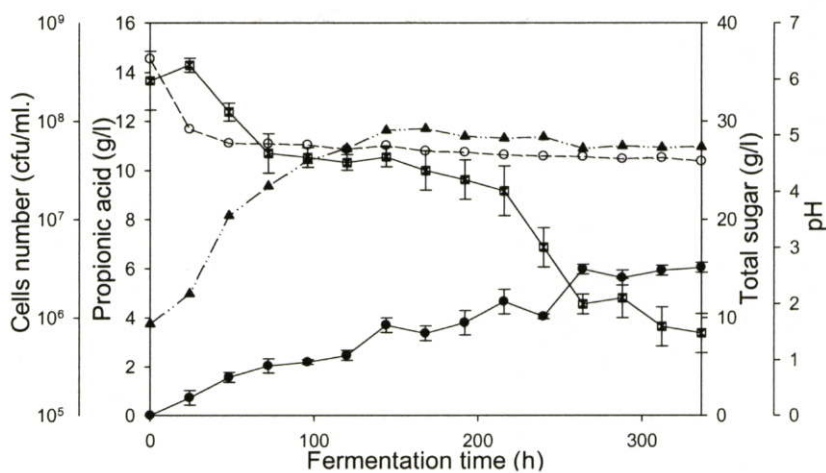
รูปที่ 4.2b

รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จำนวนเซลล์ และค่า pH ในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 336 ชั่วโมงในอาหารดัดแปลง

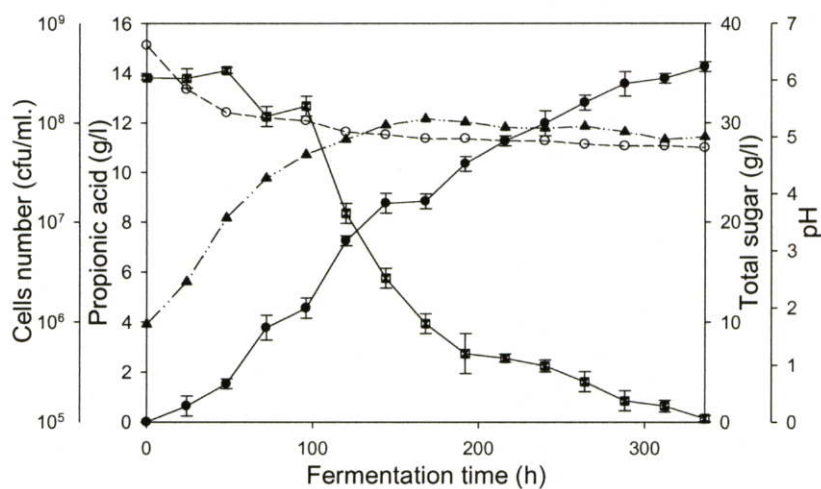
: 4.2a อาหารดัดแปลง

4.2b อาหารดัดแปลง+CaCO₃ ร้อยละ 1

: (●) Propionic acid ; (□) Total sugar ; (▲) Cells number ; (○) pH



รูปที่ 4.3a



รูปที่ 4.3b

รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จำนวนเซลล์ และค่า pH ในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 336 ชั่วโมง ในอาหารเวย์

: 4.3a อาหารเวย์

4.3b อาหารเวย์ + CaCO_3 ร้อยละ 1

: (●) Propionic acid ; (□) Total sugar ; (▲) Cells number ; (○) pH

สำหรับอาหารทดลองชุดที่ 1 เดิมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร้อยละ 5 ในอาหาร MRS ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 4.75 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปร้อยละ 74.13 ค่า pH เริ่มต้น 6.5 และค่า pH ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 5.2 มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.45×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ต่อมาในชั่วโมงที่ 168 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 7.30×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 6.50×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 336 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 4.1a

อาหารทดลองชุดที่ 2 เดิมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร้อยละ 5 ในอาหาร MRS ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 12.52 ± 0.41 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปร้อยละ 94.23 ค่า pH เริ่มต้น 6.5 และค่า pH ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 4.6 มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.20×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ต่อมาในชั่วโมงที่ 168 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 1.05×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 6.20×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 336 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 4.1b

เมื่อเปรียบเทียบอาหารทดลองชุดที่ 1 (MRS) และอาหารทดลองชุดที่ 2 (MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1) พบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 168 ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนสูงสุด จำนวนเชื้อที่เจริญในอาหารทดลองชุดที่ 1 น้อยกว่าจำนวนเชื้อที่เจริญในอาหารทดลองชุดที่ 2 อย่างต่อเนื่อง แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จำนวนเซลล์ในอาหารทดลองชุดที่ 1 กลับมีจำนวนมากกว่าในอาหารทดลองชุดที่ 2 ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารชุดที่ 2 ซึ่งมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต แม้เซลล์จะมีการเจริญและสร้างกรดมากกว่า แต่แคลเซียมคาร์บอเนตมีส่วนช่วยในการรักษาระดับ pH ทำให้ค่า pH ลดต่ำลงช้าๆ เชื้อจึงมีการเจริญและผลิตกรดได้อย่างต่อเนื่อง ต่างจากในอาหารชุดที่ 1 ซึ่งค่า pH ในช่วงแรกลดต่ำลงรวดเร็ว ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญในช่วงแรกไม่ดีนัก ปริมาณกรดที่ผลิตได้จึงน้อยกว่า และทำให้ค่า pH สุดท้ายสูงกว่าในอาหารทดลองชุดที่ 2 แต่ด้วยค่า pH ที่ลดลงไม่มากนักในช่วงท้ายของการทดลอง จึงทำให้มีเซลล์เหลือรอดได้มากกว่า ปริมาณเซลล์ที่วัดได้จึงสูงกว่าเซลล์ที่เจริญในอาหารทดลองชุดที่ 2 อย่างไรก็ตามการเจริญของเซลล์ในช่วงแรกมีผลอย่างมากต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ดังนั้นแม้ว่าอาหารทดลองชุดที่ 1 จะมีปริมาณเซลล์ในช่วงท้ายการทดลองสูงกว่า แต่เนื่องจากปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ในช่วงแรกไม่สูงนัก ผลผลิตโดยรวมที่ได้จึงต่ำกว่าการผลิตกรดในอาหารทดลองชุดที่ 2 ที่ให้ผลคืออย่างต่อเนื่อง

อาหารทดลองชุดที่ 3 เดิมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร้อยละ 5 ในอาหารดัดแปลง ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 5.73 ± 0.08 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปร้อยละ 75.22 ค่า pH เริ่มต้น 6.5 และค่า pH ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 4.1 มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.15×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ต่อมาในชั่วโมงที่ 144 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น

สูงสุดเท่ากับ 7.49×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 4.50×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 336 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 4.2a

อาหารทดลองชุดที่ 4 เดิมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร้อยละ 5 ในอาหารดัดแปลงที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 13.0 ± 0.33 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปร้อยละ 98.79 ค่า pH เริ่มต้น 6.5 และค่า pH ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 4.7 มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.00×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ต่อมาในชั่วโมงที่ 144 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 1.05×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 7.60×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 336 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 4.2b

สำหรับอาหารทดลองชุดที่ 3 (อาหารดัดแปลง) และชุดที่ 4 (อาหารดัดแปลงที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต) นี้ ให้ผลผลิตที่สูงกว่าอาหารทดลองชุดที่ 1 และ 2 ในสภาวะเดียวกัน เนื่องจากเมื่ออาหาร MRS ที่ใช้เป็นอาหารชุดทดลอง 1 และ 2 จะเป็นอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ผลิตกรด แต่เนื่องจากอาหารดัดแปลงที่ใช้ในชุดทดลอง 3 และ 4 เป็นอาหารที่ได้มีการปรับสูตรโดยการเติมแร่ธาตุและสารอาหารที่จำเป็นครบถ้วน เชื้อจึงมีการเจริญดีกว่าและผลิตกรดได้ในปริมาณที่สูงกว่าการหมักในอาหาร MRS ในชุดทดลอง 1 และ 2

อาหารทดลองชุดที่ 5 เดิมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร้อยละ 5 ในอาหารเวย์ ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 6.04 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปร้อยละ 75.29 ค่า pH เริ่มต้น 6.5 และค่า pH ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 4.5 มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.70×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ต่อมาในชั่วโมงที่ 168 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 8.40×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 5.50×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 336 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 4.3a

อาหารทดลองชุดที่ 6 เดิมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร้อยละ 5 ในอาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 14.26 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปร้อยละ 98.96 ค่า pH เริ่มต้น 6.5 และค่า pH ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 4.8 มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 9.50×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ต่อมาในชั่วโมงที่ 168 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 1.10×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 7.20×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 336 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 4.3b

เมื่อเปรียบเทียบอาหารทดลองชุดที่ 5 (อาหารเวย์) และชุดที่ 6 (อาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต) กับอาหารทดลองชุดที่ 1 ถึง 4 จะเห็นว่าการใช้อาหารทดลองชุดที่ 5 และ 6 ให้ผลผลิตสูงกว่าอาหารทดลองชุดอื่นๆ ในสภาวะเดียวกัน เนื่องจากเวย์เป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Schuppert และคณะ. 1992 ; Colomban และคณะ. 1993) ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญค่อนข้างดีและใช้น้ำตาลได้มากกว่าอาหารชุดอื่นในสภาวะ

เดียวกัน ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ได้จึงสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารชุดอื่น ดังรายงานการทดลองของ Champagne และคณะ (1989) ที่ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเซลล์ตรึงของเชื้อ *Propionibacterium shermanii* B-123 โดยใช้เวทย์ที่ผ่านกระบวนการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus helveticus* var milano L-89 เป็นยับยั้งการทดลอง ซึ่งการหมักเวทย์โดยเชื้อ *L. helveticus* นี้ จะได้ผลผลิตเป็นแลคเตด และเชื้อ *P. shermanii* จะใช้แลคเตดเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่อไป ผลผลิตที่ได้อยู่ในช่วงร้อยละ 21-25

จากอาหารทดลองทั้ง 6 ชุดนั้น อาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก เรียงลำดับจากมากไปน้อย ได้ดังนี้ อาหารเวทย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (14.26 ± 0.16 กรัมต่อลิตร) อาหารดัดแปลงที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (13.0 ± 0.33 กรัมต่อลิตร) อาหาร MRS ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (12.52 ± 0.41 กรัมต่อลิตร) อาหารเวทย์ (6.04 ± 0.16 กรัมต่อลิตร) อาหารดัดแปลง (5.73 ± 0.08 กรัมต่อลิตร) และอาหาร MRS (4.75 ± 0.25 กรัมต่อลิตร) ซึ่งเห็นได้ว่า อาหารสูตรที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 มีปริมาณการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าอาหารชนิดเดียวกันที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เช่นเดียวกับการทดลองของสุรนารถ (2550) ที่ได้ศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต ที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวทย์ ในการหมักแบบกะ โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 20.66 กรัมต่อลิตร สูงกว่าอาหารที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งให้ผลผลิต 11.30 กรัมต่อลิตร

อาหารที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 จะมีจำนวนจุลินทรีย์สูงกว่าอาหารชนิดเดียวกันที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากเมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญและผลิตกรด ทำให้ค่า pH ลดต่ำลง โดยในอาหารที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ค่า pH ลดลงอย่างช้าๆ เนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลในการรักษาระดับ pH แต่ในอาหารที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ค่า pH จะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงระดับต่ำ สภาพความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจึงมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และมีผลต่อปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่จุลินทรีย์ผลิตได้อีกด้วย และจากเหตุผลนี้ เซลล์ที่เจริญในอาหารชุดที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 จึงมีชีวิตอยู่รอดได้นานกว่า และใช้น้ำตาลในอาหารได้มากกว่าร้อยละ 90 ทำให้ได้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าอาหารชุดที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

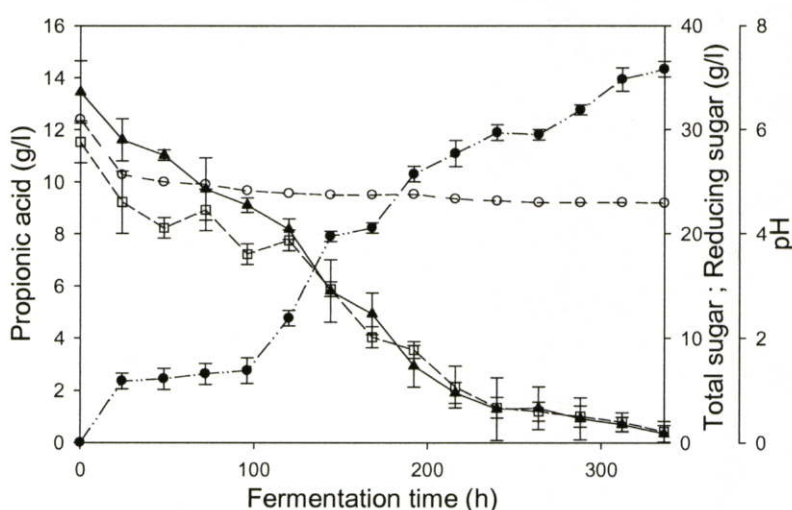
นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารแต่ละชนิด พบว่า การเจริญของเซลล์สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงและปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิต คือ เซลล์จะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงระยะเริ่มต้น และปริมาณเซลล์เพิ่มสูงสุดในชั่วโมงที่ 144-168 ในระยะนี้เอง ปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็ว และจากกราฟที่ 4.1 จะเห็นว่าในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลค่อนข้างมาก ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ก็จะสูงขึ้นด้วย

เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ให้ปริมาณการผลิตสูงสุด แตกต่างจากอาหารชุดอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงเลือกใช้อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 เป็นข้อสรุปในการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่อไป

4.2 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในลักษณะเซลล์อิสระ ในพลาสติกขนาด 2 ลิตรและในถังหมักขนาด 2 ลิตร

4.2.1 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในพลาสติกขนาด 2 ลิตร

จากการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4



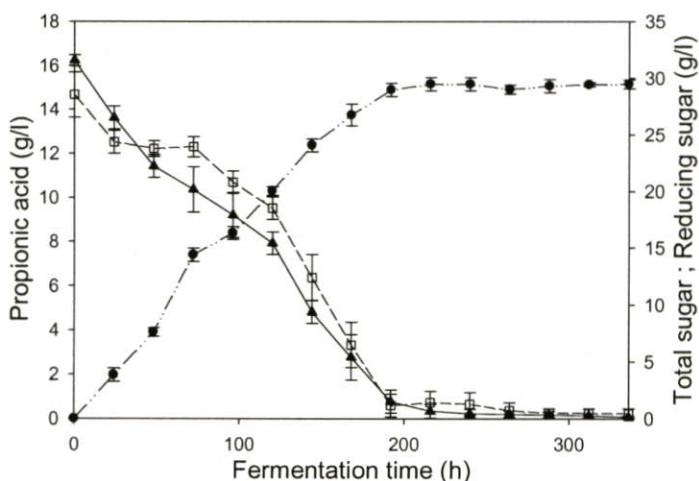
รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาล และค่า pH ในการหมักเซลล์อิสระของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้อาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 336 ชั่วโมง ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร : (●) Propionic acid ; (▲) Total sugar ; (□) Reducing sugar ; (○) pH

ในการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ด้วยอาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุดคือ 14.33 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 336 โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปร้อยละ 97.44 ค่า pH เริ่มต้น 6.5 และค่า pH ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 4.59 นอกจากนี้เมื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณน้ำตาล

ทั้งหมด โดยในช่วงเริ่มต้นการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 0 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งแม้ว่าน้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลชนิดหลักที่พบมากในเวย์ แต่ในเวย์ยังมีน้ำตาลรีดิวซ์ชนิดอื่นเป็นองค์ประกอบแม้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย เช่น กลูโคส เป็นต้น และจากสาเหตุนี้เอง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ในช่วงเริ่มต้นจึงมีส่วนหนึ่งที่มาจกเวย์โดยตรง และตลอดช่วงระยะเวลาการหมัก จุลินทรีย์มีการเจริญและเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลกาแลคโตสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เพื่อนำไปใช้ในการเจริญและผลิตกรดโพรพิโอนิก น้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ในช่วงระยะเวลาการหมักจึงเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นผลจากการย่อยน้ำตาลทั้งหมดในการหมักนั่นเอง

4.2.2 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร

สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที pH คงที่ 6.5 ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณน้ำตาล ในการหมักเซลล์อิสระของเชื้อ

P. acidipropionici ATCC 4965 โดยใช้อาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่สถานะหนึ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 336 ชั่วโมง ในถังหมักขนาด 2 ลิตร : (●) Propionic acid ; (▲) Total sugar ; (□) Reducing sugar

การเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ด้วยอาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งมีการควบคุม pH คงที่ 6.5 โดยใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล เชื้อสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเท่ากับ 15.16 ± 0.24 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 216 โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปร้อยละ 97.94 และสำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าแปรตามกันต่อเนื่องเช่นเดียวกันกับปริมาณน้ำตาลในพลาสติก แต่ในถังหมักนี้ ปริมาณน้ำตาลลดลงเกือบหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 216 เป็นต้นไป โดยใน

ชั่วโมงที่ 216 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือเพียง 0.65 กรัมต่อลิตร ต่างจากการใช้น้ำตาลของเชื้อที่เจริญในพลาสติก ซึ่งลดลงอย่างช้าๆ และยังมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือ 0.86 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 336 โดยเมื่อเปรียบเทียบ ณ ชั่วโมงเดียวกัน พบว่า ที่ระยะเวลาการหมัก 216 ชั่วโมง อัตราการใช้น้ำตาลทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 97.94 และ 85.83 ในถังหมักและพลาสติกตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก อัตราการใช้น้ำตาลทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 99.57 และ 97.44 ในถังหมักและพลาสติกตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากในถังหมักมีการควบคุม pH ให้คงที่ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ทำให้เชื้อมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เป็นระยะเวลานาน และไม่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยสภาวะที่เป็นกรด ต่างจากในพลาสติก ที่แม้จะมีแคลเซียมคาร์บอเนตช่วยในการรักษาระดับ pH แต่ก็ทำได้เพียงชะลอการลดลงของ pH จนถึงระยะเวลาหนึ่งซึ่ง pH จะลดลงจนเชื้อไม่สามารถเจริญและผลิตกรดต่อไปได้อีก

อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการทดลองนี้ค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 216 เป็นต้นไป เนื่องจากน้ำตาลหมดลง จึงกล่าวได้ว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระในถังหมักอยู่ในช่วง 216 ชั่วโมง น้อยกว่าระยะเวลาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระในพลาสติก ซึ่งใช้เวลา 336 ชั่วโมง อย่างชัดเจน และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณกรดโพรพิโอนิก ผลิต และอัตราการผลิต ในถังหมักและพลาสติก ที่ระยะเวลาการหมัก 216 ชั่วโมง พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตาราง 4.2

ตาราง 4.2 แสดงค่า P-value ของการเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์อิสระของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 1 ในพลาสติกและถังหมักขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธี T-test ณ ชั่วโมงที่ 216

ชนิด	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป (ร้อยละ)
พลาสติก 2 ลิตร	11.09 ± 0.41	0.38 ± 0.016	0.051 ± 0.002	85.83
ถังหมัก 2 ลิตร	15.16 ± 0.24	0.49 ± 0.008	0.070 ± 0.001	97.94
ค่า p-value	0.05*	0.025*	0.032*	-

หมายเหตุ

** ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

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

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

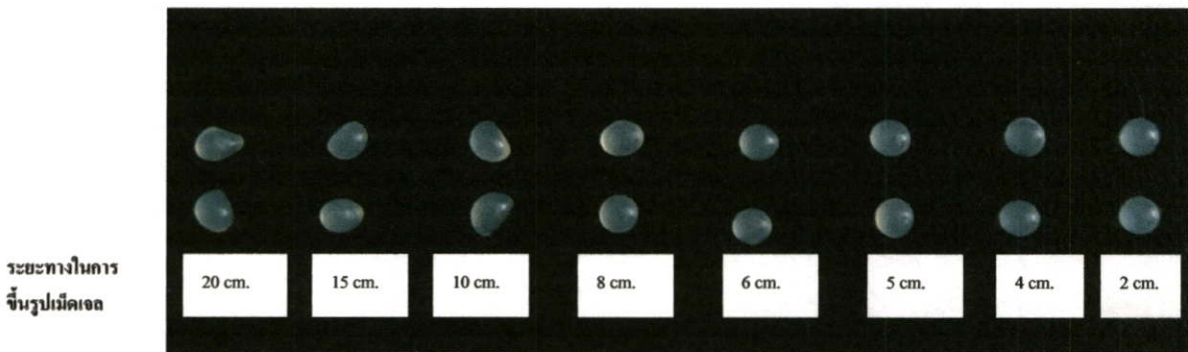
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเม็ดเจลของเซลล์ตรึง

Propionibacterium acidipropionici ATCC 4965 เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก

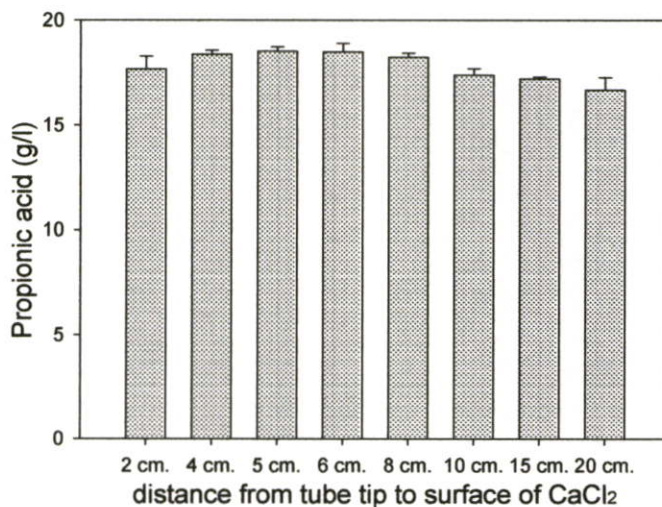
4.3.1 ผลการศึกษาระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียม

คลอไรด์ที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

จากการศึกษาระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเม็ดเจล เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก ระยะทางที่ทำการศึกษาได้แก่ 2 4 5 6 8 10 15 และ 20 เซนติเมตร ตามลำดับ ลักษณะเม็ดเจลที่ทำการขึ้นรูปที่ระยะต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.6 นำเซลล์ตรึงที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ในแต่ละชุดทดลอง แสดงดังรูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะเม็ดเจลที่ขึ้นรูปโดยใช้ระยะทางจากปลายสายยางถึงผิวหน้าสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 2 4 5 6 8 10 15 และ 20 เซนติเมตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากเซลล์ตรึง *P. acidipropionici* ATCC 4965 เมื่อกำหนดระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2 ถึง 20 เซนติเมตร หมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 336 ชั่วโมง

ตาราง 4.3 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา
ระยะทางจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เมื่อทำการ
เลี้ยงเซลล์ตรึง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศา
เซลเซียส เป็นเวลา 336 ชั่วโมง

ระยะทาง (เซนติเมตร)	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป (ร้อยละ)
2	17.68 ^{bc} ± 0.49	98.95
4	18.37 ^a ± 0.16	99.20
5	18.53 ^a ± 0.15	99.26
6	18.49 ^a ± 0.32	99.22
8	18.23 ^{ab} ± 0.16	98.93
10	17.38 ^c ± 0.24	98.90
15	17.20 ^{cd} ± 0.09	98.87
20	16.67 ^d ± 0.48	98.74

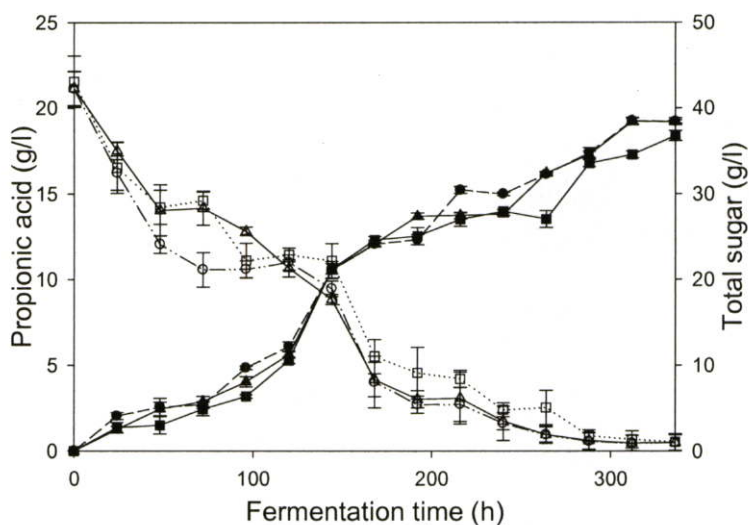
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันทางสถิติ
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของ
ค่าเฉลี่ยแบบ Duncan new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อใช้ระยะทาง 4 5 และ 6 เซนติเมตร จากปลายสายยางถึงผิวหน้าสารละลายแคลเซียม
คลอไรด์ในการขึ้นรูปเม็ดเจล เซลล์ตรึงสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 18.37±0.16
18.53±0.15 และ 18.49±0.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สูงกว่าที่ระยะทางอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่า
เมื่อระยะทางจากปลายสายยางถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มมากขึ้น ปริมาณ
กรดโพรพิโอนิกที่เซลล์ตรึงผลิตได้จะลดลงตามลำดับ โดยที่ระยะทางในการขึ้นรูปเม็ดเจลเท่ากับ
20 เซนติเมตร เซลล์ตรึงผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ต่ำสุด (16.67 ± 0.48 กรัมต่อลิตร) จากรูปที่ 4.6
จะเห็นว่าลักษณะเม็ดเจลมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะทางที่สูงขึ้น เม็ดเจลจากการขึ้นรูปที่ระยะ 2
ถึง 8 เซนติเมตร จะมีลักษณะกลม แต่เมื่อระยะทางในการตรึงเซลล์เพิ่มเป็น 10 ถึง 20 เซนติเมตร
เม็ดเจลเริ่มมีลักษณะรี ไม่เป็นทรงกลม ซึ่งลักษณะเม็ดเจลที่ได้มีผลต่อปริมาณการผลิตกรด
โพรพิโอนิก เนื่องจากการที่เม็ดเจลมีลักษณะทรงกลมจะทำให้มีพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับอาหาร
ได้มากและทั่วถึงกว่าเม็ดเจลที่มีลักษณะรี

ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากเซลล์ตรึงที่ใช้ระยะทางจากปลายสายยางถึงผิวหน้าสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 4 5 และ 6 เซนติเมตร เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ระยะทางในช่วง 4 ถึง 6 เซนติเมตร จากปลายสายยางถึงผิวหน้าสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ในการขึ้นรูปเม็ดเจล

4.3.2 ผลการศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายเจล

ทำการขึ้นรูปเม็ดเจลของเซลล์ตรึงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้ระยะทางในช่วง 4 ถึง 6 เซนติเมตร จากปลายสายยางถึงผิวหน้าสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และกำหนดอัตราการไหลของสารละลายเจลเท่ากับ 5 6 และ 7 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ นำเซลล์ตรึงแต่ละชุดทดลองมาเลี้ยงในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง แสดงผลดังรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.4



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ

P. acidipropionici ATCC 4965 ที่กำหนดค่าอัตราการไหลของสารละลายเจลเท่ากับ 5 6 และ 7 มิลลิลิตรต่อนาที :

- (■) Propionic acid by 5 ml./min gel solution's flowrate of immobilization ;
- (▲) Propionic acid by 6 ml./min gel solution's flowrate of immobilization ;
- (●) Propionic acid by 7 ml./min gel solution's flowrate of immobilization ;
- (□) Total sugar by 5 ml./min gel solution's flowrate of immobilization ;
- (△) Total sugar by 6 ml./min gel solution's flowrate of immobilization ;
- (○) Total sugar by 7 ml./min gel solution's flowrate of immobilization ;

ตาราง 4.4 แสดงปริมาณกรด โพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ จากการศึกษา อัตราการไหลที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเม็ดเจล

อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป (ร้อยละ)
5	18.97 ^b ± 0.25	97.54
6	19.19 ^a ± 0.08	97.66
7	19.22 ^a ± 0.15	97.68

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของ
ค่าเฉลี่ยแบบ Duncan new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการศึกษาอัตราการไหลของสารละลายเจล 5 6 และ 7 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณกรด
โพรพิโอนิกที่เซลล์ตรึงผลิตได้เท่ากับ 18.97±0.25 19.19±0.08 และ 19.22±0.15 กรัมต่อลิตร
ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักที่ 336 ชั่วโมง อัตราการใช้น้ำตาลทั้งหมดคิดเป็น
ร้อยละ 97.54 97.66 และ 97.68 ในชุดอัตราการไหลของสารละลายเจลเท่ากับ 5 6 และ 7
มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ที่อัตราการไหลของสารละลายเจล 6 และ 7 มิลลิลิตรต่อนาที
ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจากชุดอัตราไหลของสารละลายเจล 5 มิลลิลิตรต่อ
นาทีอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการทดลองต่อไป เลือกใช้อัตราการไหลของสารละลายเจลเท่ากับ 7
มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากเป็นค่าสูงสุดในการขึ้นรูปเม็ดเจลด้วยเครื่อง peristaltic pump จึงมีความ
รวดเร็วกว่าการใช้อัตราการไหลที่ 6 มิลลิลิตรต่อนาที

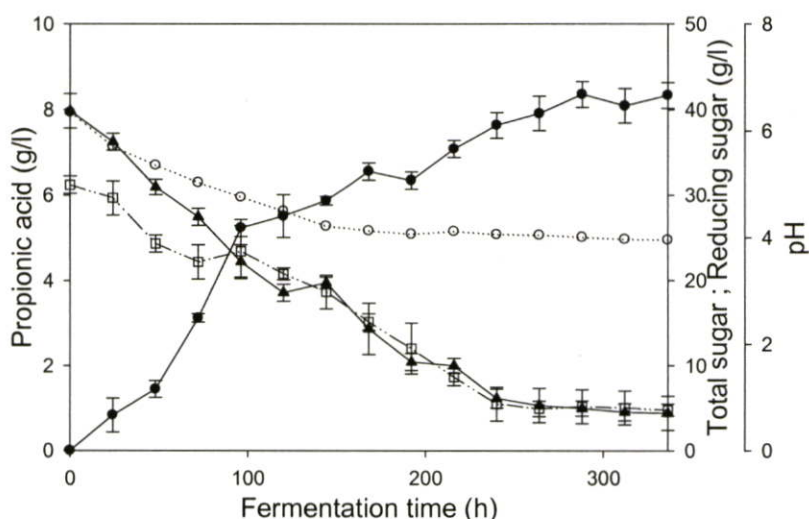
4.4 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร และในถังหมักขนาด 2 ลิตร

4.4.1 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึง ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร

ในอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

เมื่อทำการขึ้นรูปเม็ดเจลโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้แก่ การใช้ระยะทางจากปลายสาย
ยางถึงผิวหน้าสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ในช่วง 4 ถึง 6 เซนติเมตร และอัตราการไหลของ
สารละลายเจลเท่ากับ 7 มิลลิลิตรต่อนาที นำเซลล์ตรึงที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียม

คาร์บอนเนต ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง แสดงผลดังรูปที่ 4.9



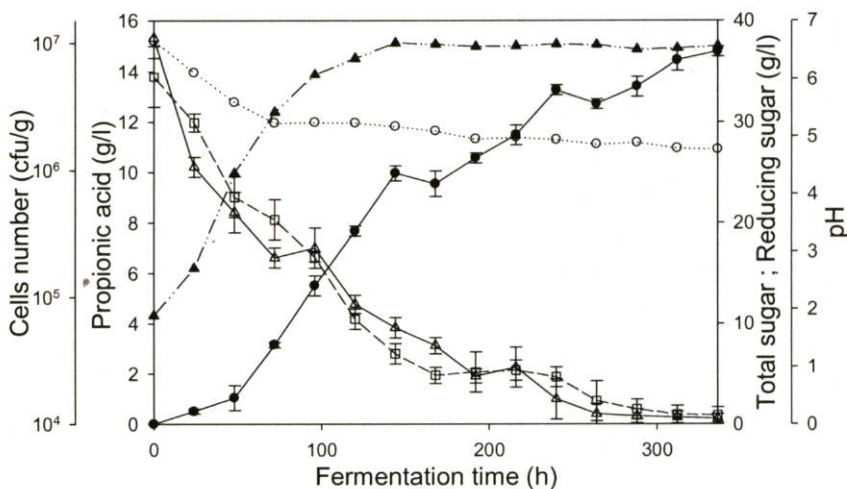
รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาล และค่า pH ในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอนเนต ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร : (●) Propionic acid ; (▲) Total sugar ; (□) Reducing sugar ; (○) pH

สำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงในอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอนเนต ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ระยะเวลา 336 ชั่วโมง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 8.33 ± 0.23 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 89.01 และค่า pH ต่ำสุดวัดได้ 3.96 ที่ชั่วโมงที่ 336

4.4.2 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึง ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร

ในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอนเนตร้อยละ 1

เมื่อทำการขึ้นรูปเม็ดเจลโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้แก่ การใช้ระยะทางจากปลายสายยางถึงผิวหน้าสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ในช่วง 4 ถึง 6 เซนติเมตร และอัตราการไหลของสารละลายเจลเท่ากับ 7 มิลลิลิตรต่อนาที นำเซลล์ตรึงที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอนเนตร้อยละ 1 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง แสดงผลดังรูปที่ 4.10

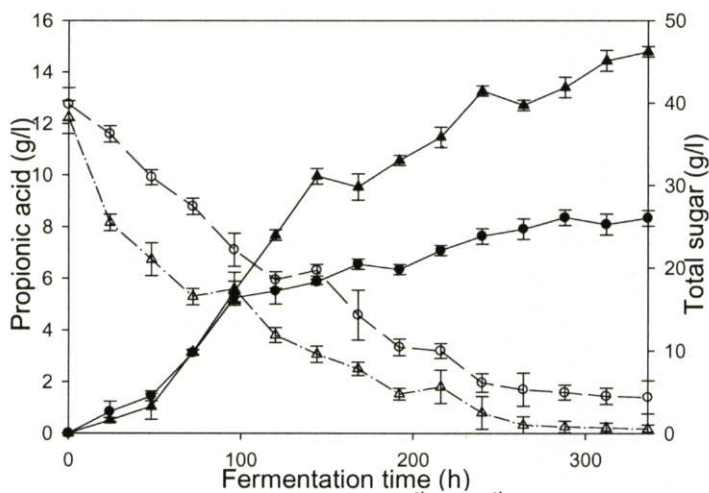


รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาล จำนวนเซลล์ และค่า pH ในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร (●) Propionic acid ; (△) Total sugar ; (□) Reducing sugar ; (▲) Cells number ; (○) pH

ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงด้วยอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ระยะเวลา 336 ชั่วโมง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 14.78 ± 0.15 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 98.64 และค่า pH ต่ำสุดวัดได้ 4.77 ณ ชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก นอกจากนี้ในช่วงระยะการหมัก พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้มีความสัมพันธ์กัน โดยมีการลดลงในระดับใกล้เคียงกันต่อเนื่องตลอดการทดลอง ซึ่งเป็นข้อยืนยันว่า น้ำตาลทั้งหมดมีการเปลี่ยนรูปไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ โดยผ่านการย่อยของจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและผลิตกรด ดังได้กล่าวมาแล้วในการทดลองข้างต้น และจากรูปที่ 4.10 จะเห็นว่าตั้งแต่เริ่มการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 240 นั้น ปริมาณน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดที่วัดได้มีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่เชื้อผลิตขึ้นซึ่งมีปริมาณการผลิตเพิ่มสูงในช่วงดังกล่าว สำหรับจำนวนเซลล์ ที่ชั่วโมงที่ 0 วัดการเจริญของเซลล์ได้เท่ากับ 7.20×10^4 โคโลนีต่อกรัมเจล และในชั่วโมงที่ 144 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 1.00×10^7 โคโลนีต่อกรัมเจล อย่างไรก็ตาม จำนวนเซลล์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 144 เป็นต้นไป มีการเปลี่ยนแปลงลดลงเพียงเล็กน้อย โดยจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 9.50×10^6 โคโลนีต่อกรัมเจล ในชั่วโมงที่ 336 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก ซึ่งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 144 จนถึงสิ้นสุดระยะการหมักนี้ เซลล์ยังมีการเจริญและใช้น้ำตาลทั้งหมดที่มีในอาหารเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกได้อย่างต่อเนื่อง

หากเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์อิสระในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตในการทดลองข้างต้น พบว่าจำนวนเซลล์สูงสุดของการเลี้ยงเซลล์อิสระมีค่ามากกว่าจำนวนเซลล์ของเซลล์ตรึง แต่หลังจากนั้น จำนวนเซลล์ของเซลล์ตรึงมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเพียงเล็กน้อย (9.50×10^6 โคโลนีต่อกรัมเจล) ต่างจากจำนวนเซลล์อิสระซึ่งตรวจพบจำนวนเซลล์

ที่มีชีวิตลดลงอย่างมาก ซึ่งการที่เซลล์ตรึงมีจำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่ เนื่องจากอัลจินเตที่ห่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากสภาวะความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เซลล์ตรึงมีความคงตัวมากกว่าเซลล์อิสระ (Ates และคณะ. 2002) อีกทั้งเชื้อ *P. acidipropionici* ที่ใช้ในการทดลองนี้เจริญในสภาวะไร้อากาศ การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินเตจึงช่วยส่งเสริมให้เชื้ออยู่ในสภาวะไร้อากาศยิ่งขึ้น โดยความหนาแน่นของออกซิเจนภายในเม็ดเจลจะมีค่าน้อยกว่าออกซิเจนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยรวม ส่งผลให้เซลล์ตรึงมีการเจริญและผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงกว่าเซลล์อิสระ (Champagne และคณะ. 1989)



รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ

P. acidipropionici ATCC 4965 ในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 1

และอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร :

(▲) Propionic acid in 2 L. flask fermentation – CaCO₃ added ;

(●) Propionic acid in 2 L. flask fermentation – no CaCO₃ added ;

(△) Total sugar in 2 L. flask fermentation – CaCO₃ added ;

(○) Total sugar in 2 L. flask fermentation – no CaCO₃ added ;

จากรูปที่ 4.11 ซึ่งแสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงในพลาสติกขนาด 2 ลิตรในอาหารเวย์ทั้ง 2 แบบ พบว่า ในอาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 มีการใช้น้ำตาลทั้งหมดมากกว่าในอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต และปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่ผลิตได้จากการใช้อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเท่ากับ 14.78 ± 0.15 กรัมต่อลิตร แตกต่างจากปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99 (ตาราง 4.5) ในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ผลผลิตและอัตราการผลิตเท่ากับ 0.39 ± 0.008 กรัมต่อกรัม และ 0.044 ± 0.001 กรัมต่อลิตร. ชั่วโมงตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเทียบกับอาหารเวย์ที่ไม่เติม

แคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลผลิต 0.23 ± 0.008 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.025 ± 0.002 กรัมต่อลิตร. ชั่วโมง

ตาราง 4.5 แสดงค่า P-value ของการเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ระหว่างการใช้อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 และอาหารเวย์ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต หมักในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธี T-test ณ ชั่วโมงที่ 336

ชุดทดลอง	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (กรัม โพรพิโอนิกต่อ กรัมน้ำตาลทั้งหมด)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร. ชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ (ร้อยละ)
อาหารเวย์+CaCO ₃ ร้อยละ 1	14.78 ± 0.15	0.39± 0.008	0.044 ± 0.001	98.64
อาหารเวย์	8.33 ± 0.23	0.23± 0.008	0.025 ± 0.002	89.01
ค่า p-value	0.008**	0.044*	0.042*	-

หมายเหตุ

** ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

* ค่า p-value อยู่ในช่วง $0.01 < p\text{-value} < 0.05$ = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

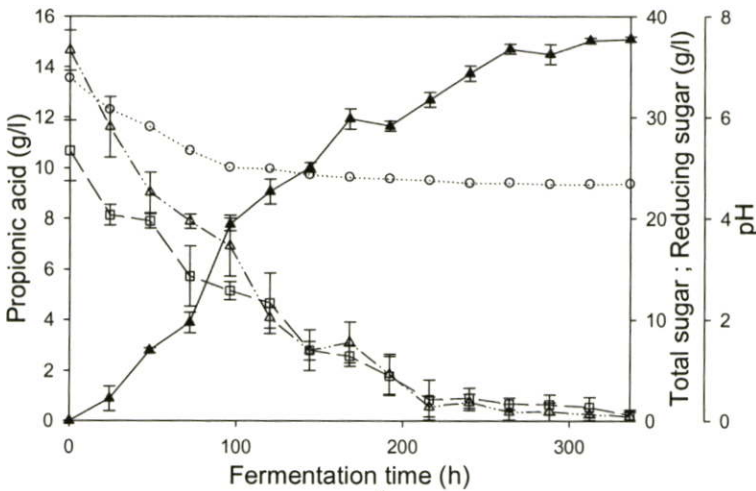
^{ns} ค่า p-value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากตารางที่ 4.5 จึงเป็นการยืนยันได้ว่า แคลเซียมคาร์บอเนตมีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก เพราะแคลเซียมคาร์บอเนตช่วยในการรักษาระดับ pH โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแคลเซียมคาร์บอเนตและกรดโพรพิโอนิก เกิดเป็นเกลือแคลเซียมโพรพิโอเนต และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเกลือที่ได้มีผลในการลดสถานะความเป็นกรดในการหมัก ทำให้ลดการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากกรดโพรพิโอนิกที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดในปฏิกิริยาส่งผลให้เกิดสถานะไม่มีอากาศที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น (Champagne และคณะ. 1989)

4.4.3 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 โดยไม่มีการควบคุม pH ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล

เมื่อทำการตรึงเซลล์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม นำเซลล์ตรึงที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่มีการควบคุม pH ด้วยโพแทสเซียม

ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล กวนที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง แสดงผลดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ปริมาณน้ำตาล และค่า pH ในการหมักเซลล์ตรึง

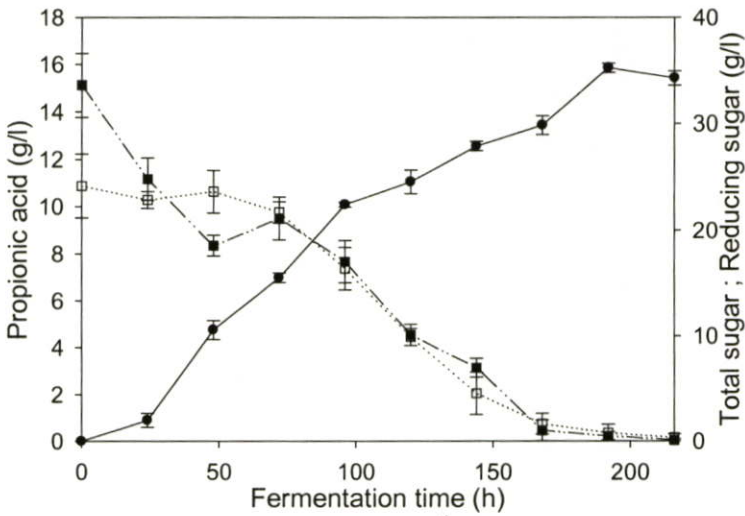
เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้อาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่มีการควบคุม pH ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล กวนที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง : (▲) Propionic acid ; (△) Total sugar ; (□) Reducing sugar ; (○) pH

การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงในถังหมักที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 โดยไม่มีการควบคุม pH ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้เท่ากับ 15.1 ± 0.08 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปร้อยละ 98.80 ใช้ระยะเวลาในการหมัก 336 ชั่วโมง ในส่วนของค่า pH นั้น มีการลดลงช้าๆ อย่างต่อเนื่อง กล่าวได้ว่ามีแนวโน้มในการผลิตกรดโพรพิโอนิกไปในทิศทางเดียวกันกับการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงในฟลาสก์ 2 ลิตรที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต อย่างไรก็ตาม กรดโพรพิโอนิกจากการผลิตในถังหมักมีปริมาณสูงกว่า เนื่องจากถังหมักมีการกวนให้อาหารและเซลล์ตรึงคลุกเคล้าเข้ากันได้อย่างทั่วถึง (Champagne และคณะ. 1989)

4.4.4 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 และควบคุม pH ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล

เมื่อทำการตรึงเซลล์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม นำเซลล์ตรึงที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการควบคุม pH 6.5 ด้วยโพแทสเซียม

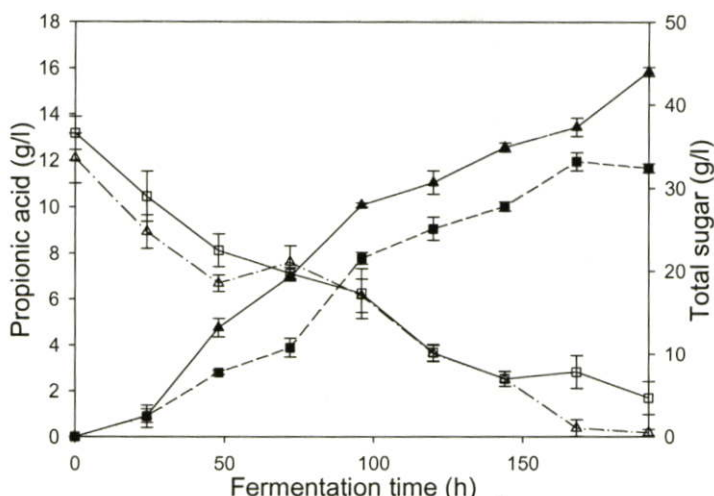
ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล กวนที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 216 ชั่วโมง แสดงผลดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณน้ำตาล ในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ

P. acidipropionici ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อาหารเวย์ที่เติม แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ควบคุม pH ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 นอร์มัล กวนที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 216 ชั่วโมง : (●) Propionic acid ; (■) Total sugar ; (□) Reducing sugar

สำหรับเซลล์ตรึงในถังหมักที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 และควบคุม pH ให้คงที่ด้วยการเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเท่ากับ 15.85 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 192 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นชั่วโมงที่น้ำตาลในถังหมักหมดลง โดยในชั่วโมงที่ 192 วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในอาหารได้เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร และหลังจากชั่วโมงที่ 192 เป็นต้นไป ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด (15.42 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 216) ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในอาหารมีน้อยมาก ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในถังหมักที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ร่วมกับการรักษาระดับ pH ให้คงที่ด้วยการเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ใช้ระยะเวลาการหมัก 192 ชั่วโมง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปคิดเป็นร้อยละ 98.54 เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักที่ 192 ชั่วโมง แสดงผลดังรูป 4.14



รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณกรด โพรพิโอนิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ในการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ

P. acidipropionici ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการควบคุม pH ด้วย โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และไม่มีการควบคุม pH ด้วยโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ในระยะเวลาการหมัก 192 ชั่วโมง :

- (▲) Propionic acid by immobilized cells in 2 L. fermentor – KOH added ;
- (■) Propionic acid by immobilized cells in 2 L. fermentor without KOH ;
- (△) Total sugar by immobilized cells in 2 L. fermentor – KOH added ;
- (□) Total sugar by immobilized cells in 2 L. fermentor without KOH

ในชั่วโมงที่ 192 ในถังหมักที่ไม่มีการเติมโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในอาหารได้เท่ากับ 3.65 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในถังหมักที่มีการควบคุม pH ด้วยโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์เหลือเพียง 0.5 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักที่มีการควบคุม pH ร่วมกันโดยใช้ทั้งแคลเซียมคาร์บอเนตและโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ มีค่าลดลงเร็วกว่าปริมาณน้ำตาลในถังหมักที่มีการควบคุม pH โดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเพียงอย่างเดียว เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญและผลิตกรดมากกว่า โดยการเติมโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อควบคุม pH ให้คงที่ที่ 6.5 เป็นการรักษาระดับ pH ที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก และช่วยลดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นผลมาจากกรดที่ผลิตขึ้น จากการทดลองจะเห็นว่า ณ เวลาเดียวกัน ในชั่วโมงการหมักที่ 192 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกในถังหมักที่มีการเติมโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 15.85 ± 0.25 กรัมต่อลิตร สูงกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากถังหมักที่ไม่มีการเติมโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งได้เท่ากับ 11.66 ± 0.24 กรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99 แสดงดังตาราง 4.6

ตาราง 4.6 แสดงค่า P-value ของการเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการหมักเซลล์ตรึงเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ระหว่างการเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในการควบคุม pH และการไม่เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยใช้วิธี T-test ณ ชั่วโมงที่ 192

ชุดทดลอง ถังหมัก 2 ลิตร	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (กรัมโพรพิโอนิกต่อ กรัมน้ำตาลทั้งหมด)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร. ชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ (ร้อยละ)
อาหารเวย์ + 5 N KOH + CaCO ₃ ร้อยละ 1	15.85 ± 0.25	0.48 ± 0.01	0.083 ± 0.0008	98.54
อาหารเวย์ + CaCO ₃ ร้อยละ 1	11.66 ± 0.24	0.35 ± 0.008	0.061 ± 0.002	90.03
ค่า p-value	0.007**	0.002**	0.006**	-

หมายเหตุ

** ค่า p-value < 0.01 = แยกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

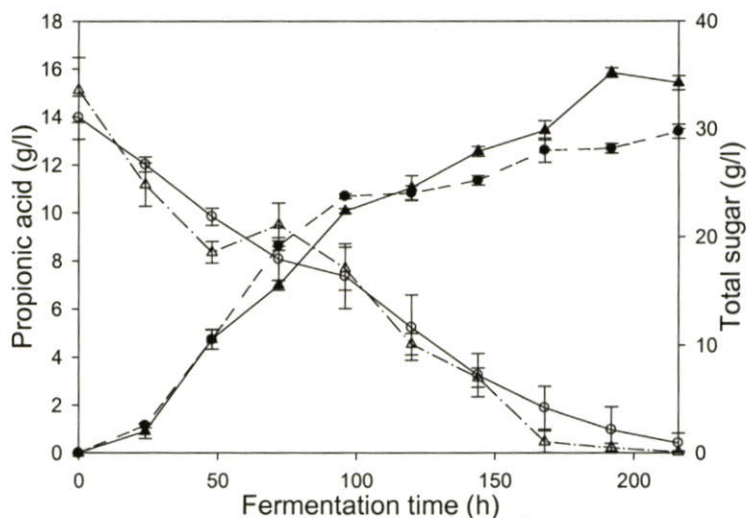
* ค่า p-value อยู่ในช่วง 0.01 < p-value < 0.05 = แยกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

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

จากผลการทดลองนี้ จึงเป็นการยืนยันได้ว่า การเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นการรักษาระดับ pH ที่ดีกว่าการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเพียงอย่างเดียว เพราะเป็นการรักษาระดับ pH ให้คงที่ ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นการชะลอการลดลงของค่า pH ในกระบวนการผลิต มีผลทำให้ pH ลดต่ำลงช้าๆ ไม่คงที่ที่ 6.5 ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ดังรายงานของ Colomban และคณะ (1993) ซึ่งได้ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium freudenreichi* subsp. *freudenreichii*, *Propionibacterium freudenreichi* subsp. *shermanii* ที่ pH 5.5 6.0 6.5 7.0 และ 7.5 พบว่าเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ที่ทำการหมักโดยใช้ pH เริ่มต้น 6.5 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด

4.5 ผลการศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยการนำมาใช้ซ้ำเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ทำการเลี้ยงเซลล์ตรึง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ด้วยอาหารเวย์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการควบคุม pH คงที่ 6.5 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ กวนที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ระยะเวลา 216 ชั่วโมงต่อหนึ่งรอบการหมัก เมื่อครบรอบการหมัก ทำการเปลี่ยนอาหารเดิมออกและใส่อาหารใหม่แทน ซึ่งพบว่าเซลล์ตรึงสามารถให้ผลผลิตได้รวม 2 รอบการหมัก โดยในรอบที่หนึ่ง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเท่ากับ 15.85 ± 0.25 กรัมต่อลิตร และในรอบที่สองของการหมัก ปริมาณกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 13.39 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งลดลงจากการหมักรอบแรกอย่างชัดเจน อีกทั้งในช่วงระยะเวลาการหมักรอบที่สองนั้น จำนวนเม็ดเจลที่สังเกตได้มีปริมาณลดลง และพบว่าเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักรอบที่สอง เจลละลายตัวเกือบทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถหมักรอบต่อไปได้อีก (รูปที่ 4.15)



รูปที่ 4.15 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ในการหมักเซลล์ตรึง

P. acidipropionici ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร รอบการหมักที่ 1 และ 2 :

- (▲) Propionic acid by immobilized cells in 2 L. fermentor batch 1 ;
- (●) Propionic acid by immobilized cells in 2 L. fermentor batch 2 ;
- (△) Total sugar – batch 1 ; (○) Total sugar – batch 2 ;

จากรูปที่ 4.15 ในการหมักรอบที่ 1 วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในอาหารได้เท่ากับ 0.5 และ 0.1 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 192 และ 216 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 192 และปริมาณกรดก่อนข้างคงที่ในชั่วโมงถัดไป ส่วนในการหมักรอบที่ 2 วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในอาหารได้เท่ากับ 0.92 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 ของการหมัก และปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการหมักรอบที่ 2 ลดต่ำลงจากรอบที่ 1 ซึ่งอาจมีผลมาจากการที่จุลินทรีย์มีการเจริญในถังหมักและสัมผัสกับสภาวะความเป็นกรดที่เกิดขึ้นเป็น

ระยะเวลานาน ทำให้ความสามารถในการผลิตกรดโพรพิโอนิกเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่การหมักรอบที่ 2 นอกจากนี้ การหมักในช่วงระยะยาวยังทำให้ความแข็งแรงของเม็ดเจลลดลง โดยมีสาเหตุมาจาก สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่เติมลงไปเพื่อรักษาระดับ pH เนื่องจากจุลินทรีย์มีการผลิตกรดในปริมาณมาก ทำให้น้ำหมักมีความเป็นกรดสูงขึ้น จึงต้องเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในการรักษาระดับ pH ในปริมาณมากเช่นกัน เมื่อเม็ดเจลสัมผัสโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน จะมีผลทำให้เจลเกิดการละลายตัวได้ เนื่องจากโพแทสเซียมไอออน (K^+) เข้าแทนที่แคลเซียมไอออน มีผลทำให้เจลไม่คงตัว (Klinkenberg และคณะ. 2001) และเมื่อนำน้ำหมักจากการหมักรอบที่ 2 มาตรวจสอบด้วยการข้อมแกรม พบกลุ่มแบคทีเรียติดสีแกรม positive แสดงว่ามีการเจริญของเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักรอบที่ 2 นี้

เช่นเดียวกับรายงานการทดลองของ Paik และ Glatz (1994) ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* P200910 ในลักษณะเซลล์ตรึงโดยใช้ corn steep liquor เป็นซับสเตรต พบว่า การนำเซลล์ตรึงมาใช้ซ้ำในแต่ละรอบ ระยะเวลา 72 ชั่วโมงต่อรอบ จะตรวจพบการเจริญของเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อรอบ และเมื่อครบระยะ 10 รอบการหมัก ปริมาณผลผลิตจากการหมักรอบสุดท้ายลดลงเหลือเพียงร้อยละ 50 ของผลผลิตจากการหมักในรอบแรก

การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แสดงผลดังตาราง 4.7

ตาราง 4.7 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ ผลผลิต และอัตราการผลิต ในการเลี้ยงเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร กวนที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ชุดทดลอง	ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	กรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (กรัมโพรพิโอนิกต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตร. ชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ (ร้อยละ)
เซลล์ตรึง หมักรอบที่ 1	192	15.85 ± 0.25	0.48 ± 0.01	0.083 ± 0.0008	98.54
เซลล์ตรึง หมักรอบที่ 2	216	13.39 ± 0.25	0.44 ± 0.01	0.062 ± 0.001	97.04
เซลล์อิสระ	216	15.16 ± 0.24	0.49 ± 0.008	0.070 ± 0.0008	97.54

จากการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมัก ทั้งการใช้เซลล์อิสระและการใช้เซลล์ตรึง พบว่าการเลี้ยงเซลล์ตรึงในถังหมักที่มีการควบคุม pH ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ จะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดใกล้เคียงกับการใช้เซลล์อิสระ แต่การหมักด้วยเซลล์ตรึงมีข้อดี คือสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำในการหมักได้โดยไม่ต้องเตรียมหัวเชื้อใหม่ และการหมักด้วยเซลล์ตรึงยังมีผลดีต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยการเก็บเกี่ยวผลผลิตจากการหมักโดยใช้

เซลล์ครึ่ง สามารถทำได้ง่ายและสะดวกกว่าการเก็บเกี่ยวผลผลิตจากการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ โดยสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตจากน้ำหมักได้โดยตรง เนื่องจากไม่มีเซลล์เจริญในน้ำหมัก ซึ่งข้อดี ทั้งในแง่ของการนำเซลล์ครึ่งกลับมาใช้ซ้ำ และความสะดวกในการเก็บเกี่ยวผลผลิต จะส่งผลดีใน ด้านการลดต้นทุนในการผลิต ซึ่งทำให้การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์ครึ่งนี้เป็นอีก ทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไป

รายงานที่เกี่ยวข้องกับการนำเซลล์ครึ่งกลับมาใช้ซ้ำได้แก่

Yang และคณะ (1993) รายงานการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เซลล์ครึ่งของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 ในถังหมักชนิด fibrous bed ซึ่งทำการหมักโดย เติมน้ำนมใหม่เมื่อครบระยะ 29 ชั่วโมงต่อหนึ่งรอบการหมัก ระยะเวลาทั้งหมด 2 สัปดาห์ พบว่า เมื่อเข้าสู่ระยะการหมักรอบที่ 2 เป็นต้นไป ความหนาแน่นของเซลล์ลดลงช้าๆ เช่นเดียวกับ ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตซึ่งมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง สำหรับปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่วัดได้ นั้น เมื่อเข้าสู่ช่วงระยะการหมักรอบที่ 2 ปริมาณน้ำตาลแลคโตสคงเหลือเพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบ การหมักที่มากขึ้น ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้เท่ากับร้อยละ 46 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของ ปริมาณน้ำตาลแลคโตสในอาหาร ณ ชั่วโมงที่ 35-45 ของการหมัก

Rickert และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium thoenii* P20 ที่ครึ่งเซลล์โดยใช้แคลเซียมอัลจินेटโดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นซับสเตรต โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้น ร้อยละ 40 ทำการหมักรอบละ 12 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเดิมออก ใส่อาหารใหม่แทนที่ เช่นนี้จนครบ 6 รอบการหมัก ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 34 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส เริ่มต้น 75 กรัมต่อลิตร

Damirel และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากเซลล์ครึ่งของเชื้อ *Aspergillus niger* A-9 .ในอาหารสังเคราะห์ ทำการหมักรอบละ 4 วัน จากนั้นเปลี่ยนอาหารเดิมออก และเติม อาหารใหม่ลงแทนที่ พบว่าปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในการหมักรอบที่ 1 และเมื่อจำนวนรอบการ หมักเพิ่มมากขึ้น ปริมาณกรดซิตริกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

4.6 ผลการศึกษาปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สะสมในเซลล์ครึ่ง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

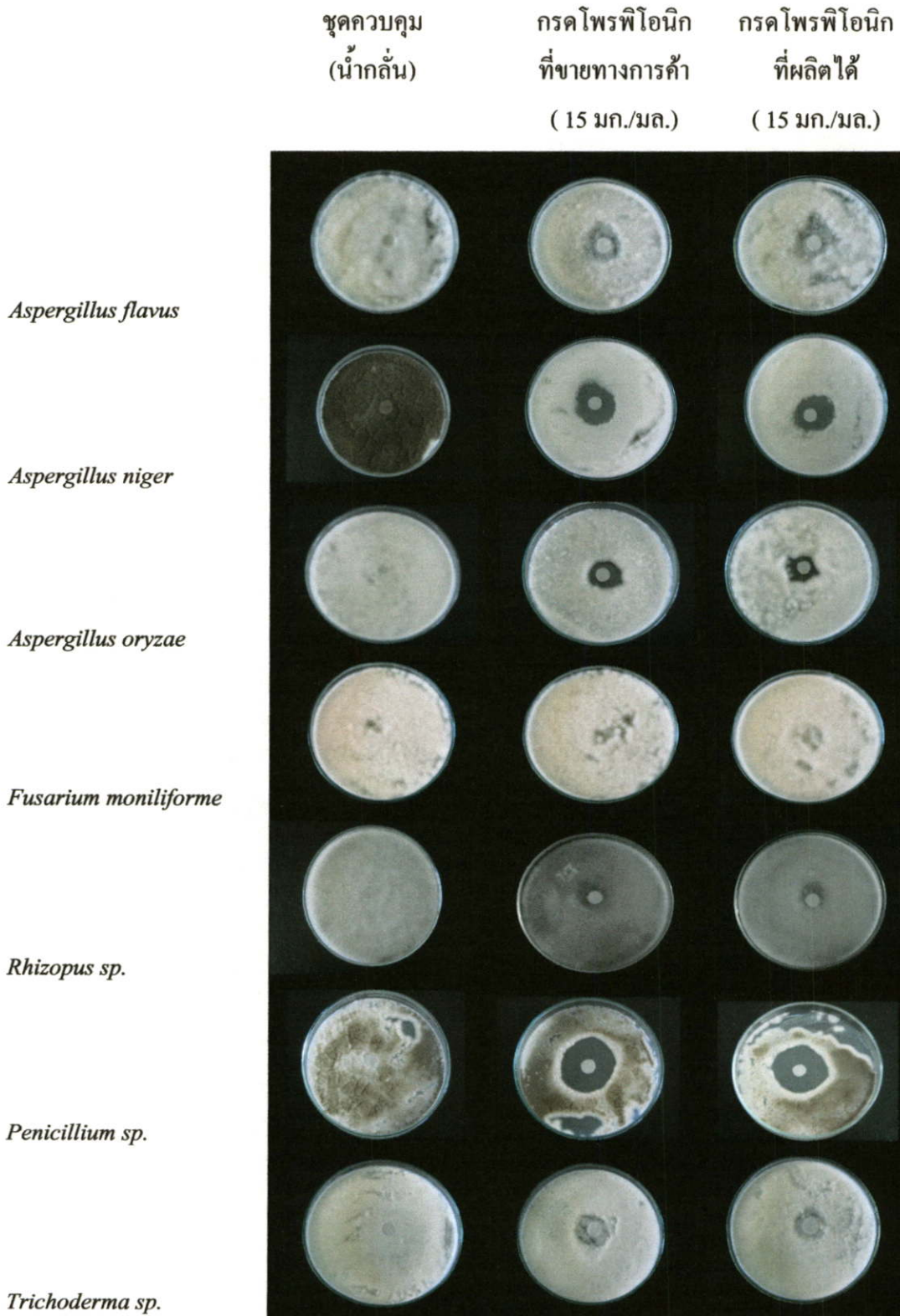
ในการหมักเซลล์ครึ่ง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 หลังครบ ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง นำเซลล์ครึ่งน้ำหนัก 10 กรัมเจล มาทำการละลายเจล โดย เติมน้ำละลายฟอสเฟต-ซีเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 7 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดโพรพิโอนิกด้วยเครื่อง HPLC : SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS (JAPAN) : INERTSIL C8-3 (ภาคผนวก ข) ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณ พบว่าสามารถวัดปริมาณ

กรดโพรพิโอนิกได้ 0.37 กรัมต่อลิตร (ดังแสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข-5) ซึ่งเท่ากับ 0.74 มิลลิกรัมกรดโพรพิโอนิกต่อกรัมเจล แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่ถูกตรึงโดยอัลจินตมีการส่งผ่านกรดที่ผลิตออกนอกวัสดุหุ้มเซลล์ แต่การส่งผ่านสารนั้นทำได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น กรดโพรพิโอนิกที่เซลล์ผลิตยังคงตกค้างอยู่ในวัสดุหุ้มเซลล์ ไม่สามารถส่งผ่านสู่ภายนอกได้ทั้งหมด จึงเกิดการสะสมของกรดโพรพิโอนิกบางส่วนที่เซลล์ตรึงผลิตขึ้นในเม็ดเจล และปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สะสมอยู่นี้อาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ภายในเม็ดเจลโดยตรง

Champagne และคณะ (1989) รายงานว่า เซลล์ตรึง *Propionibacterium shermanii* B-123 ที่หมักในเวย์ซึ่งผ่านการเติมหัวเชื้อ *Lactobacillus helveticus* ลงไปช่วยในการเปลี่ยนเวย์ให้เป็นแลคเตต มีการรับสารอาหารจากภายนอกในระดับต่ำกว่าปกติ ในขณะที่เดียวกัน พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่เซลล์ผลิตมีการสะสมอยู่ด้านในวัสดุหุ้มเซลล์ในระดับสูง แต่การหมักซึ่งควบคุมให้มีการกวนในระดับต่ำ จะมีผลทำให้การแลกเปลี่ยนซัสเตรตเข้าสู่เซลล์ และการส่งผ่านผลิตภัณฑ์สู่อาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกเกิดขึ้นที่พื้นผิวโดยรอบของอัลจินตได้ดียิ่งขึ้น

4.7 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายในทางการค้าโดยวิธี paper disc agar diffusion method

ในการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพ เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายในทางการค้า (CARLO ERBA REAGENT s.r.l : Code no. 306254) ซึ่งผลิตด้วยกระบวนการทางเคมี โดยวิธี paper disc agar diffusion method พบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์เช่นเดียวกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายในทางการค้า แสดงผลดังรูปที่ 4.16 และ รูปที่ 4.17



รูปที่ 4.16 แสดงผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา อายุ 4 วัน ด้วยวิธี paper disc agar diffusion method เปรียบเทียบระหว่างกรด โพรพิโอนิกที่ขายทางการค้ากับกรด โพรพิโอนิกที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ

ชุดควบคุม
(น้ำกลั่น)

กรดโพรพิโอนิก
ที่ขายทางการค้า
(15 มก./มล.)

กรดโพรพิโอนิก
ที่ผลิตได้
(15 มก./มล.)

Candida albicans

Candida sake

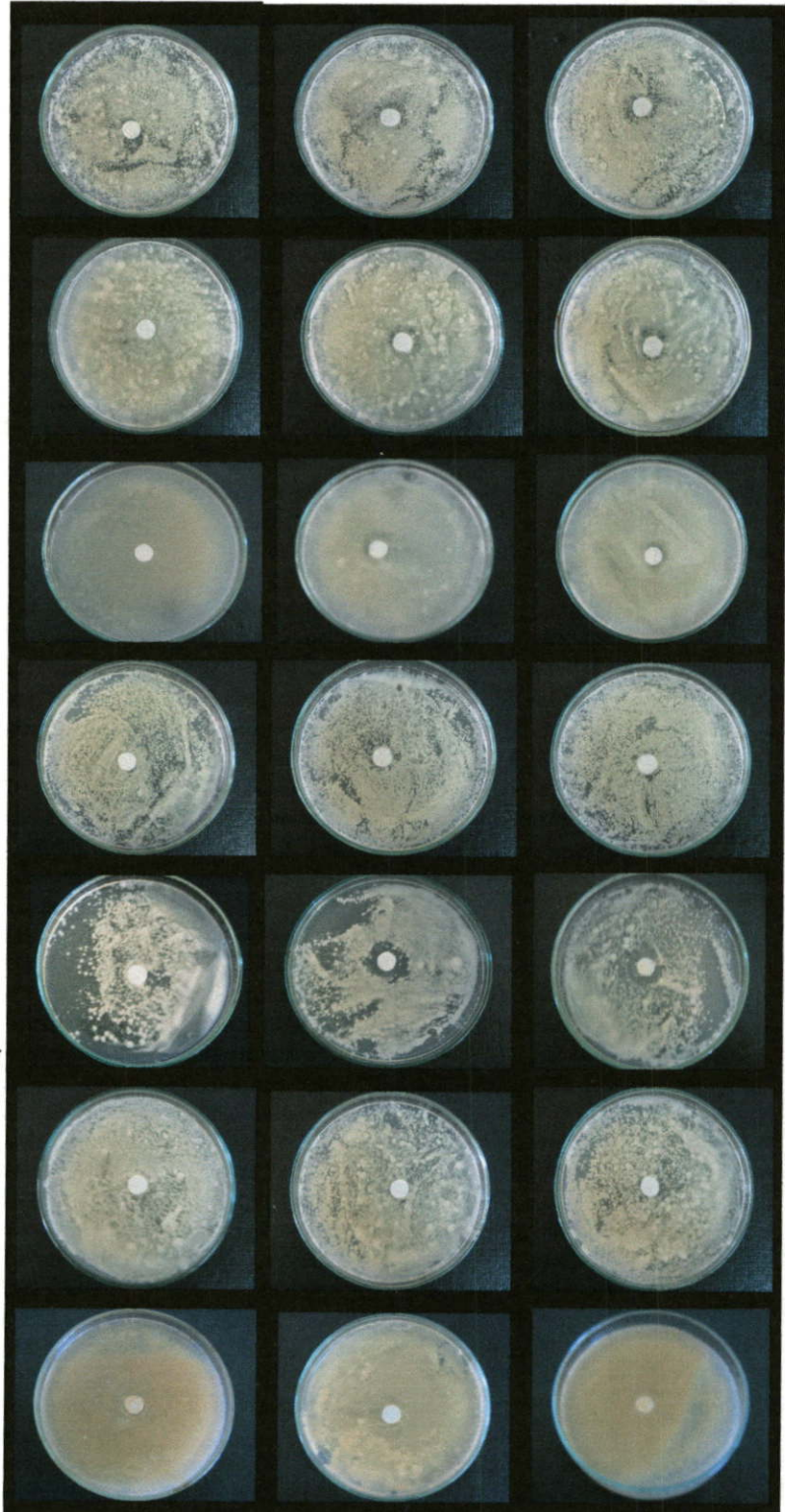
Pichia membranefaciens

Saccharomyces cerevisiae

Zygosaccharomyces rouxii

Kluyveromyces marxianus

Rhodotorula glutinis



รูปที่ 4.17 แสดงผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อยีสต์ อายุ 4 วัน ด้วยวิธี paper disc agar diffusion method เปรียบเทียบระหว่างกรด โพรพิโอนิกที่ขายทางการค้ากับกรด โพรพิโอนิกที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ

ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยกระบวนการทางชีวภาพที่มีความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.* และ เชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* โดยวัดบริเวณการยับยั้งได้ 2.38, 1.94, 1.58, 3.14 และ 1.68 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าที่มีความเข้มข้นเท่ากัน วัดบริเวณการยับยั้งได้ 2.42, 1.92, 1.68, 3.28 และ 1.72 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งบริเวณการยับยั้งมีขนาดใกล้เคียงกัน และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ากรดโพรพิโอนิกทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แสดงผลดังตาราง 4.8

ตาราง 4.8 แสดงค่า p-value ของการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ ของกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยวิธี T-test

ประเภท	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
บริเวณยับยั้งของกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้า (เซนติเมตร)	2.42	1.92	1.68	3.28	1.72
บริเวณยับยั้งของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากกระบวนการชีวภาพ (เซนติเมตร)	2.38	1.94	1.58	3.14	1.68
ค่า p-value	0.622 ^{ns}	0.56 ^{ns}	0.392 ^{ns}	0.31 ^{ns}	0.147 ^{ns}

หมายเหตุ

** ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

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

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

กรดโพรพิโอนิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าเชื้อยีสต์ ดังจะเห็นได้จากความสามารถในการยับยั้งเชื้อราจำนวน 4 ชนิดที่นำมาทดสอบ และยิ่งไปกว่านั้นคือการที่กรดโพรพิโอนิกสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ใน *A. niger* ได้ นอกเหนือจากการยับยั้งการเจริญโดยทั่วไป ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 4.16 ซึ่งในชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่น เชื้อรา *A. niger* มีการเจริญ

และสร้างสปอร์ขึ้นในงานเพาะเชื้อ แต่ในชุดทดลองที่ใช้กรดโพรพิโอนิกที่ขายในทางการค้าและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ มีการเจริญของเชื้อในช่วงรอบนอกของบริเวณยับยั้ง แต่ไม่พบการสร้างสปอร์เกิดขึ้น

ในส่วนของเชื้อยีสต์ จากรูปที่ 4.17 พบว่า กรดโพรพิโอนิกสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้เพียงเชื้อเดียว คือ *Z. rouxii* อย่างไรก็ตาม สำหรับจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบทั้งหมด พบว่า เชื้อรา *A. flavus* และ *Trichoderma sp.* นั้น กรดโพรพิโอนิกไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ แต่มีผลทำให้การเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ลดลง ซึ่งสังเกตได้จากบริเวณโดยรอบแผ่น disc มีการเจริญของจุลินทรีย์น้อยกว่าบริเวณอื่นๆอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับยีสต์สกุล *Candida* และ *Pichia membranefacien* ซึ่งตรวจพบการเจริญของจุลินทรีย์โดยรอบแผ่น disc น้อยกว่าบริเวณอื่น นั่นหมายถึงกรดโพรพิโอนิกอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวได้ หากมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งที่มากพอ สำหรับเชื้อรา *F. moniliforme* และเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* *K. marxianus* และ *R. glutinis* นั้น กรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวได้

มีการศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ของ Lind และคณะ (2005) รายงานว่า กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากเชื้อ *Propionibacterium acididpropionici* *P. freudenreichii subsp. shermanii* *P. freudenreichii subsp. freudenreichii* *P. thoenii* และ *P. jensenii* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhodotorula mucilaginosa* , *Penicillium roqueforti* และ *Aspergillus fumigatus* ในอาหาร sodium lactate agar ที่ pH 7.0 โดยใช้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิก 37.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้น ที่ pH 5.0 และ 3.0 ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ลดลงเหลือเท่ากับ 4.4 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Schwenninger และ Meile, 2004 รายงานว่าการใช้แบคทีเรีย *Propionibacterium jensenii* SM11 และ *Lactobacillus paracasei* SM20 SM29 และ SM63 ร่วมกันมีผลยับยั้งยีสต์ในสกุล *Candida sp.* และ *Zygosaccharomyces bailii* ที่เป็นต้นเหตุให้ผลิตภัณฑ์ประเภทเนยแข็งและโยเกิร์ตเน่าเสีย เมื่อกำหนดอัตราส่วนความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5×10^7 เซลล์ต่อกรัม และ 1×10^8 เซลล์ต่อกรัมของแบคทีเรียในกลุ่ม *Propionibacterium* และ *Lactobacilli* ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

อาหารเวย์ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์อิสระในถังหมักเท่ากับ 15.16 ± 0.24 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.070 ± 0.001 กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง ระยะเวลาการหมัก 216 ชั่วโมง ซึ่งการเลี้ยงเชื้อในถังหมักเกิดผลผลิตเร็วกว่าในฟลาสก์ เนื่องจากถังหมักมีการควบคุมสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดได้ดีกว่า ในการใช้เซลล์ตรึงเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ ซึ่งให้ปริมาณผลผลิตกรดสูงสุด คือ ที่ระยะทาง 4 ถึง 6 เซนติเมตรจากปลายสายยางจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ อัตราการไหลของสารละลายเจล 7 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อนำเซลล์ตรึงมาเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยมีการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ร่วมกับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มัล เพื่อรักษาระดับ pH มีผลทำให้เซลล์ตรึงผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 จะช่วยชะลอการเพิ่มสภาพความเป็นกรดในอาหาร ซึ่งมีสาเหตุมาจากปริมาณกรดที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น และหากมีการเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต จะยังเป็นการรักษาระดับ pH ให้คงที่ที่ 6.5 ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก และทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตอยู่รอดในระบบได้นานกว่า แม้ว่าโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จะส่งผลดีในแง่ของการรักษาระดับ pH แต่ผลเสียของการเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ คือ ทำให้เกิดผลกระทบต่อความคงตัวของเซลล์ตรึงเนื่องจากการที่เม็ดเจลสัมผัสโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ทำให้โพแทสเซียมไอออน (K^+) เข้าแทนที่แคลเซียมไอออน ความคงตัวของเจลลดลง และเกิดการละลายตัวในที่สุด ซึ่งในงานวิจัยนี้ เซลล์ตรึงมีศักยภาพความคงตัวในการนำมาใช้ซ้ำรวม 2 รอบผลผลิตกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 15.85 ± 0.25 และ 13.39 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ในรอบการหมักที่ 1 (192 ชั่วโมง) และรอบการหมักที่ 2 (216 ชั่วโมง) ตามลำดับ สูงกว่าปริมาณกรดที่ได้จากการหมักเซลล์อิสระในถังหมัก ณ ชั่วโมงที่ 216 เท่ากัน และเมื่อครบระยะเวลาการหมักรอบที่ 2 พบว่าเม็ดเจลเกิดการละลายตัว ทำให้ไม่สามารถทำการหมักในรอบต่อไปได้ อย่างไรก็ตาม เซลล์ตรึงที่ผ่านการหมักรวม 336 ชั่วโมง มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกสะสมภายในเม็ดเจลเท่ากับ 0.74 มิลลิกรัมกรดโพรพิโอนิกต่อกรัมเจล ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในเม็ดเจล เนื่องจากสภาวะกรดที่เกิดขึ้น กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพ ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger*,

Aspergillus oryzae, *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.* และยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* ได้ดี
เทียบเท่ากับกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าซึ่งผลิตด้วยกระบวนการทางเคมี ที่ความเข้มข้น
เท่ากัน

บรรณานุกรม

- กุลยา จันทร์อรุณ. 2533. **เคมีอาหาร**. หน่วยศึกษานิเทศน์ กรมการฝึกหัดครู, กรุงเทพฯ.
315 หน้า
- ชลัท สานทิวราจกณดา. 2534. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเครื่องดื่มจากเวย์. **ปัญหา
พิเศษภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยี
พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.**
- บุษบา ยงสมิทธิ. 2542. **จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ. น. 114-116
- วรรณฯ ตั้งเจริญชัย. 2532. **เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการนมและผลิตภัณฑ์นม. ภาควิชา
อุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ
ทหาร ลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.**
- ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ. 2526. การผลิตผลิตภัณฑ์นมและการจัดการ.
**เอกสารประกอบการฝึกอบรมเกี่ยวกับเทคโนโลยีทางอาหารนม ชุดที่ 3. สถานีบำรุงพันธุ์
สัตว์, เชียงใหม่. 262 หน้า**
- ศิวาพร ศิวเวช. 2535. **วัตถุดิบในอาหาร**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 327 หน้า
- สุนารณ อร่ามเรือง. 2550. “การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ
Propionibacterium acidipropionici ATCC 4965” **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 84 หน้า**
- สุรีย์ ทองวงษ์นิคม. 2543. “การใช้ประโยชน์จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล เพื่อผลิต
วิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วย
แคลเซียมอัลจินต”. **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอม
เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. น. 16-22.**
- A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical
Chemists. 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- A.O.A.C. 2000. Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical
Chemists. 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Alfa – Laval. 1987. **Dairy Handbook**. Food Engineering AB, Sweden. 333 pp.
- Ates, S., Dingil, N., Bayraktar, E. and Mehmetoglu, U. 2002. “Enhancement of citric acid
production by immobilized and freely suspended *Aspergillus niger* using silicone oil”.
Journal of Process Biochemistry. 38 : 433-436

- Barbirato, F., Chedaille, D. and Bories, A. 1997. " Propionic acid fermentation from glycerol : comparison with conventional substrates ". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 47 : 441 -446.
- Bunchanan, R.L. and Ayres, J.C. 1976. " Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 ". **Journal of Food Protection**. 49 : 128 – 132.
- Cavin, J.F., Saint, C. and Divies, C. 1985. " Continuous production of Emmental Cheese flavous and propionic acid starters by immobilized cells of a propionic acid bacterium ". **Biotechnology Letter**. 7 : 821 – 826.
- Champagne, C.P., Baillargeon, C. and Goulet, A. 1989. " Whey fermentation by immobilized cells *Propionibacterium shermanii* ". **Journal of Applied Bacteriology**. 66 : 175 – 184.
- Cheetham, P.S.J. 1979. "Physical studies in cell immobilization using calcium alginate gels". **Biotechnology and Bioengineering**. 21 : 2155-2168.
- Cheetham, P.S.J. 1980. Developments in the immobilization of microbial cells and their application. In Wiseman, A., editor. Topics in Enzyme and Ferment. **Journal of Biotechnology**. 4 : 189-242.
- Chibata, I. And Tosa, T. 1977. " Transformation of organic compounds by immobilized microbial cells". **Advances in Applied Microbiol.** 22 : 1-25.
- Colomban, A., Roger, L. and Boyaval, P. 1993. " Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling ". **Biotechnology and Bioengineering**. 42 : 1091 – 1098.
- Daniel, R. 1995. Microbial Physiology and Metabolism. Wm.C. Brown Communication
- Dibner, J. 2004. " Can they replace antibiotic growth promoters? ". **Feed International** . 25 (12) : 14-16.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A. and Smith F. 1956. " Colorimetric method for dertermination fo sugars and related substances". **Analytical Chemistry**. 28 : 350 – 356.
- Faria, T. J., Ferreira, R. F., Yassumoto, L., De Souza, J. R. P., Ishikawa N.K. and Barbosa, A.M. 2006. "Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi". **Braz. arch. biol. technol.** 49 (6)

- Fitzpatrick, J.J. and O’Keeffe, U. 2001. “ Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentation for production lactic acid ”. **Process Biochemistry**. 37 : 183 – 186
- Ghosh, S., Sadhukhan, P.C., Chaudhuri, J., Ghosh, D.K. and Mandal, A. 1996. “Volatilization of mercury by immobilized mercury-resistant bacterial cells” . **Applied Bacteriology**. 81 : 104-108.
- Goswami, V. and Srivastava, A.K. 2000. “ Feb-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* ”. **Journal Biochemical Engineering**. 4 : 121 – 128.
- Gu, Z., Glatz, B. A. and Glatz, C. E. 1998. “ Propionic Acid Production by Extractive Fermentation I. Solvent Considerations ”. **Biotechnology and Bioengineering**. 57 : 454 – 461.
- Gurr, M.J., Marshall, V.M. and Fuller, F. 1984. “ Fermented milk ”. Intestinalmicroflora and nutrition in Fermente Milk. **IDF Bullertin Dee**. 179 : 54 – 59.
- Himmi, E.H., Bories, A., Boussaid, A. and Hassami, L. 2000. “ propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* ”. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 53 : 435 – 440.
- Hsu, S. and Yang, S. 1991. “ Propionic acid fermentation of Lactose by *Propionibacterium acidipropionici* : effects of pH ”. **Biotechnology and Bioengineering**. 38 : 571 – 578.
- Jianlong, W. 2000. “ Production of citric acid by immobilized *Aspergillus niger* using a rotating biological contactor(RBC) ”. **Bioresource Technology**. 31 : 245 – 247.
- Kessler, H.G. 1981. **Food Engineering and Dairy Technology**. Verlag A. Kessien, Germany. 654 pp.
- Klinkenberg, G., Lystad, K.G., Levine, D.W. and Dyrset, N. 2001. “Cell Release from Alginate Immobilized *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in Chitosan and Alginate Coated Beads” **Dairy Sci**. 84 : 1118 – 1127.
- Kosikowski, F.V. 1997. **Cheese and fermented milk foods**. Enwards Erothers, Ic. Ann Arbor. Michigan : p.70.
- Lewis, V. and Yang, S. 1992. “ Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* : effect of growth substrate ”. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 37 : 437 – 442.

- Lind, H., Jonsson, H. and Schnurer, J. 2005. "Antifungal effect of dairy propionibacteria contribution of organic acid". **Journal of Food Microbiology**. 98 : 157 – 165.
- Martinez-Campos, R. and Torre, M. 2002. " Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose ". **Biotechnology Letters**. 24 : 427 – 431.
- Michelson, T., Kask, K., Jogi, E., Talpsep, E., Suitso, I. and Nurk, A. 2006. "L(+)-lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactic* DSM 20073". **Enzyme and Microbial Technology**. 39 : 861 – 867.
- Nielsen, E.W. and Ullum, J.A. 1989. **Dairy Technology**. Danish Turkey Dairies Ltd., New York.p.418.
- O'Brien, J.D., Panzer, C.C. and Eisele, P.W. 1990. "Biological Production of Acrylic Acid from Cheese Whey by Resting Cells of *Clostridium propionicum*". **Biotechnol. Prog.** 6(4) : 237 – 242.
- Paik, H.D. and Glatz, B.A. 1994. " Propionic acid production by immobilized cells of a propionate- tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* ". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 42 : 22-27.
- Pederson, A.H. and Warner, H. 1978. **IDF Bull.** p.106.
- Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. **Industrial Microbiology**. 3th ed. Mc Graw Hill Co, Inc., New York. p.50.
- Quesada-Chanto, A., Afschar, A.S. and Wagner, F. 1994. " Microbial production of propionic acid and vitamin B12 using molasses or sugar ". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 1 : 378 – 383.
- Quesada-Chanto, A., Afschar, A.S. and Wagner, F. 1994. " Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose ". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 42 : 16 – 21.
- Racker, M.O., Bern, C.J., Johnson, L.A. and Glatz, B.A. 1992. " Preservative of high moisture Maize by various propionate treatment ". **Cereal Chemists**. 69 : 66 – 69.
- Ramsay, J.A., Hassan, M.C. and Ramsay, B.A. 1998. " Biological conversion of hemicellulose to propionic acid ". **Enzyme and Microbial Technology**. 22 : 292 – 295.
- Renner, E. 1983. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition**, Verl. Munchen.

- Rickert, D. A., Charles, E. G., Bonita, A. G. 1998. "Improved organic acid production by calcium alginate-immobilized propionibacteria". **Enzyme and Microbial Technology**. 22 : 409 – 414.
- Schuppert, B., Schink, B. and Trosch, W. 1992. "Batch and continuous production of propionic acid from whey permeate by *Propionibacterium acidipropionici* in a three-electrode amperometric culture system". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 37 : 549 – 553.
- Schwenninger, S.M. and Meile, L. 2004. "A Mixed Culture of *Propionibacterium Jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Inhibits Food Spoilage Yeasts". **Applied Microbiology**. 27 : 229-237.
- Scott, R. 1986. **Cheesemaking Practise**. Science Publishers, London. p.529.
- Seshadri, N. and Mukhopadhyay, S.N. 1993. "Influence of environmental parameters on propionic acid upstream bioprocessing by *Propionibacterium acidipropionici*". **Journal of Biotechnology**. 29 : 321 – 328.
- Shaposhrikow, V.N. and Vorobeva, L.I. 1963. "Development of propionic acid bacteria and synthesis of vitamin B12 in synthetic and natural media". **Microbiology**. 32 : 204 – 208.
- Suwannakham, S. and Yang, S. 2005. "Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor". **Biotechnology and Bioengineering**. 91 : 325 – 337.
- Tittster, R.P. 1940. "The influence of hydrogen ion concentration upon the growth of *Propionibacterium*". **Journal of Biotechnology**. 39 : 95 – 96.
- Tyree, R.W., Clausen, E.C. and Gaddy, J.L. 1991. "The production of propionic acid from sugars by fermentation through lactic acid as an intermediate". **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 50 : 157 – 166.
- Vandegrift, E.E., Hesseltine, C.W. and Shotwell, O.L. 1975. "Grain preservative : Effect on Aflatoxin and ochratoxin production". **Cereal Chemists**. 52 : 79 – 84.
- Van Niel, C.B. 1928. "The propionic acid bacteria". **Journal of Milk Food Technology**. 35 : 295 – 447.
- Virtanen, A.I. 1923. "On the enzyme of bacteria and bacterial metabolism". **Journal of Bacteriology**. 28 : 447 – 460.
- Weaterguard, V. 1983. **Milk Powder Technology Evaporations and Spray Drying**. A/S Niro Atomizer, Copenhagen, Denmark. p.147.

Wood, H.G. and Werkman, C.H. 1940. "The relationship of bacterial utilization of CO₂ to succinic acid formation". **Journal of Biochemistry**. 34 : 129 – 137.

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

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

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

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

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

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

<http://www.food.oregonstate.edu/images/cheese/whey.jpg>

<http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>

<http://www.ratjes.nl/lactose.htm>

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว (MRS broth) ประกอบด้วย

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

วิธีการ

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารแข็ง (MRS agar) ประกอบด้วย

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

วิธีการ

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหารตัดแปลง (สูตรนารถ. 2550)

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	10	กรัม
แลคโตส (lactose)	40	กรัม
ทริปติกเคสซอชบรอต (trypticase soy broth)	5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.25	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.05	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	10	กรัม

วิธีการ

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตส แยกนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

1.4 อาหารเวย์ (สูตรนารถ. 2550)

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	10	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.25	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.05	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	10	กรัม

วิธีการ

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในเวย์ที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบแล้ว ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อโพเตโต เดกซ์โทรส (Potato Dextrose Agar : PDA)

มันฝรั่ง (รูปอินฟิวชัน)	100	กรัม
เดกซ์โทรส (Dextrose)	20	กรัม
วุ้น (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีการ

ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ใช้กรดคาร์ตริก 10 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH เป็น 3.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์ทั้งหมดโดยวิธี Total plate count (A.O.A.C. 2000)

วิธีการเตรียมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85

1. ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม ละลายในน้ำ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจาง
2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างแต่ละความเจือจางที่เหมาะสมใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วจานละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้ 3 จานในแต่ละระดับความเจือจาง
3. นำอาหารแข็ง MRS ไปหลอมให้ละลายแล้วทิ้งให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร
4. เขย่าจานโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนอุ่นแข็ง
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน
6. นับจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ยรายงานจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร โดยคูณค่าเฉลี่ยนั้นด้วยระดับความเจือจางที่ตรวจนับ

2. การวิเคราะห์น้ำตาล

แยกวิเคราะห์ 2 วิธี คือ วิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois. 1956) เพื่อหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) และวิธี Somogyi Nelson's Method (Nelson. 1952) เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

อุปกรณ์

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

2.1 การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois. 1956)

สารเคมี

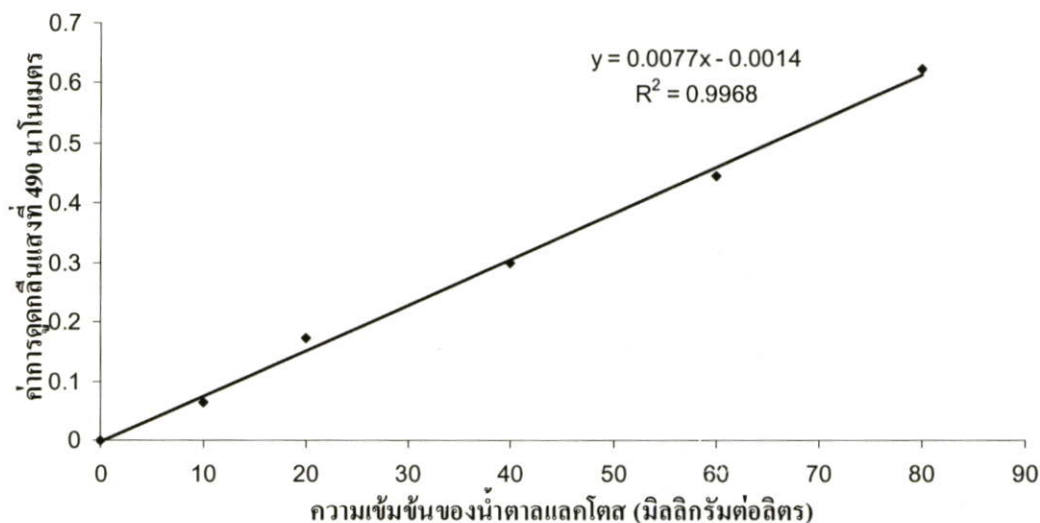
1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)
2. ฟินอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟินอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 95 กรัม
3. สารละลายแลคโตสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งแลคโตสมา 0.0500 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแลคโตสเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนี้

หลอดที่	สารละลายแลคโตส (500 มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายแลคโตส มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	0	10	0
2	0.2	9.8	10
3	0.4	9.6	20
4	0.8	9.2	40
5	1.2	8.8	60
6	1.6	8.4	80

วิธีการ

1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายแลคโตสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟินอล 5% ลงไป 1 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปทีผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสว่าคที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ข-1) เพื่อหาความเข้มข้นของแลคโตสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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



รูปที่ ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้น 0 ถึง 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธี Somogyi Nelson's Method

(Nelson, 1952)

สารเคมี

1. Copper reagent

1.1 เตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต ปริมาณ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.2. เตรียมสารละลายฟอสเฟต-ทาร์เทรต (Phosphate – Tartrate Solution)

เตรียมโดยชั่งสาร Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 70.5495 กรัม) ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ละลาย จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามด้วย Na_2SO_4 (anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วันจากนั้นกรองตะกอนทิ้งโดยใช้กระดาษกรอง whatman

1.3 นำสารละลายจากข้อ 1.1 (100 มิลลิลิตร) และ 1.2 (900 มิลลิลิตร) ผสมเข้าด้วยกัน

2. Nelson's Arsenomolybdate colour reagent

2.1 ละลายสาร Ammonium molybdate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ปริมาณ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2 ละลายสาร Disodium arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

2.3 ผสมสารในข้อ 2.1 และ 2.2 เข้าด้วยกัน เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง ในขวดสีชา

3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.0500 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-160 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (500 มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคส มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	0	10	0
2	0.2	9.8	10
3	0.4	9.6	20
4	0.8	9.2	40
5	1.2	8.8	60
6	1.6	8.4	80
7	2.0	8.0	100
8	2.4	7.6	120
9	2.8	7.2	140
10	3.2	6.8	160

วิธีการ

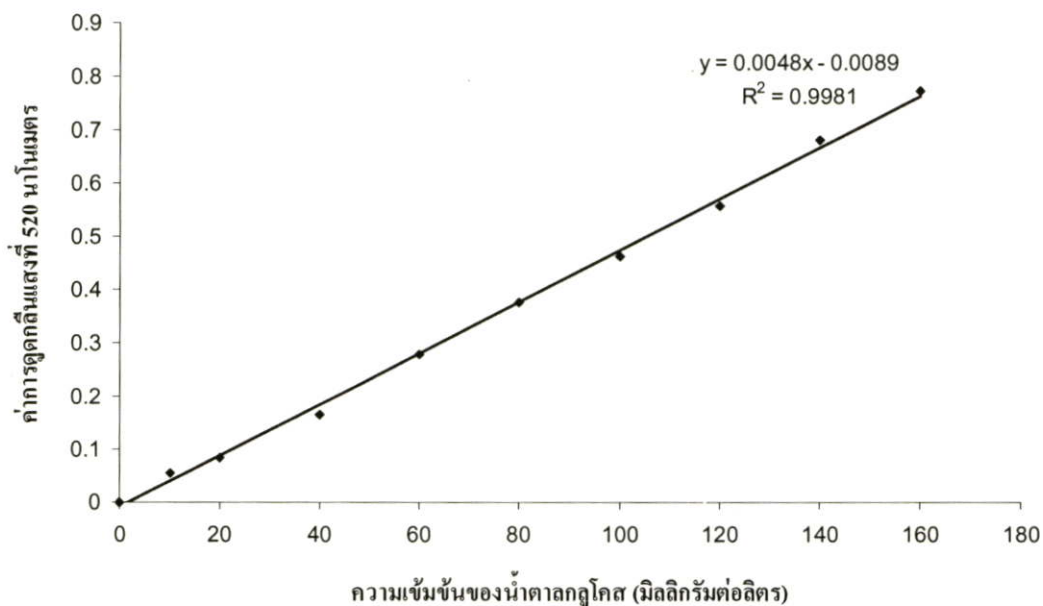
1. เติมสารตัวอย่าง หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-160 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม Copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ควรใช้ลูกแก้วปิดปากหลอดเพื่อลดการระเหยของน้ำ

2. ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็นจัด เติม Nelson's reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้า

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

4. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ข-2) เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส(กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times (1,000)}$$



รูปที่ ข-2 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 ถึง 160 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การละลายเจลอัลจินต โดยใช้สารละลายฟอสเฟต-ซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น

0.1 โมลต่อลิตร (Ghosh และคณะ. 1996)

การเตรียมฟอสเฟต-ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร

1. เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยชั่งโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 28.38 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

2. เตรียมสารละลายกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร

เตรียมสารละลายกรดซิตริก ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยชั่งกรดซิตริก 10.50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

3. นำสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตรเติมลงในสารละลายกรดซิตริกอย่างช้าๆ เพื่อปรับค่า pH เป็น 7.0

4. นำเม็ดเจลทั้งหมดมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมฟอสเฟต-ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตรลงไปในอัตราส่วน 1 : 9 (กรัมเม็ดเจล : ปริมาตรบัฟเฟอร์) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

5. ปิเปตต์ส่วนใส นำไปทำการเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธีการ Total plate count โดยใช้อาหาร MRS

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดโพธิ์ฟิโอนิกและกรดแลคติกด้วย HPLC

(High Performance Liquid Chromatography)

ป้อนตัวอย่างด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสรองผ่าน เซลลูโลสเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (SHIMADZU รุ่น C-R7 AE PLUS โดยใช้คอลัมน์ Inertsil C8-3 โดยมีโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวชะ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การเตรียมโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (Stock solution)

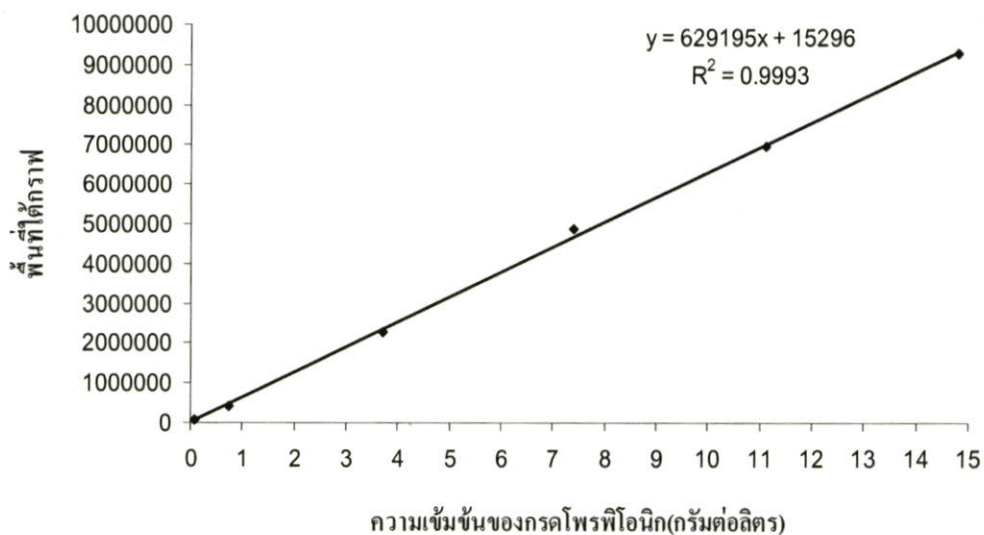
เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.7 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (Deionize water) และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยปีเปตกรดฟอสฟอริกเข้มข้นปริมาตร 3.4 มิลลิลิตร ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2. นำสารละลายมาตรฐานเข้มข้นโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ปรับ pH เป็น 3 ด้วยสารละลายมาตรฐานเข้มข้นกรดฟอสฟอริก

การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดโพธิ์ฟิโอนิก

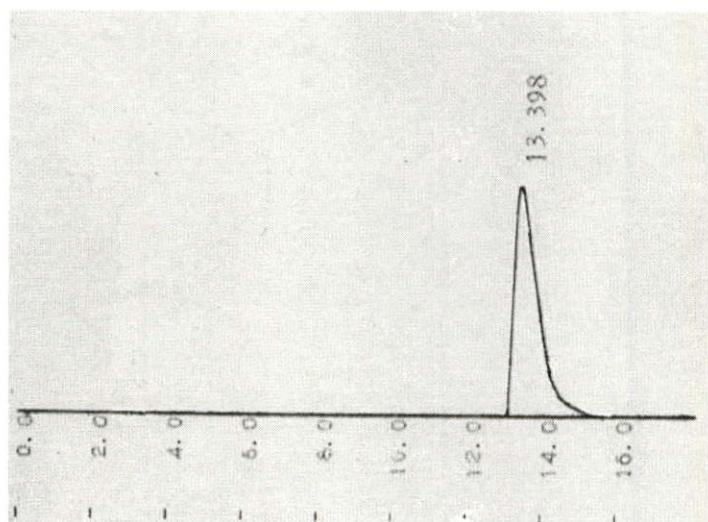
เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโพธิ์ฟิโอนิก ความเข้มข้น 1, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ปริมาณกรดโพธิ์ฟิโอนิกด้วย HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดโพธิ์ฟิโอนิก โดยคำนวณความเข้มข้นของกรดโพธิ์ฟิโอนิกมาตรฐานที่มีหน่วยมิลลิโมลาร์เป็นหน่วยกรัมต่อลิตร โดยกรดโพธิ์ฟิโอนิกความเข้มข้น 1, 10, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ เมื่อเปลี่ยนหน่วยจะเท่ากับ 0.074, 0.74, 3.70, 7.40, 11.11 และ 14.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ ข-3



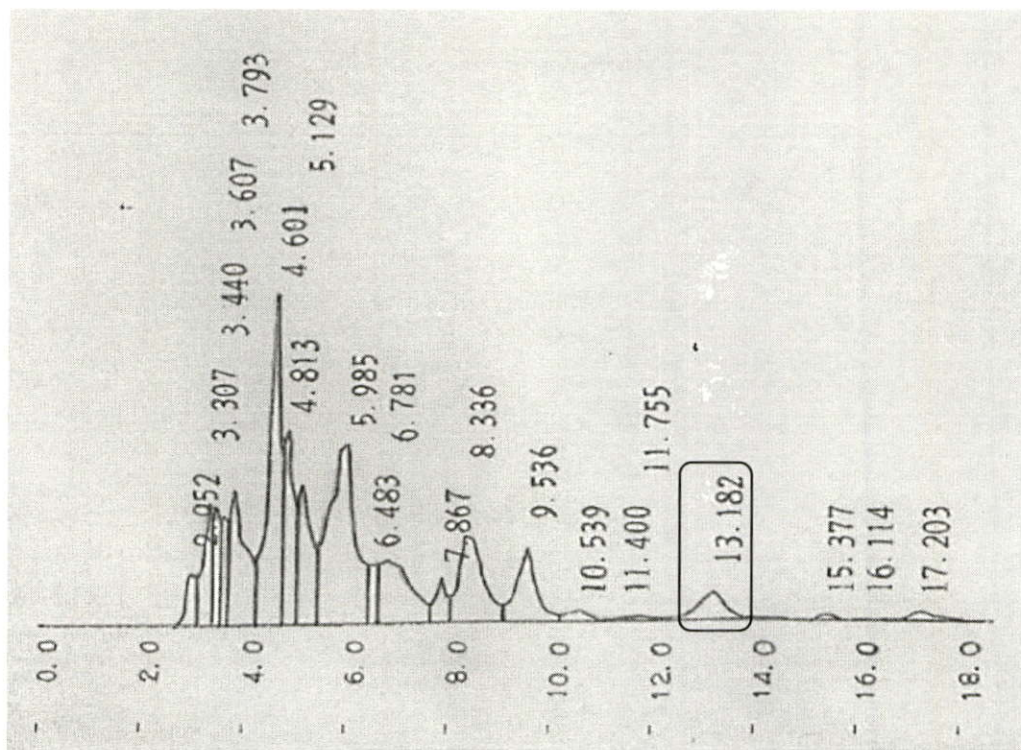
รูปที่ ข-3 แสดงกราฟมาตรฐานกรดไพโรฟิโอนิก

ตัวอย่างโครมาโตแกรม

โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดไพโรฟิโอนิก แสดงดังรูป ข-4 โดย retention time ของกรดไพโรฟิโอนิกเท่ากับ 13.398 นาที



รูปที่ ข-4 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดไพโรฟิโอนิก



รูปที่ ข-5 แสดงโครมาโตแกรมของกรดโพธิโอนิก (RT 13.182 นาที) ในเม็ดเจดเมื่อสิ้นสุดการหมัก

หมายเหตุ การแยกกรดโพธิโอนิกในเม็ดเจดอธิบายดังชั้นตอนที่ 3.10 หน้า 39

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ผลการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรด
โพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

ANOVA

Propionic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	278.080	5	55.616	316.810	.000
Within Groups	2.107	12	.176		
Total	280.187	17			

Propionic

Duncan

data	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
MRS	3	4.7500			
SYNTHETIC	3		5.7300		
WHEY	3		6.0400		
MRS+CaCO ₃	3			12.5200	
SYNTHETIC+CaCO ₃	3			13.0000	
WHEY+CaCO ₃	3				14.2600
Sig.		1.000	.383	.186	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2. ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici*
ATCC 4965 ในลักษณะเซลล์อิสระ ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและในถังหมักขนาด
2 ลิตร ณ ชั่วโมงที่ 216

2.1 ผลผลิตของเซลล์อิสระในถังหมักและฟลาสก์ 2 ลิตร

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 Flask	.3533	3	.12220	.07055
Fermentor	.4900	3	.15000	.08660

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 Flask & Fermentor	3	.982	.121

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Flask - Fermentor	-.13667	.03786	.02186	-.23071	-.04262	-6.252	2	.025

2.2 อัตราการผลิตของเซลล์อิสระในถังหมักและพลาสติก 2 ลิตร

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 Flask	.05100	3	.020000	.011547
1 Fermentor	.07000	3	.014000	.008083

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 Flask & Fermentor	3	1.000	.000

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Flask - Fermentor	.019000	.006000	.003464	-.033905	-.004095	-5.485	2	.032

2.3 ปริมาณกรดไพรูวอิกจากการหมักเซลล์อิสระในถังหมักและพลาสติก 2 ลิตร

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 Flask	11.0900	3	.75000	.43301
1 Fermentor	15.1600	3	1.25000	.72169

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 Flask & Fermentor	3	1.000	.000

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Flask - Fermentor	4.07000	.50000	.28868	-5.31207	-2.82793	-14.099	2	.005

3. ผลการศึกษาระยะทางจากปลายสายจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียม คลอไรด์ที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์^d

ANOVA

Propionic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.031	7	1.433	10.517	.000
Within Groups	2.180	16	.136		
Total	12.211	23			

Propionic

Duncan^a

data	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
20 cm.	3	16.6700			
15 cm.	3	17.2000	17.2000		
10 cm.	3		17.3800		
2 cm.	3		17.6800	17.6800	
8 cm.	3			18.2300	18.2300
4 cm.	3				18.3700
6 cm.	3				18.4900
5 cm.	3				18.5300
Sig.		.098	.150	.087	.374

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4. ผลการศึกษ้อัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายเจด

ANOVA

Propionic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.112	2	.056	186.333	.000
Within Groups	.002	6	.000		
Total	.114	8			

Propionic

Duncan^a

data	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
flowrate 5 ml./min	3	18.9700	
flowrate 6 ml./min	3		19.1900
flowrate 7 ml./min	3		19.2200
Sig.		1.000	.078

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5. ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร

5.1 อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการหมักเซลล์ตรึง ในพลาสติก 2 ลิตร ที่มีการเติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	addedCaCO3	.04400	3	.016000	.009238
	withoutCaCO3	.02500	3	.009000	.005196

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	addedCaCO3 & withoutCaCO3	3	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	addedCaCO3 - withoutCaCO3	.019000	.007000	.004041	.001611	.036389	4.701	2	.042

5.2 ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการหมักเซลล์ตรึง ในพลาสติก 2 ลิตร ที่มีการเติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	addedCaCO3	.3900	3	.14000	.08083
	withooutCaCO3	.2300	3	.08000	.04619

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	addedCaCO3 & withooutCaCO3	3	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	addedCaCO3 - withooutCaCO3	.16000	.06000	.03464	.01095	.30905	4.619	2	.044

5.3 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการหมักเซลล์ตรึง ในพลาสติก 2 ลิตร ที่มีการเติมและ
ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	addedCaCO3	14.7800	3	1.00000	.57735
	withoutCaCO3	8.3300	3	2.02000	1.16625

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	addedCaCO3 & withoutCaCO3	3	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	addedCaCO3 - withoutCaCO3	6.45000	1.02000	.58890	3.91618	8.98382	10.953	2	.008

6. ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

6.1 อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการหมักเซลล์ตรึง ในพลาสติก 2 ลิตร ที่มีการเติม
และไม่เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	addedKOH	.08300	3	.009000	.005196
	withoutKOH	.06100	3	.006000	.003464

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	addedKOH & withoutKOH	3	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	addedKOH - withoutKOH	.022000	.003000	.001732	.014548	.029452	12.702	2	.006

6.2 ผลผลิตกรดโพรฟิโอนิกจากการหมักเซลล์ตรึง ในพลาสติก 2 ลิตร ที่มีการเติม และไม่เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	addedKOH	.4800	3	.10000	.05774
	withoutKOH	.3500	3	.09000	.05196

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	addedKOH & withoutKOH	3	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	addedKOH - withoutKOH	.13000	.01000	.00577	.10516	.15484	22.517	2	.002

6.3 ปริมาณกรดโพรฟิโอนิกจากการหมักเซลล์ตรึง ในพลาสติก 2 ลิตร ที่มีการเติม และไม่เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	addedKOH	15.8500	3	.94000	.54271
	withoutKOH	11.6600	3	1.56000	.90067

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	addedKOH & withoutKOH	3	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	addedKOH - withoutKOH	4.19000	.62000	.35796	2.64983	5.73017	11.705	2	.007

7. ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ตรึงของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในพลาสติกขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต และในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตควบคุม pH ด้วย โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์

7.1 อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการหมักเซลล์ตรึง ในพลาสติก 2 ลิตรที่เติม แคลเซียมคาร์บอเนต และในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตควบคุม pH ด้วย โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 flask	.05300	3	.010000	.005774
fermentor	.07300	3	.012000	.006928

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 flask & fermentor	3	1.000	.000

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 flask - fermentor	-.020000	.002000	.001155	-.024968	-.015032	-17.321	2	.003

7.2 ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการหมักเซลล์ตรึง ในพลาสติก 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต และในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตควบคุม pH ด้วย โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 flask	.3500	3	.10000	.05774
fermentor	.4700	3	.06000	.03464

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 flask & fermentor	3	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	flask - fermentor	-.12000	.04000	.02309	-.21937	-.02063	-5.196	2	.035

7.3 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการหมักเซลล์ตรึงในพลาสติก 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต และในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตควบคุม pH ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	flask	11.4800	3	1.34000	.77365
	fermentor	15.8500	3	.71000	.40992

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	flask & fermentor	3	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	flask - fermentor	-4.37000	.63000	.36373	-5.93501	-2.80499	-12.014	2	.007

8. ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์ของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยกระบวนการทางชีวภาพ เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้า

8.1 *Aspergillus niger*

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	bio	2.3800	3	.02000	.01155
	chem	2.4200	3	.10000	.05774

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	bio & chem	3	-1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	bio - chem	-.04000	.12000	.06928	-.33810	.25810	-.577	2	.622

8.2 *Aspergillus oryzae*

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	bio	1.9400	3	.03000	.01732
	chem	1.9200	3	.02000	.01155

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	bio & chem	3	-1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	bio - chem	.02000	.05000	.02887	-.10421	.14421	.693	2	.560

8.3 *Penicillium sp.*

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	bio	3.1400	3	.10000	.05774
	chem	3.2800	3	.08000	.04619

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	bio & chem	3	-1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	bio - chem	-.14000	.18000	.10392	-.58714	.30714	-1.347	2	.310

8.4 *Rhizopus sp.*

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	bio	1.5800	3	.06000	.03464
	chem	1.6800	3	.10000	.05774

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	bio & chem	3	-1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	bio - chem	-.10000	.16000	.09238	-.49746	.29746	-1.083	2	.392

8.5 *Zygosaccharomyces rouxii*

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	bio	1.6800	3	.05000	.02887
	chem	1.7200	3	.02000	.01155

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	bio & chem	3	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	bio - chem	-.04000	.03000	.01732	-.11452	.03452	-2.309	2	.147

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวพรวิสาข์ ยู่นประยงค์
วัน เดือน ปี เกิด	10 พฤษภาคม 2522
ภูมิลำเนา	จังหวัดชลบุรี
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2544 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2549
ที่อยู่ปัจจุบัน	113 หมู่ 1 ตำบลบ้านช้าง อำเภอนันทนิกม จังหวัดชลบุรี 20140