การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401

STUDIES ON PROPIONIC ACID PRODUCTION FROM WHEY BY *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 IN COMBINATION WITH *Lactococcus lactis* TISTR 1401

ฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ

RUTAIRAT SUTTHISUWAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401

STUDIES ON PROPIONIC ACID PRODUCTION FROM WHEY BY *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 IN COMBINATION WITH *Lactococcus lactis* TISTR 1401

ฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ

RUTAIRAT SUTTHISUWAN

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....74547.....
วัน,เดือน,ปี.....- 3 ต.ค. 2550.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

STUDIES ON PROPIONIC ACID PRODUCTION FROM WHEY BY *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 IN COMBINATION WITH *Lactococcus lactis* TISTR 1401

RUTAIRAT SUTTHISUWAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2007

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATS STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401
นักศึกษา	นางสาวฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ
รหัสประจำตัว	47063904
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lastis* TISTR 1401 พบว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ หัวเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 5 และหัวเชื้อ *Lactococcus lastis* ปริมาณร้อยละ 5 โดยการเติมหัวเชื้อทั้ง 2 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกันเมื่อเริ่มทำการทดลอง เมื่อทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่ต้องพ่นอากาศ ใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด คือ 17.27 กรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการหมัก 168 ชั่วโมง มีผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.443 กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.103 กรัมต่อลิตรชั่วโมง มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 2.90×10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 3.50×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

Thesis Title	Studies on Propionic Acid Production from Whey by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 in Combination with *Lactococcus lactis* TISTR 1401
Student	MissRutairat Sutthisuwan
Student ID	47063904
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2007
Thesis Advisor	Associate Professor Sukjai Choojun

ABSTRACT

Propionic acid production from whey by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 in combination with *Lactococcus lactis* TISTR 1401 was studied. It was found that the optimal initial inoculum size in propionic acid production was 5% *Propionibacterium acidipropionici* and 5% *Lactococcus lactis* by inoculating both cultures in a medium at the same time. Propionic acid production by batch fermentation conducted in 2 liters fermentor at 30°C , 150 rpm. and pH 6.5 producted maximum propionic acid (17.27 g/l in 168 hours). The propionic acid yield and its productivity were 0.443 (g/g) and 0.103 (g/l.h), respectively and the cell number increased from 2.90×10^{7} to 3.50×10^{10} cfu/ml.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถประสบความสำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่ามาให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เป็นประโยชน์ระหว่างการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี และ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ ที่กรุณาสละเวลาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาให้ความรู้ ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่อนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท Minor Cheese Limited ที่อนุเคราะห์เวย์ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นำมาใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ บัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีรวมทั้งอำนวยความสะดวกต่างๆระหว่างทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา ขอขอบคุณแตงโมที่ช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VII

สารบัญรูป VIII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก 3

2.2 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก 4

2.3 อันตรายจากกรดโพรพิโอนิก 6

2.4 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก 7

2.5 เวย์ 9

2.6 การใช้ประโยชน์จากเวย์ 12

2.7 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก 15

2.8 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก 17

2.9 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *propionibacterium*สายพันธุ์ต่างๆ 21

2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก 22

2.11 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสม 25

2.12 เชื้อจุลินทรีย์ *Lactococcus lactis* 26

2.13 การทำให้เป็นกลาง 27

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 29

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.1 อุปกรณ์ 29

3.2 วัตถุดิบ 30

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย 30

3.4 สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย 31

3.5 ศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร 31

3.6 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ผสมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร 32

3.7 ศึกษาอัตราการกวนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR ในถังหมักขนาด 2 ลิตร 33

3.8 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ 34

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ 35

4.1 ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร 35

4.2 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ผสมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร 45

4.3 ผลการศึกษาอัตราการกวนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร 52

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 63

บรรณานุกรม 64

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก 70

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 70
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ 72
ภาคผนวก ค ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ 78

ประวัติผู้เขียน 80

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก 5

2.2 องค์ประกอบโดยประมาณของสวีทเวย์และแอซิดเวย์.....10

2.3 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในนม เคซีน และเวย์.....12

2.4 องค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์.....12

2.5 แสดงการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ 21

4.1 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณกรดโพรพิโอนิก จากการใช้เชื้อผสมในการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิก.....45

4.2 แสดงค่าผลผลิตกรดโพรพิโอนิกและอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก ในการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 52

4.3 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ผลผลิตและอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร เมื่อใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5.....59

4.4 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติของปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการศึกษา การผันแปรอัตราการกวนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้หัวเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร 60

4.5 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก และอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกในการใช้เชื้อเดี่ยว ของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ5 ที่หมักในฟลาสก์ กับการผลิตโดยใช้เชื้อ ผสมที่หมักในถังหมัก 61

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 กรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิก....3

2.2 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก....4

2.3 สูตรโครงสร้างแสดงน้ำตาลแลคโตสที่ถูกไฮโดรไลส์....11

2.4 ขั้นตอนการผลิต Whey permeate....13

2.5 ความเป็นไปได้ที่จะนำเวย์มาใช้ประโยชน์....16

2.6 เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* 16

2.7 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสโดยเชื้อ *Propionibacterium* 17

2.8 การสร้าง ซัคซิเนต และ โพรพิโอเนต โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์....19

2.9 กระบวนการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็นกรดโพรพิโอนิก....19

2.10 วิถีอะครีเลตของการสร้างโพรพิโอเนต....20

2.11 เชื้อ *Lactococcus lactis*....27

2.12 การย่อยสลายน้ำตาลของเชื้อ *Lactococus lactis*....28

4.1 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และกรดแลคติกที่ทำการหมัก
โดยเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 35

4.2 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และกรดแลคติกที่ทำการหมัก
โดยเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10 37

4.3 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมัก
โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5....38

4.4 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมัก
โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10....39

4.5 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก
ที่ทำการหมักโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อ
ร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5....40

4.6 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก
ที่ทำการหมักโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อ
ร้อยละ10 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10....41

4.7 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก
ที่ทำการหมักโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อ
ร้อยละ10 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10....42

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.8 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 43

4.9 แสดงการเจริญและปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 46

4.10 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยการเติมเชื้อ*P. acidipropionici* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ไปพร้อมกันเมื่อเริ่มทำการทดลอง(ชั่วโมงที่ 0).... 47

4.11 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณ หัวเชื้อร้อยละ5 ในชั่วโมงที่12....48

4.12 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ในชั่วโมงที่24 49

4.13 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ในชั่วโมงที่48 50

4.14 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการศึกษาระยะเวลาการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณร้อยละ5 51

4.15 แสดงจำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการกวน 0 รอบต่อนาที 53

4.16 แสดงจำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที 54

4.17 แสดงจำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที 55

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.18 แสดงจำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก
ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร
ใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที 56

4.19 แสดงจำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก
ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร
ใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที 57

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทราและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Colomban และคณะ.1993) จึงนิยมใช้เป็นสารกันบูดในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ขนมปัง และอาหารสัตว์ (Quesada-Chanto และคณะ. 1994) ใช้ในอุตสาหกรรมการทำพลาสติกในรูปของ cellulose propionate (Barbirato และคณะ. 1997) นอกจากนั้นยังใช้เพื่อเป็นสารให้กลิ่นรส (Himmi และคณะ. 2000) กรดโพรพิโอนิกที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารนิยมใช้ในรูปของเกลือแคลเซียม โซเดียม และโพแทสเซียม (Hsu และ Yang. 1991) ในประเทศไทย พบว่ายังไม่มีการผลิตกรดโพรพิโอนิกในเชิงพาณิชย์

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตเพื่อการค้านิยมผลิตโดยกระบวนการทางเคมี(Himmi และคณะ. 2000) โดยใช้สารเริ่มต้นที่เป็นอันตราย เช่น propionaldehyde , methyl propylketone ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนสูงในการผลิตในช่วงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยลดขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และไม่เป็นพิษ (Paik และGlatz . 1994)

กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ นิยมใช้แบคทีเรียโพรพิโอนิกซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดี การใช้แบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถลดต้นทุนการผลิต แต่ใช้เวลาในการหมักนาน ข้อจำกัดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพโดยแบคทีเรียโพรพิโอนิกคือจะได้ผลผลิตกรดในปริมาณที่น้อย (Himmi และคณะ. 2000) เช่น การหมักแบบกะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียงร้อยละ 1-3 ซึ่งใช้เวลาในการหมัก 7-14 วัน (Schuppert และคณะ. 1992) ดังนั้นจึงได้มีการคิดหาวิธีเพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีต่างๆ เช่น การใช้การตรึงเซลล์ (Suwannakham และYang. 2005) การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะ(Martinez-Campos และTorre. 2002) การใช้ระบบ การหมักแบบต่อเนื่อง และการคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโพรพิโอนิก (Quesada-Chanto และคณะ. 1994)

ปัจจุบันเวย์เป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งโดยมีการนำเวย์ไปผลิตเป็นเวย์ผง เวย์เข้มข้น และเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ การทดลองนี้เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการใช้เวย์ให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าในเชิงพาณิชย์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเวย์ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401

1.2.2 ศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร กับถังหมักขนาด 2 ลิตร ด้วยการหมักแบบกะ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ด้วยการหมักแบบกะ

1.3.2 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ผสมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

1.3.4 ศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.3.5 วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ทั้งหมด กรดโพรพิโอนิก กรดแลคติก น้ำตาลแลคโตสในเวย์ก่อนและหลังทำการหมัก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็ง

1.4.2 ทราบถึงปริมาณที่เหมาะสมของหัวเชื้อในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401

1.4.3 ทราบถึงผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ด้วยการหมักแบบกะ

1.4.4 เป็นการศึกษาการนำเวย์ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็งมาใช้เป็นซับสเตรตในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับห้องปฏิบัติการ เป็นแนวทางการศึกษาและพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรม อีกทั้งเป็นแนวทางในการนำเวย์มาใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิกเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ เป็นกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อรา นิยมใช้เป็นสารป้องกันการเน่าเสียและช่วยในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร กรดโพรพิโอนิกสามารถพบได้ตามธรรมชาติในอาหารประเภทหมักดอง ในเหงื่อของคน และในกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง กรดโพรพิโอนิกสามารถละลายได้ดีในน้ำ เอทธานอล และอีเทอร์ ส่วนเกลือโพรพิโอเนตสามารถละลายน้ำได้ร้อยละ 30 แต่ไม่ละลายในไขมัน (Lind และคณะ. 2005)

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ซึ่งไม่แตกตัวจึงมีประโยชน์ในการทำลายจุลินทรีย์ โดยจะไปละลายสารภายในเยื่อหุ้มเซลล์ มีการตั้งสมมุติฐานว่ากรดทำลายจุลินทรีย์ได้โดยไปรบกวนการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะไปยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ ทำให้สภาพภายในของเซลล์นั้นมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่มีผลช่วยในการยับยั้งการเจริญและทำให้จุลินทรีย์ตายได้ในที่สุด ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นจะใช้กรดโพรพิโอนิกที่อยู่ในรูปของเกลือ ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 3 รูปแบบ คือ เกลือโซเดียม แคลเซียม และโปแทสเซียม โดยเกลือโซเดียมจะละลายได้ดีกว่าเกลือแคลเซียม ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมปังจะนิยมใช้กรดโพรพิโอนิกในรูปของเกลือแคลเซียม เนื่องจากจะเป็นการเพิ่มแคลเซียมไปในตัวด้วย (ศิวาพร ศิวเวช. 2546) สูตรโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิกดังแสดงในรูปที่ 2.1

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

รูปที่ 2.1 กรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิก

ที่มา : ศิวาพร ศิวเวช (2546)

กรดโพรพิโอนิกมีความปลอดภัยในการใช้ในอาหาร ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้ใช้กรดโพรพิโอนิกหรือแคลเซียมโพรพิโอเนตหรือโซเดียมโพรพิโอเนต ในผลิตภัณฑ์เนยแข็ง โดยให้ใช้ได้ในปริมาณสูงสุดไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัม (ศิวาพร ศิวเวช. 2546)

และในอาหารอื่นๆ เช่น แป้งที่ใช้ในขนมปังขาว และโรล ความเข้มข้นสูงสุดที่ให้ใช้ คือร้อยละ 0.32 สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ทำจากข้าวสาลีทั้งหมดความเข้มข้นสูงสุดที่ให้ใช้ คือร้อยละ 0.38 มีรายงานการใช้กรดโพรพิโอนิกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนี้

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

กุลยา จันทร์อรุณ (2533) รายงานว่า การใช้แคลเซียมโพรพิโอเนต และโซเดียมโพรพิโอเนตในขนมปังความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ถึง 0.4 ตามลำดับ จะสามารถป้องกันเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเมือกได้ การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของโซเดียมโพรพิโอเนตจะให้ผลที่พีเอช 3.5 ถึง 4.5 ดีกว่าที่พีเอชสูง

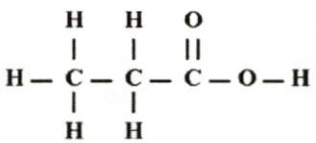
Vandegraft และคณะ (1975) ได้ทำการทดลองใช้กรดโพรพิโอนิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 28 พบว่าตลอดการทดลอง 29 สัปดาห์ ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* กับ *Aspergillus ochraceus* และสารอะฟลาทอกซิน B_1 กับสารโอคร่าทอกซินเลย

Buchanan และ Ayres (1976) รายงานว่าการใช้กรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อ 100 มิลลิกรัม ของอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. parasiticus* และการสร้างอะฟลาทอกซินได้บางส่วน แต่ถ้าเพิ่มเป็น 0.2 กรัมต่อ 100 มิลลิกรัม จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการสร้างอะฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 7 วัน

Racker และคณะ (1992) รายงานว่ากรดโพรพิโอนิกร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 26.8 และ 29.6 ได้ตลอดการทดลอง 42 สัปดาห์

2.2 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกมีสูตรทางเคมีคือ CH_3CH_2COOH ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.2 และคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพดังแสดงในตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก

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

ตารางที่2.1 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
ค่าพีเอช	2.9
การละลายในสารละลาย	สามารถละลายได้ในเอทธานอล ไดเอธิลอีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม
ความดันบรรยากาศ	2.55
ความดันไอ	0.32 ถึง 0.4 กิโลปาสคาล
อัตราการระเหย	ไม่ระเหย
อุณหภูมิวิกฤต	339 องศาเซลเซียส
ค่าความเป็นกรด	กรดอ่อน pKa 4.87
ความดันวิกฤต	5370 กิโลปาสคาล
ความคงตัว	มีความคงตัว
การกัดกร่อนเหล็ก	สามารถกัดกร่อน เหล็กกล้า นิกเกิล โครเมียม และตะกั่ว
สภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง	อุณหภูมิเกิน 50 องศาเซลเซียส
วัตถุที่ควรหลีกเลี่ยง	สารออกซิไดซ์ ,Reactive metal, Reducing agent กรดแก่

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

2.3 อันตรายจากกรดโพรพิโอนิก

2.3.1 อันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ

กรดโพรพิโอนิกทำให้เกิดอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ โดยความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดในอากาศ จะทำให้คัดจมูก เจ็บคอ ไอ เสียงแหบ หายใจติดขัด ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรเคลื่อนย้ายผู้ป่วยออกจากที่ซึ่งมีกรดโพรพิโอนิกและนำผู้ป่วยไปยังที่ที่มีอากาศปลอดโปร่งแล้วนำส่งแพทย์

2.3.2 อันตรายต่อผิวหนัง

อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อผิวหนังจะมีความรุนแรงระดับปานกลางถึงรุนแรงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดและลักษณะการสัมผัส หากสัมผัสกรดโดยตรงจะทำให้ผิวเกิดรอยแดงและเจ็บ ถ้ารุนแรงจะทำให้ผิวไหม้เกิดแผลพุพองและเนื้อเยื่อถูกทำลาย บาดแผลจะจางลงหลังจาก 40 นาที ผิวที่แดงอาจเกิดการบวมและเนื้อเยื่อตาย(necrosis) และจะหายดีใน 3 วัน การสัมผัสกรดอาจส่งผลอย่างรุนแรงหากไม่ทำการล้างกรดออกจากผิวหนัง อาจทำให้เกิดบาดแผลถาวรได้ จากการศึกษาพบว่ากรดโพรพิโอนิกสามารถซึมผ่านผิวหนัง ทำให้เกิดอันตรายได้ ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรล้างบริเวณผิวหนังที่โดนกรดด้วยน้ำสะอาดทันที ถ้ากรดมีความเข้มข้นสูงและบาดแผลมีอาการหนัก ควรนำส่งแพทย์

2.3.3 อันตรายต่อตา

อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อตาหากถูกไอของกรดที่มีความเจือจางเข้าตา ทำให้เกิดอาการตาแดงและเจ็บ ถ้าถูกกรดที่มีความเข้มข้นเข้าตาโดยตรง ทำให้กระจกตาไหม้ โดยระดับความรุนแรงขึ้นกับความเข้มข้นของกรด ถ้ารุนแรงมากอาจส่งผลถาวรและทำให้ตาบอด ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรล้างบริเวณผิวหนังที่โดนกรดด้วยน้ำสะอาดทันที แล้วนำส่งแพทย์โดยทันที

2.3.4 อันตรายต่อระบบทางเดินอาหาร

อันตรายของกรดโพรพิโอนิกต่อระบบทางเดินอาหารถ้าบริโภคกรดที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้ปาก ลำคอ กระเพาะ ได้รับบาดเจ็บ กรดโพรพิโอนิกไม่สะสมในร่างกาย ในธรรมชาติกรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตจากการแตกตัวของกรดไขมันและโซ่ข้างของคลอเรสเตอรอลในร่างกาย โดยร่างกายจะทำการดูดซึมอย่างรวดเร็วผ่านทางเดินอาหาร และถูกขับออกจากร่างกายอย่างรวดเร็วผ่านทางลมหายใจ ปัสสาวะ และอุจจาระ ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นควรนำผู้ป่วยล้างปากด้วยน้ำ อย่าชักนำให้ผู้ป่วยอาเจียน ให้ดื่มน้ำ 240-300 มิลลิลิตร หรือดื่มนมแล้วล้างปากผู้ป่วยทันที

2.4 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ 2 วิธี

1. กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี

การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยวิธีสังเคราะห์ทางเคมีเป็นวิธีที่นิยมใช้ผลิตในทางการค้าอยู่ในปัจจุบันเพราะเป็นกระบวนการผลิตที่ใช้เวลาในการผลิตสั้นและได้ผลผลิตตามต้องการ โดยใช้ปฏิกิริยาการออกซิเดชันของโพรพิโอนอลดีไฮด์ที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียส ดังสมการที่ 1 และ 2

$$CO + H_2 + C_2H_4 \longrightarrow CH_3CH_2CH \quad (1)$$

คาร์บอนโมโนออกไซด์ ไฮโดรเจน เอทีรีน โพรพิโอนอลดีไฮด์

$$CH_3CH_2CHO + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow CH_3CH_2COOH \quad (2)$$

โพรพิโอนอลดีไฮด์ ออกซิเจน กรดโพรพิโอนิก

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

2. กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ

รายงานการศึกษากระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium* มีดังนี้

Champagne และคณะ (1989) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *P. shermanii* สายพันธุ์ B-123 ที่ถูกตรึงอยู่ในแคลเซียมแอลจิเนทในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมหางนมและแลคเตต ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าเชื้อ *P. shermanii* จะใช้แลคเตตในการเจริญได้ดีกว่าแลคโตสที่มีอยู่ในหางนม เนื่องจากหางนมที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักนี้ได้มาจากการผลิตเนยแข็งที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อแลคโตบาซิลลัส(*Lactobacillus*) ซึ่งมีพีเอชค่อนข้างต่ำจึงต้องทำให้เป็นกลางด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ก่อนที่จะทำการหมัก และพบว่าอัตราการหมักจะสูงขึ้นเมื่อปรับพีเอชของหางนมด้วย แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และความเข้มข้นของแลคเตตที่ใช้อยู่ระหว่าง ร้อยละ 1-2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักกรดโพรพิโอนิก คือ 37 องศาเซลเซียส โดยที่อัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติกจะสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสูงขึ้น

Woskow และ Glatz (1991) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคโตสจากหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P9 และP200910 ในสภาพการหมักแบบกะและกึ่งกะ พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P200910 ให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 47 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าผลผลิตที่ได้จากสายพันธุ์ P9 และจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกสูงสุดโดยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ

Lewis และ Yang (1992) ศึกษาผลของซับสเตรตในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ในการทดลองใช้แลคโตส กลูโคส และแลคเตต ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเมื่อใช้แลคเตตจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่าแลคโตสและกลูโคส

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *P. acidipropionici* ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกและวิตามินบี 12 จากซูโครส พบว่าความเข้มข้นของซูโครส 30 ถึง 170 กรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลให้เกิดการยับยั้งจากซับสเตรต (substrate inhibition) สำหรับการผลิตเพื่อให้ได้กรดโพรพิโอนิกนั้นจะต้องทำในสภาวะที่ไม่มีอากาศที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และในการผลิตวิตามินบี 12 นั้นทำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีอากาศที่พีเอช 6.5

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคเตตจาก corn steep liquor (CSL) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P200910 เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแอลจิเนทและเชื้ออิสระในสภาพการหมักแบบกะ กึ่งกะ และต่อเนื่อง พบว่าการหมักแบบกะจะแสดงผลผลิตของกรดสูงสุดภายในเวลา 36 ชั่วโมง การใช้แลคเตตเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าการใช้กลูโคส และเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนตจะให้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าเชื้ออิสระ ส่วนการหมักแบบกึ่งกะใช้เวลาในการหมักนาน 250 ชั่วโมง ความเข้มข้นสูงสุดของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้กลูโคสจะสูงกว่าการใช้แลคเตต คือ 57 และ 45.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงผลผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการใช้กลูโคสจะสูงกว่าการใช้แลคเตตเป็นแหล่งคาร์บอน

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

Ramsay และคณะ (1998) ศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพเพื่อเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสเป็นกรดโพรพิโอนิก ในการศึกษาใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ hemicellulose hydrolysate ร้อยละ60 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร การเกิดกรดจะเกิดควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของเชื้อ มีอัตราการเจริญจำเพาะคือ 0.1 ต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกคือ 0.23 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Himmi และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* ssp.*shermanii* จะได้ผลผลิตสุดท้ายคือกรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ และได้ผลิตผลพลอยได้คือ กรดแอซีติก n-propanol และกรดซัคซินิก จากการทดลองนี้พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานจะผลิตกรดโพรพิโอนิกได้มากที่สุด *P. acidipropionici* มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นได้เร็วกว่า 0.64 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดสูงกว่า 0.42 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นความเข้มข้นของกรด แอซีติกที่ได้จะมากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นถึง 2 เท่า ส่วนเชื้อ *P. freudenreichii* เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการใช้กลีเซอรอลกับการสร้างผลผลิต แสดงว่าเมแทบอไลท์ของเชื้อ *P. freudenreichii* นั้นปรับตัวเพื่อนำไปใช้ในการสร้างสารประกอบตัวอื่นได้ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีเยี่ยมสำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

Goswami และ Srivastava (2000) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ด้วยวิธีการหมักแบบกึ่งกะ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้แลคโตสเป็นซับสเตรต พีเอช 6.5 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเริ่มต้นของแลคโตสที่ใช้คือ 47.7 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 20.75 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราการผลิตได้ 0.23 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Martinez - Campos และ Torre (2002) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยในสภาพการหมักแบบกึ่งกะจากเชื้อ *P. acidipropionici* มีการเติมกลูโคสหรือแลคเตตหรือสารผสมระหว่างกลูโคสและแลคเตต กลูโคสและแลคเตตจะถูกใช้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การใช้กลูโคสและแลคเตตร่วมกันจะเพิ่มอัตราการผลิตโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) แล้วยังเป็นการเพิ่มส่วนของธาตุคาร์บอนสำหรับที่จะนำไปใช้ในการผลิตชีวมวล ผลผลิตของโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) เท่ากับ 7.6 เมื่อใช้แลคเตตและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์ อัตราส่วนโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) เท่ากับ 1.34 เมื่อใช้แลคเตตอย่างเดียว และมีอัตราส่วนโพรพิโอเนตต่ออะซิเตตเท่ากับ 1.85 เมื่อใช้กลูโคสอย่างเดียว

2.5 เวย์ (Whey)

เวย์เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็ง หรือการแยกเคซีนจากนมสด (ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ. 2526) มีลักษณะเป็นของเหลวใสมีสีค่อนข้างเขียวอมเหลือง (Marshall. 1982) องค์ประกอบของเวย์โดยทั่วไปพบว่า มีปริมาณน้ำตาลแลคโตสอยู่ในปริมาณมากกว่าสารอาหารอื่น (Westerguard. 1983) คือ ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตสร้อยละ 4 - 5 โปรตีนร้อยละ 1 และเกลือแร่ร้อยละ 1 (Roukas . 1998)

2.5.1 ประเภทของเวย์

Alfa-Laval (1987) แบ่งเวย์ออกได้เป็น 2 ประเภท ตามความเป็นกรด (Titable acidity) ได้แก่

1. สวีทเวย์ (Sweet whey) เป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งชนิดแข็ง เช่น เชดดา (Cheddar cheese) เกาดา (Gouda cheese) สวิส (Swiss cheese) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.10 – 0.20 และมีค่าพีเอชระหว่าง 5.8 – 6.1

2. แอซิดเวย์ (Acid whey) เป็นผลิตผลพลอยได้จากการตกตะกอนนม โดยการเติมกรดหรือเกลือแร่ลงไปโดยตรงในการผลิตเนยแข็งชนิดอ่อน เช่น คอทเทจ (Cottage) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.40 – 0.60 และมีค่าพีเอชระหว่าง 4.0 – 5.0 (Kosikowski. 1977)

องค์ประกอบที่แตกต่างของเวย์ทั้งสองชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2 ซึ่งพบว่าสวีทเวย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างขององค์ประกอบเช่นเดียวกับแอซิดเวย์ โดยแลคติกแอซิดเวย์ (lactic acid whey) จะได้จากการผลิตคอทเทจชีส ส่วนไฮโดรคลอริก (hydrochloric) หรือซัลฟิวริกแอซิดเวย์ (sulphuric acid whey) ได้จากการผลิตเคซีน

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบโดยประมาณของสวีทเวย์และแอซิดเวย์

องค์ประกอบ (ร้อยละ)	สวีทเวย์		แอซิดเวย์	
	เชดดา	เกาดา	แลคติกแอซิดเวย์ (คอจเทจชีส)	ไฮโดรคลอริก/ซัลฟิวริกแอซิดเวย์(เคซีน)
ปริมาณของแข็ง	6.00	5.50	6.00	6.30
น้ำ	94.00	94.50	94.00	93.70
ไขมัน	0.06	0.05	0.05	0.05
โปรตีน	0.80	0.68	0.80	0.80
เถ้า(เกลือแร่)	0.50	0.45	0.67	0.80
น้ำตาลแลคโตส	4.49	4.18	3.63	4.50
กรดแลคติก	0.15	0.14	0.85	0.15

ที่มา : Nielsen และ Ullum (1989)

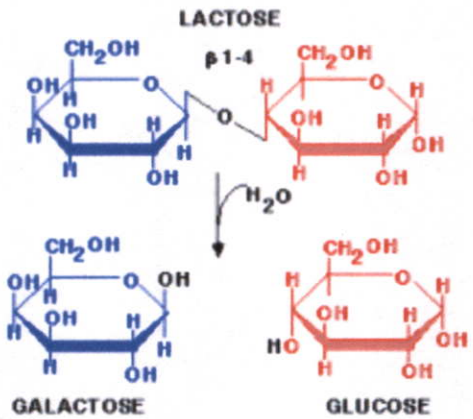
2.5.2 องค์ประกอบหลักทางเคมีของเวย์

1.น้ำตาลแลคโตส

น้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลที่พบในน้ำนมเท่านั้น ในน้ำนมวัวมีน้ำตาลแลคโตสอยู่ประมาณร้อยละ 4.7 ซึ่งต่ำกว่าในน้ำนมมนุษย์ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสอยู่ประมาณร้อยละ 6.3

น้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลชนิดรีดิวซิง (Reducing sugar) มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับน้ำตาลทราย คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ และเมื่อถูกไฮโดรไลส์แล้วจะได้น้ำตาล 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส ดังสมการต่อไปนี้

$$\underset{\text{แลคโตส}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + \underset{\text{น้ำ}}{H_2O} \xrightarrow{\text{เอนไซม์แลคเทส}} \underset{\text{กลูโคส}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{กาแลคโตส}}{C_6H_{12}O_6}$$



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างแสดงน้ำตาลแลคโตสที่ถูกไฮโดรไลส์

ที่มา : www.ratjes.nl/ lactose.html

2.โปรตีน

โปรตีนในเวย์เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนในน้ำนมซึ่งเป็นโปรตีนตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางอาหารและมีกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง ดังแสดงในตารางที่ 2.3 โปรตีนในเวย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ เบตาแลคโตโกลบูลิน (Beta – lactaglobulin) และแอลฟาแลคทอลบูมิน (Alpha – lactabumin) โดยเบตาแลคโตโกลบูลินจะมีอยู่ประมาณร้อยละ 50 – 60 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือเจือจาง สามารถตกตะกอนได้ด้วยเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) โปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในแง่การให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลว (วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2532) ส่วนแอลฟาแลคทอลบูมินมีอยู่ประมาณร้อยละ 15 - 20 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนได้เมื่อถูกความร้อน ส่วนที่เหลือคือ ซีรัมอัลบูมิน อิมมูโนโกลบูลิน เอนไซม์ต่างๆ และโปรตีนอื่นๆ (Webb และ Whitter. 1970) ความแตกต่างขององค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์แสดงไว้ในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.3 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
วาลีน	6.8	6.8	6.8

ที่มา : Renner (1983)

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในเวย์

ชนิดของโปรตีนในเวย์	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโปรตีน	ค่าพีเอช	น้ำหนักโมเลกุลดาลตัน $x10^3$
แอลฟาแลคโตโกลบูลิน	3.0	50	5.3 – 5.5	18.3
เบตาแลคทอลบูลิน	0.7	12	4.2 – 4.5	14
โปรติเอส เปปโตน	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
แลคโตเฟอร์ริน	0.05	0.8	9.0	81 -84
แลคโตเพอร์ออกซิเดส	0.03	0.5	9.6	89

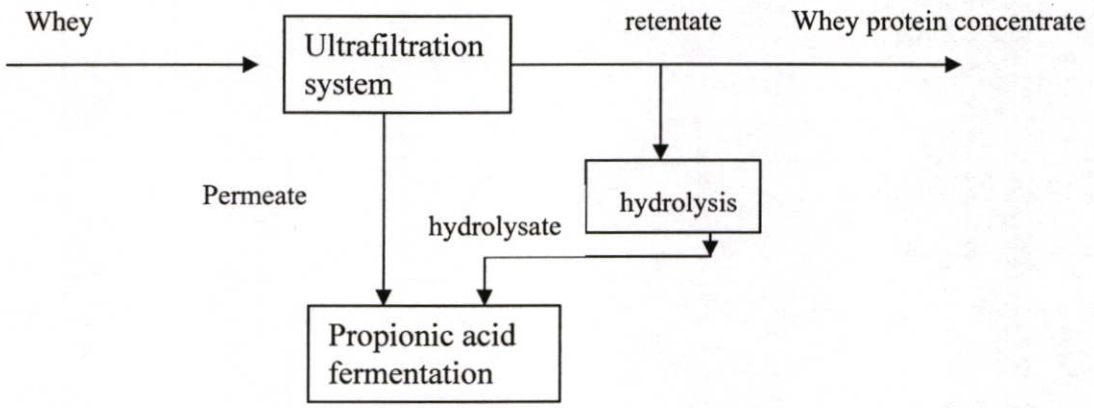
ที่มา : Marshall (1982)

2.6 การใช้ประโยชน์จากเวย์

เนื่องจากเวย์ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม นักวิจัยจึงได้ศึกษาหาทางนำเวย์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังมีรายงานการใช้ประโยชน์จากเวย์ดังนี้ (ชลัท ศานติวรางคณา. 2534)

2.6.1 Whey permeate

Whey permeate เป็นผลิตผลพลอยได้จากการนำเวย์มาผลิตเป็นโปรตีนเวย์เข้มข้น มีแลคโตสและไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้เป็นส่วนประกอบหลัก จึงมีความสนใจในการนำ Whey permeate มาใช้แทนแหล่งคาร์บอนอื่นที่มีราคาแพงในการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการทางชีวภาพ ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการผลิต Whey permeate

ที่มา : Fitzpatrick และ O'Keeffe (2001)

2.6.2 โปรตีนเวย์เข้มข้น

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่ละลายได้และโปรตีนที่ตกตะกอน มีวิธีการทำ คือ นำเวย์มาทำให้มีสภาพเป็นกลาง จากนั้นนำไประเหยจนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับร้อยละ 62 ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นแยกเพื่อเอาแลคโตสและเกลือแร่ออกมาให้เหลือแต่โปรตีนจากนั้นนำไปกรอง จะได้เป็นโปรตีนเวย์เข้มข้นสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 5 เดือน นำไปใช้ในการผลิตอาหารเด็ก ผลิตภัณฑ์ขนมอบและไอศครีม (ชลัท ศานติวรางคณา. 2534)

2.6.3 ผลึกแลคโตส

เวย์ที่สามารถนำมาผลิตเป็นผลึกแลคโตสได้นั้นสามารถใช้ได้ทั้งเวย์สดและเวย์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกแล้ว ผลึกแลคโตสสามารถนำมาผลิตเป็นลูกกวาด ใช้เป็นสารขัดฟันในยาสีฟัน ใช้เป็นสารป้องกันการจับตัวเป็นก้อน (ชลัท ศานติวรางคณา. 2534)

2.6.4 การผลิตเนยแข็งจากเวย์

นำเวย์มาระเหยภายใต้สภาพสูญญากาศจนมีความเข้มข้นร้อยละ 80 แล้วจึงลดอุณหภูมิก่อนที่จะบรรจุพิมพ์ ตัวอย่างเนยแข็งจากเวย์ ได้แก่ ไมซอสท์ (Mysost) จีทอสท์ (Gjetost) พูลทอสท์ (Putost) สุพรีม (Supriam) เป็นต้น (ชลัท ศานติวรางคณา. 2534)

2.6.5 การผลิตวิตามินบี 12 และไรโบฟลาวิน

ใช้เวย์เป็นสารอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. shermanii* สำหรับผลิตวิตามินบี 12 และใช้เป็นสารอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Clostridium acetobutyricus* ในการผลิตไรโบฟลาวิน (ชลัท ศานติวรางคณา., 2534)

โดยทั่วไปเวย์จะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง ถ้าเปรียบเทียบค่า BOD ระหว่างน้ำเสียที่ปล่อยลงแม่น้ำลำคลอง ควรบำบัดน้ำจนมีค่า BOD เหลือประมาณ 20 แต่เวย์มีค่า BOD อยู่ในช่วง 4,000 – 4,800 ซึ่งเป็นอันตรายที่ค่อนข้างสูง (Scott. 1986) ดังนั้นถ้าไม่ลดการทำงานและการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จะมีผลทำให้แลคโตสเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดแลคติกอย่างรวดเร็ว ทำให้ความเป็นกรดของเวย์สูงขึ้นและเกิดการเสื่อมเสียในที่สุด (ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ. 2526) ดังนั้นเพื่อคงรักษาคุณภาพของเวย์ (Alfa – Laval. 1987) ได้แนะนำวิธีเก็บรักษาไว้ 2 ทาง คือ ทางตรงและทางอ้อม

การเก็บรักษาทางตรงทำได้ 3 วิธีคือ การใช้ความเย็นที่อุณหภูมิ 0 – 5 องศาเซลเซียส วิธีนี้สามารถเก็บรักษาได้นาน 10 – 15 ชั่วโมง การใช้ความร้อนโดยวิธีพาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สามารถเก็บรักษาได้นานกว่า และวิธีสุดท้ายคือ การใช้สารเคมี ได้แก่ โซเดียมไบซัลเฟต หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การเก็บรักษาทางอ้อมสามารถทำได้โดยนำเวย์ผ่านกระบวนการอย่างใดอย่างหนึ่งที่เหมาะสม ได้แก่ การทำเป็นเวย์ผงหรือเวย์เข้มข้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาวิจัยที่นำเวย์มาใช้ประโยชน์อื่นๆ ดังนี้

Bogdanova (1974) ศึกษาการนำเวย์มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโดยการนำเวย์มาพาส เจอไรส์ที่อุณหภูมิ 95 – 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง เอาเฉพาะส่วนใสมาเติมหัวเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และเติมเชื้อยีสต์ลงไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 – 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง

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

Colomban และคณะ(1993) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจาก whey permeate ในการหมักจะมีการเติมน้ำและสารอาหารลงไปใน whey permeate หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อ มีการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการใช้วิธี Ultrafiltration เชื้อที่ใช้คือ *P. thoenii* (ATCC 4871) *P. jensenii* (ATCC 4870 4867 และ CNRZ 83 731) *P. freudenreichii* supsp.*freudenreichii* (NCIB 5959 และ CNRZ 89 725 726 728 729) *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (NICB 5964 CNRZ 433 722 724 และ SO 2908 2910 7916) *L. lactis* subsp. *Lactis* (CNRZ 164)

Yang และคณะ(1994) ได้ศึกษาการผลิตเกลือโพรพิโอเนตจาก whey permeate โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ร่วมกับเชื้อ *Streptococcus lactis* OSU 588 เพื่อผลิตเกลือโพรพิโอเนตจากเวย์ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เวย์ 2 ชนิด คือsweet whey และ de-lactose whey

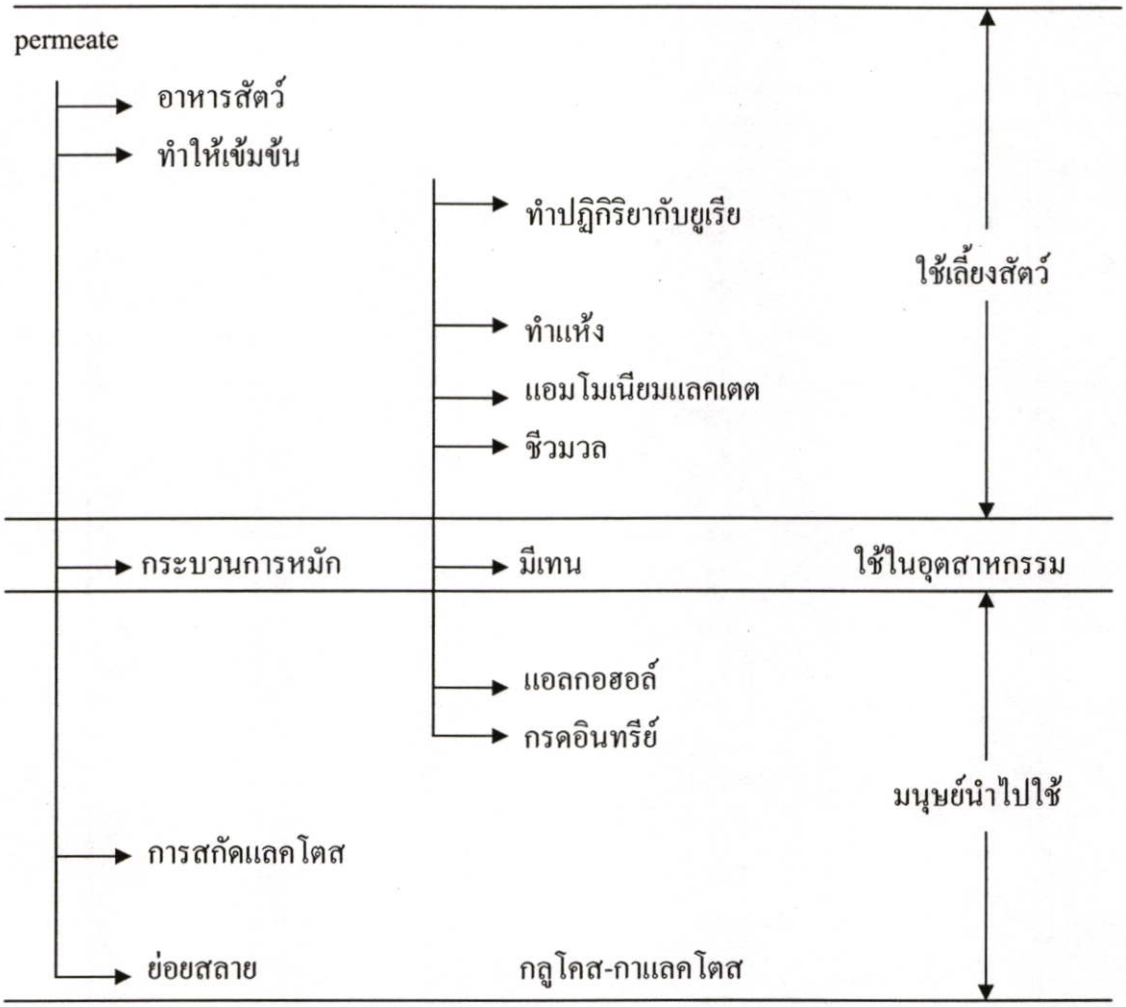
Yang และ Huang (1995) ได้ศึกษาการผลิตเกลือโพรพิโอเนตจากเวย์ด้วยการหมักแบบกะโดยการใช้เซลล์ที่ถูกตรึง เชื้อที่ใช้คือ *P. acidipropionici* (ATCC 4875) *L. lactis* (OSU 588) *Lactobacillus helveticus* (ATCC 15009)

แผนผังแสดงความเป็นไปได้ในการนำเวย์มาใช้ประโยชน์แสดงในรูปที่ 2.5

2.7 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

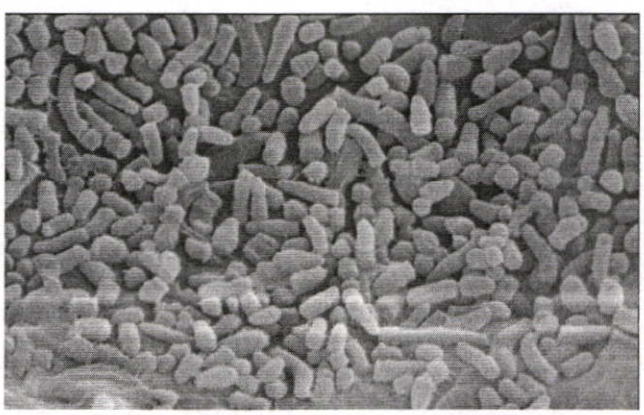
เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดโพรพิโอนิกอยู่ในสกุล *Propionibacterium* ซึ่งเรียกว่าเป็น propionic acid bacteria (Quesada-Chanto.1994) พบครั้งแรกโดยแยกได้จากสวิส ชีส ในกระบวนการหมักจะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะทำให้เกิดลักษณะที่เป็นรูพรุนในเนยแข็ง

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียพวกนี้คือ ลักษณะแกรมบวก เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีรูปร่างหลายแบบได้แก่ รูปร่างกลม ท่อนยาว ท่อนไม้กระบอง การเรียงตัวของเซลล์อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ มีการเจริญแบบแฟคคัลเททีฟแอนแอโรบ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส สามารถหมักได้กรดโพรพิโอนิก ซัคซินิก แอซีติกและคาร์บอนไดออกไซด์ มีความต้องการทางอาหารที่ซับซ้อน เจริญเติบโตช้า แหล่งที่พบแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมหรือกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นม มีอยู่ด้วยกัน 6 สายพันธุ์ คือ *P. freudenreichii* *P. jensenii* *P. theonii* *P. acidipropionici* *P. coccoides* และ *P. cyclohexanicum* ส่วนกลุ่มที่สองคือ กลุ่มที่เจริญอยู่บนผิวหนังของมนุษย์หรือกลุ่มที่ทำให้เกิดสิว กลุ่มนี้ไม่ค่อยมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม (Lewis และ Yang . 1992) ลักษณะของเชื้อ *P. acidipropionici* แสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.5 ความเป็นไปได้ที่จะนำเวย์มาใช้ประโยชน์

ที่มา : Pedersen และ Werner (1978)



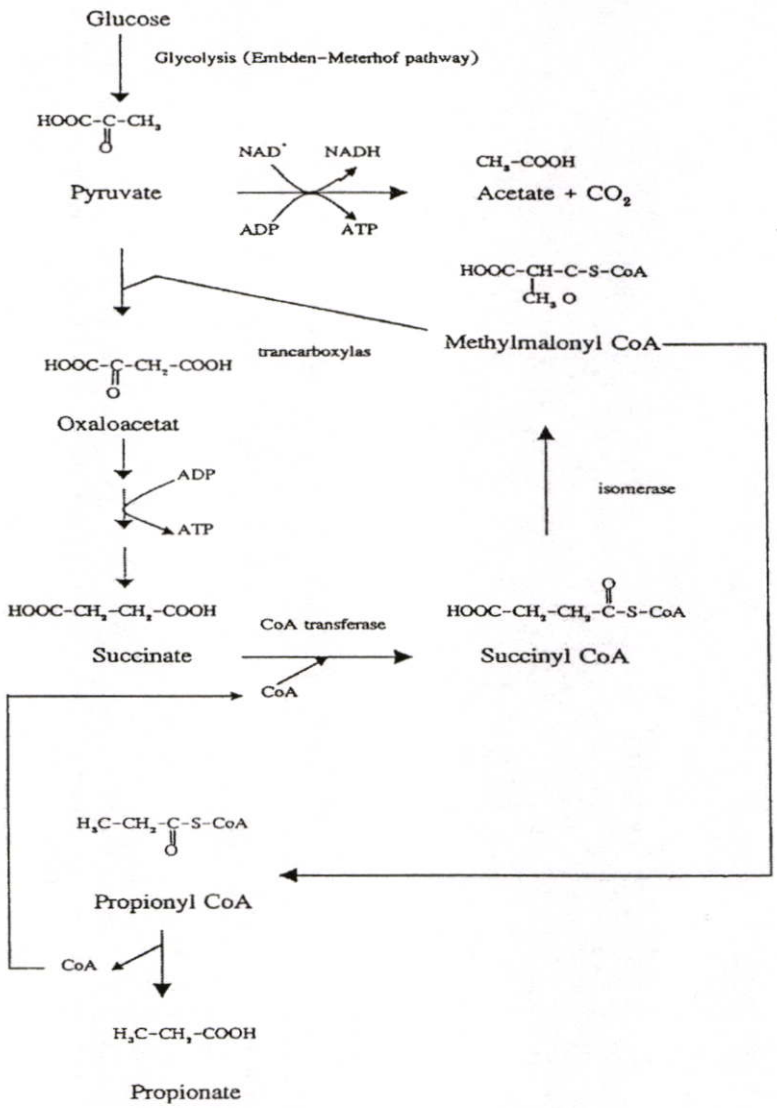
รูปที่ 2.6 เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici*

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

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.8 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก

การผลิตกรดโพรพิโอนิกสามารถเกิดขึ้นได้หลายวิถีด้วยกันโดยคาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ถูกใช้ไปในการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลผลิตโดยเชื้อ *Propionibacterium* โดยเริ่มจากสารตัวกลางที่สำคัญคือ ไพรูเวท ออกซาโรอะซิเตต(oxaloacetate) และซัคซิเนต ตามลำดับที่ได้มาจากกลูโคสหรือแลคเตต (Daniel. 1995) ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสโดยเชื้อ *Propionibacterium*

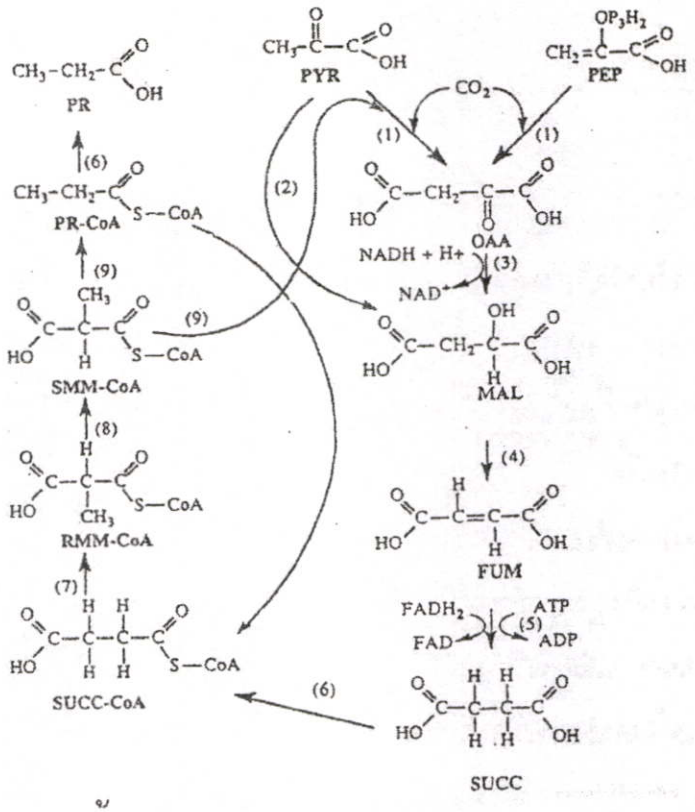
ที่มา : Daniel (1995)

74547

การสร้างซัคซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ได้แสดงในรูปที่ 2.8 การสร้างจะเริ่มต้นจากการสร้างออกซาโรอะซิเตตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้กับไพรูเวท (pyruvate)หรือให้กับฟอสโฟอีนอลไพรูเวท(PEP)จะถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอล-มาเลต(L-malate)โดยการทำงานของเอนไซม์มาริกดีไฮโดรจิเนส (malic dehydrogenase) กรดมาริก(malic acid) ที่ได้จะถูกดึงน้ำออกโดยเอนไซม์ฟูมาเรส(fumarase)ทำให้ได้กรดฟูมาริก(fumaric acid)ซึ่งปฏิกิริยานี้ ผันกลับได้ จากนั้นฟูมาเรตจะถูกเปลี่ยนให้เป็นซัคซิเนตโดยเอนไซม์ฟูมาเลตรีดักซ์เตส(fumarate reductase) ซัคซิเนตเป็นตัวกลางในกระบวนการ โดยซัคซิเนตจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โคเอทรานเฟอ-เรส (CoA tranferase) ได้ซัคซินิลโคเอ (succinyl CoA) ปฏิกิริยาต่อไปนี้ซัคซินิลโคเอจะเปลี่ยนไปเป็น อาร์-เมททิล มาโลนิลโคเอ (R-methyl malonyl CoA) โดยเอนไซม์ อาร์-เมททิล มาโลนิลมิวเตส (R-methyl malonylmutase) หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนอาร์-เมททิลมาโลนิลโคเอไปเป็นเอส-เมททิล มาโลนิลโคเอ (S-methyl malonyl CoA) คาร์บอนของเอส-เมททิลมาโลนิลโคเอ จะถูกย้ายออกไปรวมกับไพรูเวททำให้เกิดการสร้างออกซาโรอะซิเตต เมื่อคาร์บอนเคลื่อนย้ายออกไปจะทำให้ได้โพรพิโอนิล โคเอ (propionyl CoA) หลังจากนั้นโคเอ (CoA) จะถูกย้ายออกจากโมเลกุลเพื่อนำไปใช้กับซัคซินิกตัวต่อไปและทำให้ได้กรดโพรพิโอนิก

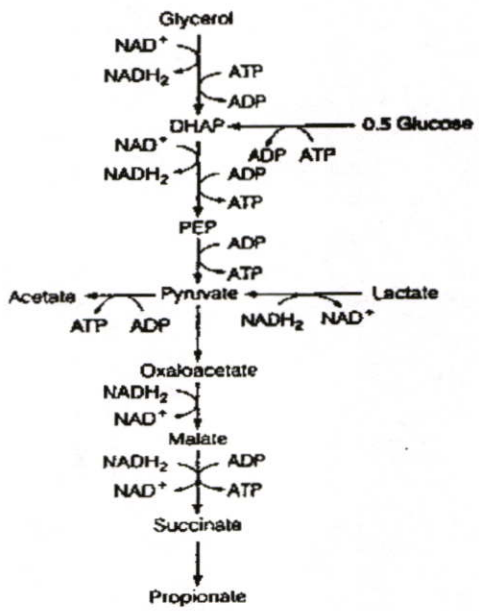
Barbirato และคณะ(1997) ได้ศึกษาการหมักกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลซึ่งพบว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงจากกลีเซอรอลไปเป็นกรดโพรพิโอนิกเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) โดย 2 โมล ของATP จะถูกใช้ไปเพื่อสังเคราะห์ 1 โมล ของกรดโพรพิโอนิก ดังแสดงในรูปที่ 2.9

วิถีอะครีเลต (acrylate) ของการสร้างโพรพิโอเนต รายละเอียดของวิถีนี้แสดงในรูปที่ 2.10 กรดโพรพิโอนิกจะถูกสร้างขึ้นตามลำดับ โดยเริ่มต้นจากการเปลี่ยนรูปของแอล-แลคเตต(L-lactate) ไปเป็นแอล-แลคติล โคเอ (L-lactryl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์โคเอ ทรานเฟอเรส (CoA transferase) แอล-แลคติล โคเอจะเปลี่ยนรูปกลายไปเป็นอะซิลิล โคเอ (Acrylyl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีไฮดราเทส อะซิลิลโคเอ (Dehrydratase acrylyl CoA)จะเปลี่ยนไปเป็นโพรพิโอนิล โคเอ โดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของฟราโวโปรตีน (flavor protein) โพรพิโอนิลโคเอจะย้ายโมเลกุลโคเอไปสู่ แอล-แลคเตตเพื่อสร้างแอล-แลคติล โคเอและเกิดเป็นกรดโพรพิโอนิกอิสระ การสร้างอะซิเตต (acetate) และคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดควบคู่กับการสร้างโพรพิโอเนต



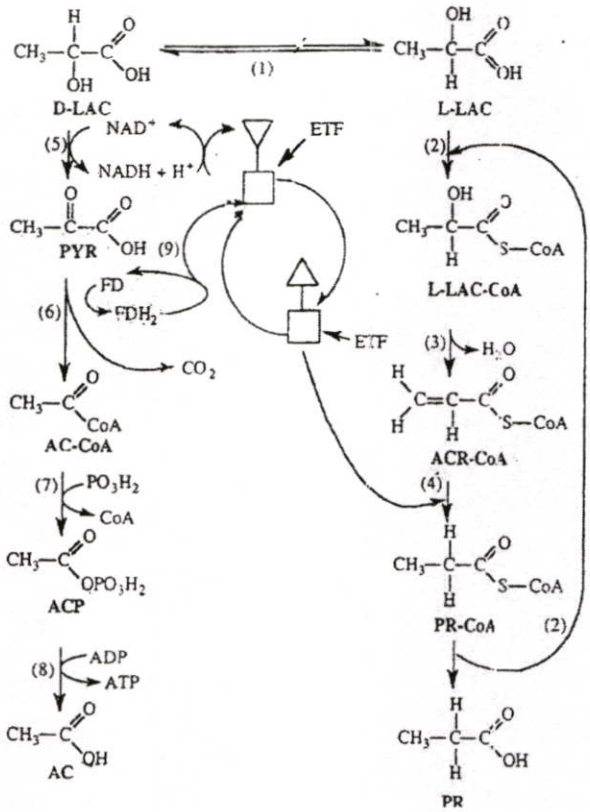
รูปที่ 2.8 การสร้างซัคซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

ที่มา : Daniel (1995)



รูปที่ 2.9 กระบวนการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็นกรดโพรพิโอนิก

ที่มา : Barbirato และคณะ (1997)



รูปที่ 2.10 วิถีอะครีเลตของการสร้างโพรพิโอเนต

ที่มา : Daniel (1995)

มีรายงานการศึกษาวิถีในการเกิดกรดโพรพิโอนิก ดังนี้

Virtanen (1923) ทำการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวทโดย Embden-Mayerhof pathway จากนั้นไพรูเวทจะเกิดปฏิกิริยาแยกได้ 2 ทาง คือทางที่หนึ่งจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นกรดแอซีติก และคาร์บอนไดออกไซด์ ทางที่สองจะถูกรีดิวส์ไปเป็นกรดโพรพิโอนิก

Van Niel (1928) ทำการศึกษาข้อแตกต่างของแบคทีเรียโพรพิโอนิกแต่ละสายพันธุ์ พบว่าการเปลี่ยนกลูโคส แลคเตต หรือไพรูเวทไปเป็นกรดโพรพิโอนิกนั้นจะมีอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติกอยู่ระหว่าง 1.6 – 1.8 ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์

Wood และ Werkman (1940) ทำการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถเปลี่ยนกรดซัคซินิกไปเป็นกรดโพรพิโอนิก และคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณโมลเท่ากับโมลของซัคซินิกที่ใช้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ และได้กรดแอซีติกปริมาณเล็กน้อย และไม่พบผลผลิตอื่น

2.9 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ

ปัจจัยหลักของการผลิตกรดโพรพิโอนิกขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ(ตารางที่ 2.5)

ตารางที่2.5 แสดงการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ

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

ที่มา : Colomban และคณะ (1993)

2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

2.10.1 แหล่งคาร์บอน

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

แบคทีเรีย *P. acidipropionici* สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติก ดังสมการ

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

(กลูโคส) (กรดโพรพิโอนิก) (กรดแอซีติก)

และยังสามารถเปลี่ยนกรดแลคติกไปเป็นกรดโพรพิโอนิกและกรดแอซีติกดังสมการ

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

(กรดแลคติก) (กรดโพรพิโอนิก) (กรดแอซีติก)

(Tyree และคณะ. 1991)

Lewis และ Yang (1992) ศึกษาผลของซับสเตรตที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ที่ถูกตรึง ซับสเตรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนประกอบด้วย แลคโตส กลูโคส และแลคเตต ในการหมักเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นที่เท่ากัน พบว่าแลคเตตจะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าแหล่งคาร์บอนอื่นๆ

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเซลล์ตรึงของเชื้อ *P. acidipropionici* โดยการหมักแบบกึ่งกะ ทำการหมักเป็นเวลา 250 ชั่วโมงควบคุมพีเอชด้วย 2 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าเมื่อใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 45.6 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้อาหารสังเคราะห์จะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 57 กรัมต่อลิตร

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

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

Barbirato และคณะ (1997) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับกลูโคสและกรดแลคติก โดยใช้เชื้อ 3 สายพันธุ์ คือ *P. acidipropionici* *P. acnes* และ *C. propionicium* ทำการหมักแบบกะ ใช้กลีเซอรอลเป็นซับสเตรตเริ่มต้นปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชที่ 6.8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็น

ซับสเตรตจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 0.844 โมลต่อโมล ในชั่วโมงที่ 73 เมื่อใช้กลูโคสเป็นซับสเตรตจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 1.445 มิลลิโมลต่อ100มิลลิโมล ในชั่วโมงที่ 69 และเมื่อใช้กรดแลคติกเป็นซับสเตรตจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 0.745 โมลต่อโมล ในชั่วโมงที่ 72 นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นจะส่งผลให้อัตราการผลิตกรดสูงขึ้น (0.36 กรัมต่อลิตรชั่วโมง) และได้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกคือ 42 กรัมต่อลิตร

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

2.10.2 แหล่งไนโตรเจน

สมใจ ภัสสัตยางกูล (2537) ทดลองศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของ *Propionibacterium* sp. Arl AKU 1251 พบว่ายีสต์สกัดมีผลต่อการเจริญของเชื้อมากโดยใน complete medium ที่ขาดยีสต์สกัด เชื้อจะเจริญได้น้อยในขณะที่ขาด pancreatic digest of casein หรือ acid hydrolysate of casein เชื้อยังคงมีอัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกับ complete medium

Prescott และ Dunn (1959) พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่ออัตราการหมักและอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติก *P. shermanii* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด ยีสต์สกัด เนื้อสัตว์ แต่ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

Colomban และคณะ (1993) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้แหล่งไนโตรเจนดังนี้ ยีสต์สกัด ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด โปรตีนเวย์เข้มข้น พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดผลิตกรดโพรพิโอนิกจะได้ปริมาณสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ

Yang และคณะ (1994) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในเวย์ โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ คือยีสต์สกัด และทริปทิเคสซอยบรอท พบว่าจะได้ปริมาณกรดสูงสุดเมื่อใช้ ยีสต์สกัดและทริปทิเคสซอยบรอทเติมลงไปในเวย์ปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Yang และ Huang (1995) ศึกษาการหมักแบบกะของ *P. acidipropionici* พบว่าเมื่อเพิ่มยีสต์สกัดร้อยละ 1 ลงในอาหารจะได้อัตราการผลิต 0.68 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ซึ่งมากกว่าอาหารที่ไม่เติมยีสต์สกัด

2.10.3 แหล่งเกลือแร่

Gebgardt และคณะ (1970) ศึกษาพบว่าโคบอลท์มีอิทธิพลต่อการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโคบอลท์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเชื้อ *P. shermanii* ร้อยละ 55 – 60 ของน้ำหนักแห้งแต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโคบอลท์การเจริญของเชื้อจะลดลง

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

2.10.4 แหล่งวิตามิน

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

2.10.5 พีเอชของอาหาร

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

Lewis และ Yang (1992) ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าเมื่อใช้แลคเตตเป็นสารที่ใช้ในการหมักซึ่งมีพีเอชเริ่มต้น 6.6 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับพีเอชเริ่มต้น 6.0 และ 5.5

Colomban และคณะ (1993) ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยทำการศึกษาที่พีเอช 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 เชื้อที่ใช้ศึกษาคือ *P. acidipropionici*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ที่ทำการหมักโดยใช้พีเอชเริ่มต้น 6.5 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

Quesada-Chanto และคณะ(1994) ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด

2.10.6 อุณหภูมิ

โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Propionibacterium* sp. อยู่ระหว่าง 30–35 องศาเซลเซียส (Cavin และคณะ. 1985) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *P. jensenii* คือ 30 องศาเซลเซียส (Colomban และคณะ. 1993) การผลิตกรดโพรพินิกจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิไปถึง 37 องศาเซลเซียส แต่อัตราส่วนระหว่างกรดโพรพิโอนิกต่อกรดแอซีติกจะลดลง (Champagne และคณะ. 1989)

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

Quesada-Chanto และคณะ(1994) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุดและที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตวิตามินบี12

Yang และคณะ (1994) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 โดยใช้อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

2.10.7 การให้อากาศ

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

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

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุดในสภาวะไม่มีอากาศเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตกรดแอซีติก และการผลิตวิตามินบี 12 จะเพิ่มมากขึ้น

2.11 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสม

นอกจากจะมีการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* เพียงเชื้อเดียวแล้ว ยังมีการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้ออื่นผสมด้วย ดังมีรายงานดังนี้

Dennis และคณะ(1990) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus bulgaricus* ร่วมกับ *P. acidipropionici* และ *P. shermanii* ในเวย์ ทำการหมักเป็นเวลา 140 ชั่วโมง พบว่าในการใช้เชื้อผสมระหว่าง *L. bulgaricus* ร่วมกับ *P. acidipropionici* ไม่สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ แต่ในการหมักโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *L. bulgaricus* ร่วมกับ *P. shermanii* สามารถเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นได้ และระยะเวลาที่ใช้ในการหมักลดลงจาก 175 ชั่วโมง เป็น 70 ชั่วโมง

Colomban และคณะ (1993) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* เจริญได้เร็วกว่าเชื้อ *P. acidipropionici* นอกจากนั้นยังทำการศึกษาสารที่ใช้เพื่อปรับสภาพให้เป็นกลางโดยศึกษาสาร 4 ชนิด คือ NaOH, KOH, $CaCO_3$ และ NH_3 พบว่า $CaCO_3$ มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารชนิดอื่น

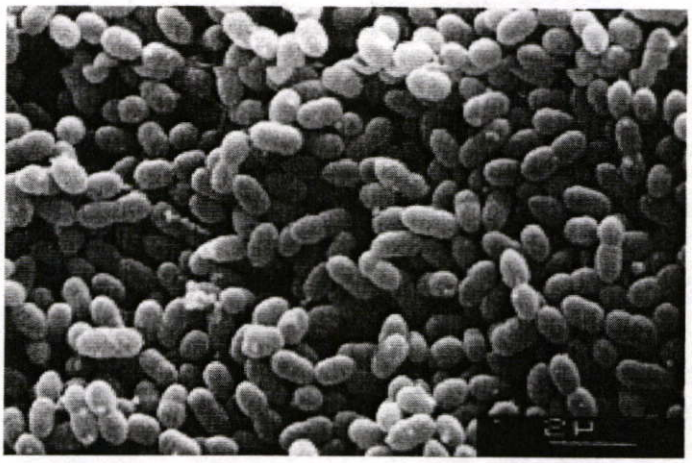
Yang และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์ด้วยการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4875 ร่วมกับเชื้อ *S. lactis* OSU 588 ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 พบว่าในการหมักกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมได้ผลผลิตเหมือนกับการหมักโดยใช้เชื้อเดี่ยว คือกรดโพรพิโอนิก และกรดแอซีติก แต่ในการหมักโดยใช้เชื้อผสมทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักน้อยลง

Yang และ Huang (1995) ศึกษาการผลิตโพรพิโอเนตจากเวย์โดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4875 ร่วมกับ *L. lactis* ทำการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เชื้อ *L. lactis* สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสในเวย์เปลี่ยนไปเป็นแลคเตตเพื่อให้เชื้อ *P. acidipropionici* ใช้แลคเตตเป็นซับสเตรตในการผลิตโพรพิโอเนต จากการศึกษาพบว่าในการเปลี่ยนแลคเตตไปเป็นโพรพิโอเนตจะช้ากว่าการเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสไปเป็นแลคเตต และในการหมักจะได้ผลผลิตคล้ายกับการหมักโดยใช้เชื้อเดี่ยวของ *Propionibacterium* คือ โพรพิโอเนต อะซิเตต และซัคซิเนต นอกจากนั้นยังพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการหมักและอัตราการผลิตโพรพิเนตเมื่อใช้เชื้อผสมจะเร็วกว่าการหมักโดยใช้เชื้อเดี่ยว

2.12 เชื้อจุลินทรีย์ *Lactococcus lactis*

เชื้อ *L. lactis* เป็นแบคทีเรียกลุ่มแลคติกแอสิดแบคทีเรียมีลักษณะคือ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ไม่ได้ ย้อมติดสีแกรมบวก ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ มีรูปร่างกลม เซลล์อยู่กันเป็นคู่ๆ หรือต่อกันเป็นสายสั้นๆ มีความยาว 0.5 – 1.5 ไมโครเมตร ใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์ ไวน์ ไส้กรอก และอาหารหมัก ลักษณะของเชื้อ *L. lactis* ดังแสดงในรูปที่ 2.11

แลคติกแอสิดแบคทีเรียมีความสามารถในการสลายน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติก ดังแสดงในรูปที่ 2.12 ถ้าเป็นพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟจะสลายน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกเกือบทั้งหมด มีกรดแอซีติก คาร์บอนด์ออกไซด์บ้างเล็กน้อย แต่ถ้าเป็นพวกเฮตเทอโรเฟอร์เมนเททีฟจะสลายน้ำตาลแล้วให้สารระเหยได้รวมทั้งแอลกอฮอล์ในปริมาณมากพอๆกับกรดแลคติก



รูปที่ 2.11 เชื้อ *Lactococcus lactis*

ที่มา :www. molgen.biol.rug.nl/.../images/llactis.jpg

2.13 การทำให้เป็นกลาง

กระบวนการหมักทางชีวภาพที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตกรดต่างๆนั้นยังมีปัญหา เมื่อกรดที่เชื้อผลิตมานั้นมีความเข้มข้นสูงจนเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโต (product inhibition) จึงได้มีการศึกษาการใช้สารเพื่อปรับสภาพให้เป็นกลางให้สภาวะที่ทำการหมักมีสภาพเป็นกลางเพื่อให้เชื้อสามารถเจริญ และผลิตกรดได้มากขึ้น สารตัวกลางหนึ่งที่ใช้ในกระบวนการหมัก คือ แคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งได้มีผู้ทำการศึกษาการผลิตกรดโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารปรับสภาพให้เป็นกลาง ดังนี้

Kurosawa และคณะ (1988) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อผสมระหว่าง *A. awamori* ร่วมกับ *S. lactis* ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสูตรอาหารที่ทำการหมักเติม $CaCO_3$ ปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเป็น 5 ทำการกวนด้วยอัตรา 150 – 190 รอบต่อนาที ได้ผลผลิตกรดสูง 50 กรัมต่อลิตร

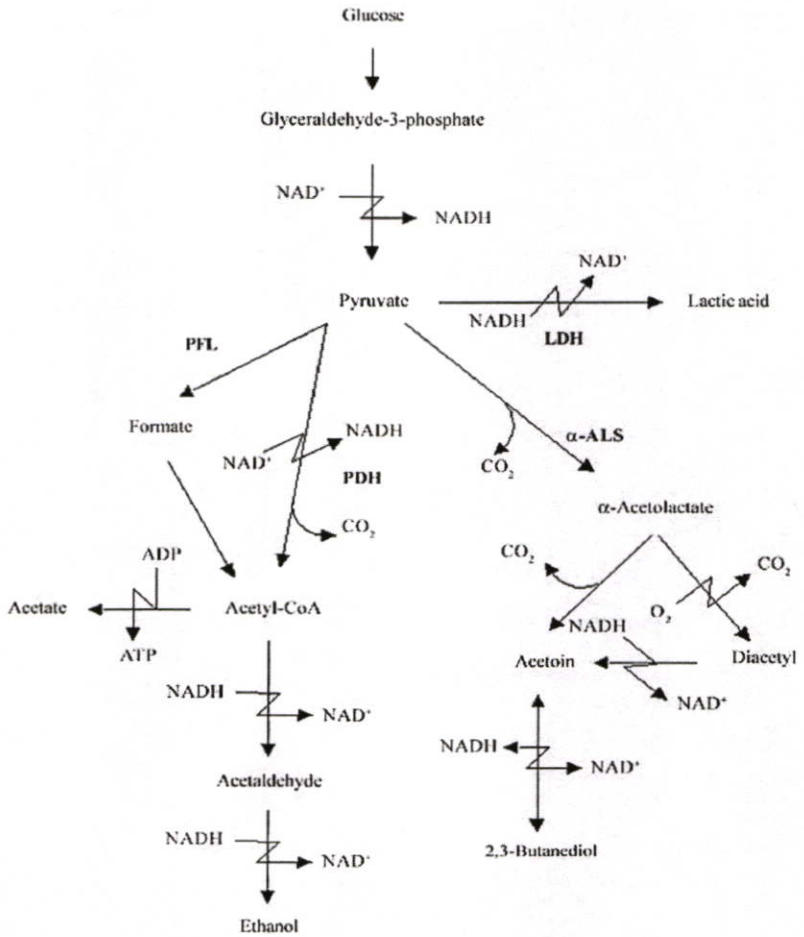
Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* เติมกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในเวย์ ทำการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง สูตรอาหารมีการเติม $CaCO_3$ ในปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้กลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัดปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. delbrueckii* ทำการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่าง cane sugar ร้อยละ 10 กับยีสต์สกัดร้อยละ 1 เติม $CaCO_3$ร้อย

ละ 5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส พีเอช 7 กวนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าทำการหมักด้วย cane sugar ได้ผลผลิตกรดสูงสุด

Michelson และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตการแลคติกโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* SIM-7DSM 14043 เปรียบเทียบกับเชื้อ *L. delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073 อาหารที่ใช้ทำการหมักโดยเชื้อ *L. delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073 เติม $CaCO_3$ ปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเป็น 6 พบว่า *L. delbrueckii* ผลิตกรดแลคติกได้ 52 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 และเชื้อ *B. coagulans* ผลิตกรดแลคติกได้ 56 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 10

Altaf และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV6 ทำการหมักในอาหารแข็ง ใช้แหล่งไนโตรเจนราคาถูกแทนเปปโตนและยีสต์สกัด ในอาหารที่ใช้ในการหมักเติม $CaCO_3$ เพื่อเปลี่ยนกรดแลคติก เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สภาวะที่ใช้ในการหมักคือพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน พบว่าผลิตกรดแลคติกได้ร้อยละ 96 (กรัมกรดแลคติกที่ผลิตได้ต่อกรัมซับสเตรตที่ใช้ไป)



รูปที่ 2.12 การย่อยสลายน้ำตาลของเชื้อ *Lactococcus lactis*

ที่มา : www.funpecrp.com.br/.../images/gmr0075fig1.jpg

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่องHigh Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท SHIMADZU รุ่น C-R7 Ae plus

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

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

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของบริษัท Phytotron climate simulator

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Phytotron climate simulator

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องอบลมร้อน ของบริษัท Binder

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่นLIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

โถดูดความชื้น

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

เข็มเขี่ยเชื้อ (niddle)

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX^{R}

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^{R}

กระบอกตวง (cylinder)ของบริษัท PYREX^{R}

บีกเกอร์ (beaker)ของบริษัท PYREX^{R}

ปิเปตต์ (pipette)

คิวเวต (แก้ว)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ยีสต์สกัด (yeast extract)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . 4 H_2O$)

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กับเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) การหาน้ำตาลแลคโตส ดูในภาคผนวก

3.2 วัตถุดิบ

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

3.2.1 การเก็บวัตถุดิบ

เวย์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยจะเก็บที่อุณหภูมิ-70 องศาเซลเซียส

3.2.2 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

ก่อนใช้นำออกมาทำละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการแยกโปรตีนออกจากเวย์ ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที(ดัดแปลงจาก Kessler.1981) แยกไขมันโดยกรองด้วยกระดาษกรองGlass fiber (GC-50)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 และ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้วแทง(stap) ลงในอาหารแข็งMRS (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ *L. lactis* TISTR 1401 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อลาก(streak)บนผิวอาหารแข็ง NA (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

เชื้อจุลินทรีย์ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง (stationary flask) เป็นเวลา 4 วัน เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) จะได้หัวเชื้อเริ่มต้นที่นำไปใช้ในการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ *L. lactis* TISTR 1401 ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 2 วัน เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) จะได้หัวเชื้อเริ่มต้นที่นำไปใช้ในการวิจัย

3.4 สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย (สุรนารถ อร่ามเรือง.2550)

สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัยมีดังนี้

ยีสต์สกัด	10	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.20	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	10	กรัมต่อลิตร
ใช้เวย์เป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น	1	ลิตร

3.5 ศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ทำการแบ่งการทดลองออกเป็น 8 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 : เติมปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณร้อยละ 5

ชุดที่ 2 : เติมปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณร้อยละ 10

ชุดที่ 3 : เติมปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณร้อยละ 5

ชุดที่ 4 : เติมปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณร้อยละ 10

ชุดที่ 5 : เติมปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณร้อยละ 5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณร้อยละ 5

ชุดที่ 6 : เติมปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณร้อยละ 10 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณร้อยละ 10

ชุดที่ 7 : เติมปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณร้อยละ 5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณร้อยละ 10

ชุดที่ 8 : เติมปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณร้อยละ 10 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณร้อยละ 5

เตรียมอาหารในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 1.4 ลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) ปิดจุกด้วยจุกยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อตามชุดการทดลองทั้ง 8 ชุด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 210 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อผสมโดยวิเคราะห์หาปริมาณของเซลล์ทั้งหมดด้วยวิธี Total plate count (A.O.A.C. 2000) วิเคราะห์หาปริมาณกรดโพรพิโอนิกและกรดแลคติกโดย HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข)

3.6 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ผสมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

เลือกปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากข้อ 3.5 มาทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 : เติมหัวเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 ของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 กับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ไปพร้อมกันเมื่อเริ่มทำการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0)

ชุดที่ 2 : เติมหัวเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 ของเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 เมื่อเริ่มทำการทดลอง หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในช่วงกึ่งกลางที่เชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงสุด (ชั่วโมงที่ 12)

ชุดที่ 3 : เติมหัวเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 ของเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 เมื่อเริ่มทำการทดลอง หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในช่วงที่เชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงสุด (ชั่วโมงที่ 24)

ชุดที่ 4 : เติมหัวเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 ของเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 เมื่อเริ่มทำการทดลอง หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในช่วงที่เชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงสุดและเชื้อ *L. lactis* อยู่ในระยะstationary phase (ชั่วโมงที่ 48)

เตรียมอาหารในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 1.4 ลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) ปิดจุกด้วยจุกยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อตามชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักในสภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 210 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อผสมโดยวิเคราะห์หาปริมาณของเซลล์ทั้งหมดด้วยวิธี Total plate count (A.O.A.C. 2000) วิเคราะห์หาปริมาณกรดโพรพิโอนิกและกรดแลคติกโดยHPLC(ภาคผนวก ข)และปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีของDobois.1956(ภาคผนวก ข)

3.7 ศึกษาอัตราการกวนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เลือกระยะเวลาในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่เหมาะสมจากข้อ 3.6 มาศึกษาอัตราการกวนในถังหมักขนาด 2 ลิตรโดยผันแปรอัตราการกวนที่ความเร็ว 0 , 50 , 100 , 150 และ 200 รอบต่อนาที โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 5 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 : ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 จากข้อ 3.6 ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อัตราการกวน 0 รอบต่อนาที

ชุดที่ 2 : ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 จากข้อ 3.6 ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที

ชุดที่ 3 : ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 จากข้อ 3.6 ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที

ชุดที่ 4 : ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 จากข้อ 3.6 ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

ชุดที่ 5 : ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 จากข้อ 3.6 ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

ทำการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้การหมักในถังหมักสภาพการหมักแบบกะ ถังหมักที่ใช้ขนาด 2 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.4 ลิตร (ร้อยละ70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อตามชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอช ที่6.5 ไม่ต้องพ่นอากาศ (Quesada-Chantao. 1994 ;Paik และ Glatz.1994) เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะคงที่ ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อผสมโดยวิเคราะห์หาปริมาณของเซลล์ทั้งหมดด้วยวิธี Total plate count (A.O.A.C.2000) วิเคราะห์หาปริมาณกรดโพรพิโอนิกและกรดแลคติกโดย HPLC(ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีของ Dobois .1956 (ภาคผนวก ข)

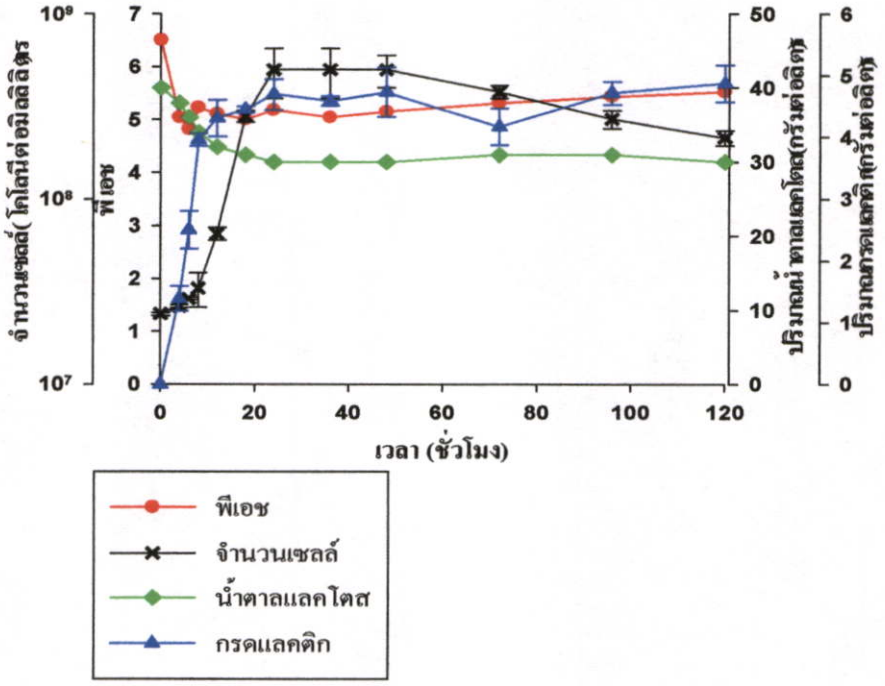
3.8 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

การศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 พบว่าในการทดลองชุดที่ 1 ซึ่งทำการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ5 ทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด 4.87 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาลแลคโตส 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ25 มีพีเอชต่ำสุด4.8 ในชั่วโมงที่6 จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *L. lactis* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 พบว่าจำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นจำนวนเซลล์จะคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่48 และในชั่วโมงที่72 จำนวนเซลล์เริ่มลดลงไปจนถึงชั่วโมงที่120 ดังแสดงในรูปที่ 4.1

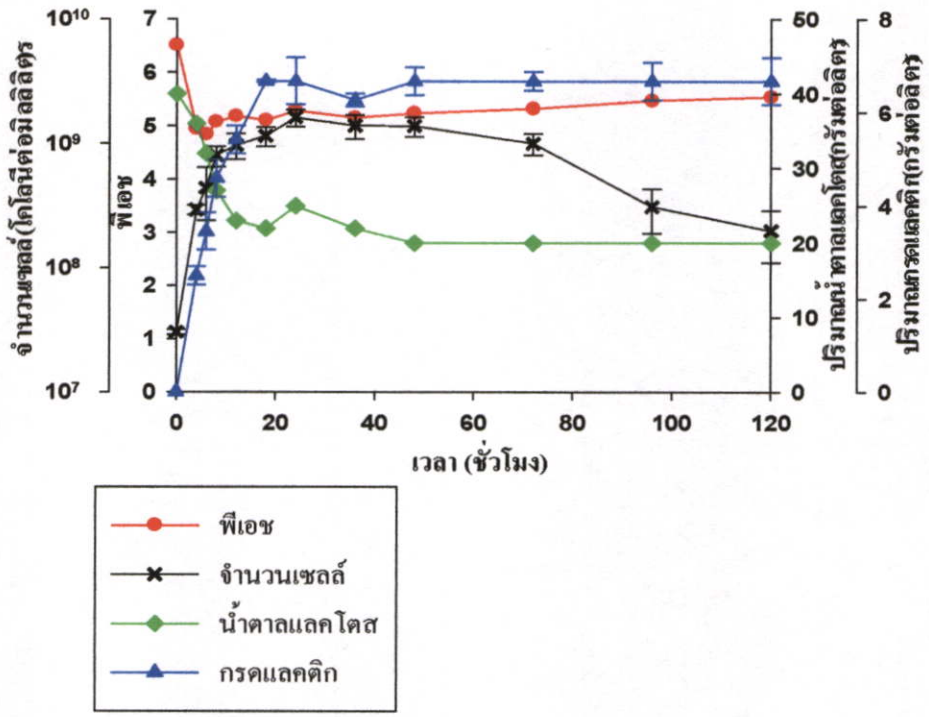


รูปที่ 4.1 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และกรดแลคติกที่ทำการหมักโดยเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5

จากการศึกษาพบว่าการเจริญของเซลล์มีความสัมพันธ์กับการผลิตกรดแลคติก ซึ่งเซลล์เริ่มต้นมีจำนวนเท่ากับ 1.70 x 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และเพิ่มจำนวนเป็น 4.60 x 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่24 โดยเมื่อเชื้อมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นปริมาณกรดแลคติกก็จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเชื้อ *L. lactis* และสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลแลคโตสเริ่มลดลงในช่วงที่เชื้อ *L. lactis* เพิ่มจำนวนเซลล์จนกระทั่งจำนวนเซลล์เริ่มคงที่ปริมาณน้ำตาลแลคโตสก็จะคงที่ตามไปด้วย

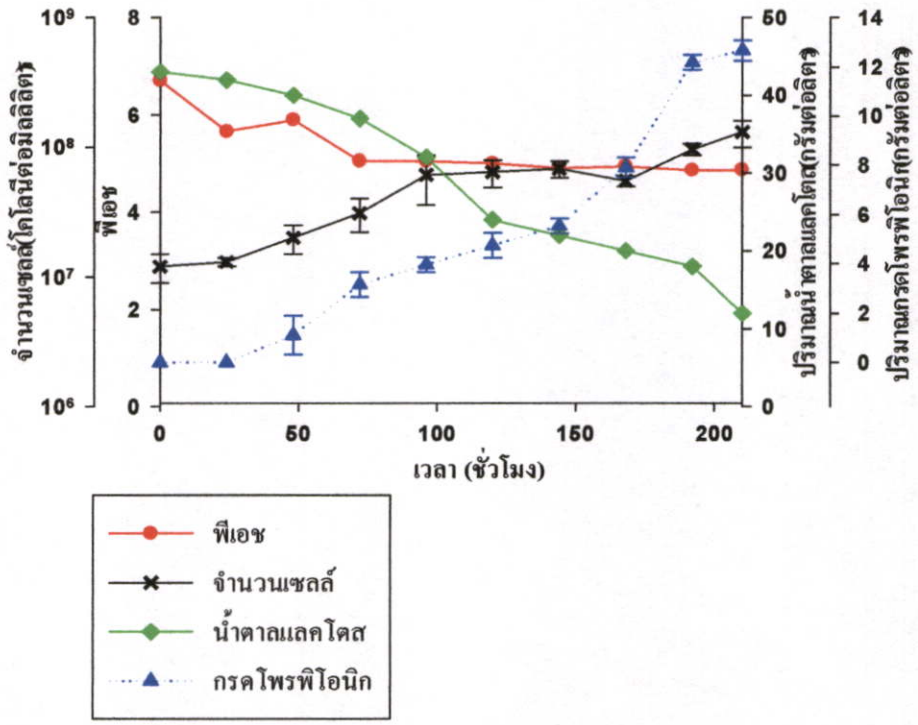
การทดลองชุดที่ 2 ทำการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ10 ทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ได้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด 6.67 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาลแลคโตส 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ50 มีพีเอชเริ่มต้น6.5 และมีพีเอชต่ำสุดเท่ากับ4.8 ในชั่วโมงที่6 จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *L. lactis* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10 พบว่าจำนวนเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่0 จนถึงชั่วโมงที่24 หลังจากนั้นจำนวนเซลล์จะคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่48 และในชั่วโมงที่72 จำนวนเซลล์เริ่มลดลงไปจนถึงชั่วโมงที่120 เหมือนกับการเจริญของเชื้อ *L. lactis* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ในการทดลองชุดที่ 1 แต่หัวเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ10 จะมีจำนวนเซลล์มากกว่าเชื้อ *L. lactis* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 โดยจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 3.00 x 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 1.62 x 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่24 ดังแสดงในรูปที่ 4.2

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. lactis* ในปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 กับร้อยละ10 พบว่าเมื่อใช้หัวเชื้อ *L. lactis* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10 นั้นได้ปริมาณกรดแลคติกสูงกว่าการใช้หัวเชื้อในปริมาณร้อยละ5 สำหรับการเจริญของเชื้อ *L. lactis* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10 นั้นจะมีจำนวนเซลล์มากกว่า และใช้น้ำตาลในปริมาณที่มากกว่าเชื้อ *L. lactis* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ด้วย จากผลการทดลองเมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อของเชื้อ *L. lactis* นั้นสามารถช่วยเพิ่มปริมาณกรดแลคติก และจำนวนเซลล์ให้สูงขึ้นได้ ซึ่งเชื้อจะสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสเพื่อใช้ในการผลิตกรดแลคติกได้ดี



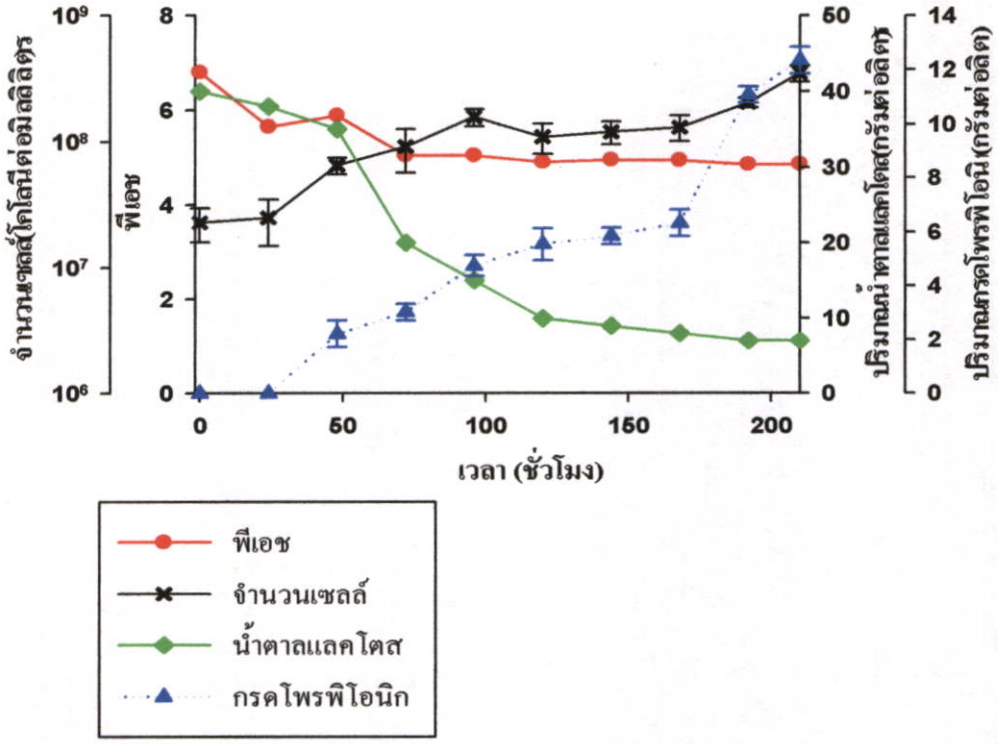
รูปที่ 4.2 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และกรดแลคติกที่ทำการหมักโดยเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10

การทดลองชุดที่ 3 ทำการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ5 ทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 12.66 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาล 12 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ70 มีพีเอชต่ำสุด4.8 ในชั่วโมงที่210 จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 พบว่าจำนวนเซลล์ของเชื้อ *P. acidipropionici* จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่0 ไปจนถึงชั่วโมงที่210 โดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 1.20×10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 1.30×10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่4.3 และสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ลดลงไปเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 4.3 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5

การทดลองชุดที่ 4 ทำการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ10 ทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 12.34 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาล 7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ82.5 มีพีเอชต่ำสุด4.8 ในชั่วโมงที่ 210 จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10 พบว่าจำนวนเซลล์ของเชื้อ *P. acidipropionici* จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่0 ไปจนถึงชั่วโมงที่210 เหมือนกับการเจริญของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ในการทดลองชุดที่ 3 แต่หัวเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ10 จะมีจำนวนเซลล์มากกว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 2.80×10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 3.50×10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10

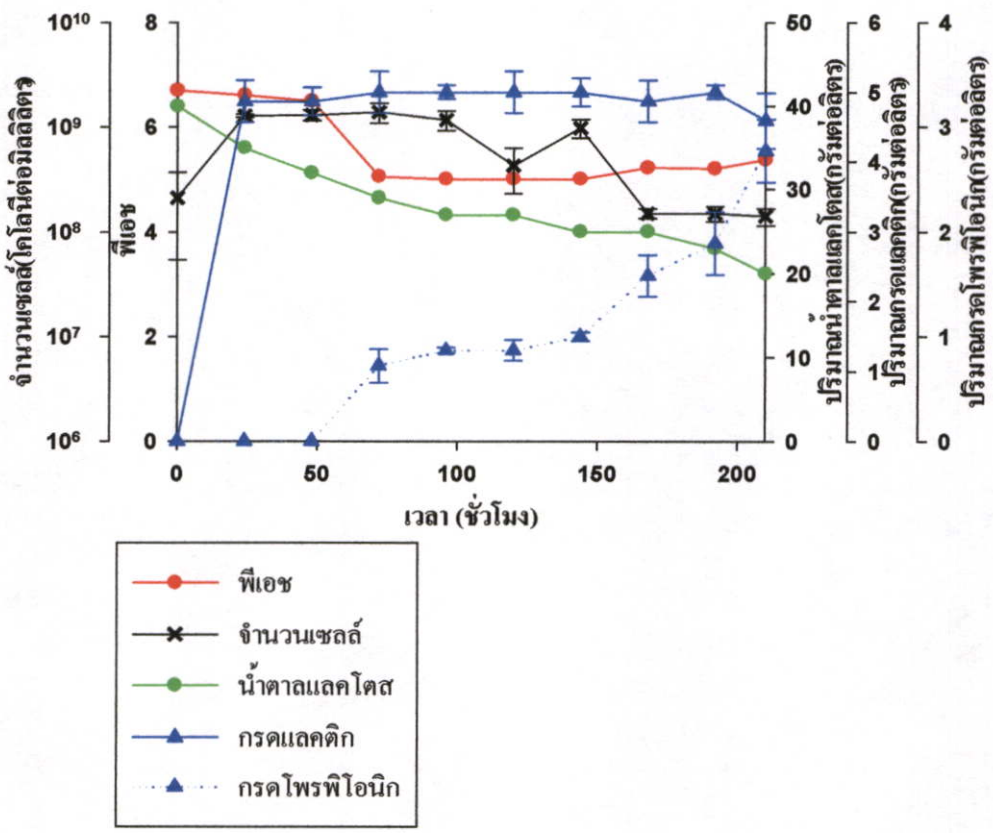
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 กับร้อยละ10 พบว่าได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกใกล้เคียงกัน แต่เชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10 จะใช้น้ำตาลแลคโตสมากกว่า และจำนวนเซลล์ในชั่วโมงที่210 ก็มากกว่าเมื่อใช้เชื้อในปริมาณร้อยละ5 แสดงว่าเมื่อใช้หัวเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ10 เชื้อจะนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้เพื่อการเจริญของเซลล์มากกว่าการนำไปใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก ดังนั้นการใช้หัวเชื้อ *P.acidipropionici* ปริมาณร้อยละ10 จึงไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ

Hsu และ Yang (1991) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 พบว่าหัวเชื้อเริ่มต้นในปริมาณร้อยละ5 นั้นเหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

Lewis และ Yang (1992) ศึกษาผลของซับสเตรตที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ที่ถูกตรึงโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นในปริมาณร้อยละ5 เมื่อใช้แลคโตส แลคแตต และกลูโคสเป็นซับสเตรต จะได้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.385, 0.518 และ 0.389 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ

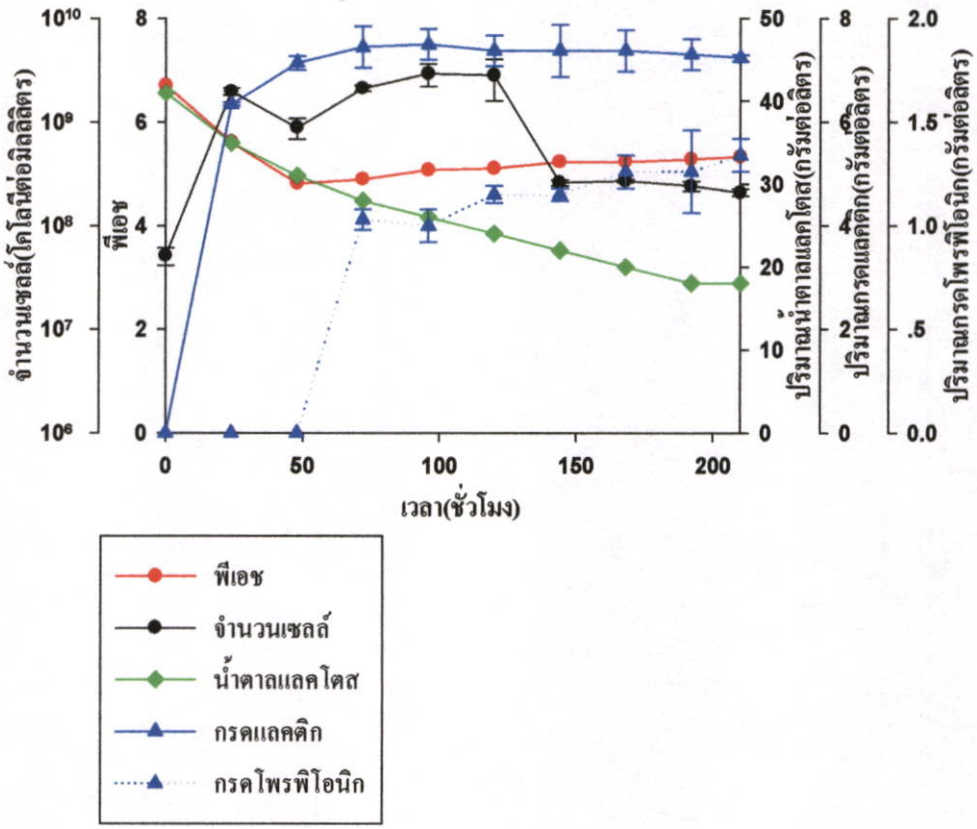
Goswami และ Srivastava (2000) ซึ่งทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ในปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง คือ พีเอชเริ่มต้น6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 20.75 กรัมต่อลิตร

การทดลองชุดที่ 5 เติมเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ร่วมกับ *L. lactis* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 2.77 กรัมต่อลิตร และกรดแลคติก 4.59 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ50 มีพีเอชต่ำสุด5.0 ในชั่วโมงที่72 และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 3.00 x 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 9.80 x 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่144 หลังจากนั้นจำนวนเซลล์มีแนวโน้มที่จะลดลงเหลือ 1.40 x 10^8 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และปริมาณน้ำตาลแลคโตสมีแนวโน้มลดลง ส่วนปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดการทดลอง การที่เซลล์เริ่มลดจำนวนลงในชั่วโมงที่168 อาจเนื่องมาจากเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* ที่ลดจำนวนลงซึ่งได้ทำการทดลองมาแล้วในการทดลองชุดที่1 ซึ่งพบว่าการเจริญของเชื้อ *L. lactis* จะมีจำนวนเซลล์เริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 เป็นต้นไป



รูปที่ 4.5 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5

การทดลองชุดที่ 6 เติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ10 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ10 ทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 1.34 กรัมต่อลิตร และกรดแลคติก 7.23 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาล 18 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ55 มีพีเอชต่ำสุด4.8 ในชั่วโมงที่48 และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 5.50 x 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 2.80 x 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 120 และเริ่มลดลงในชั่วโมงที่144 จนสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนเซลล์ 2.08 x 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.6

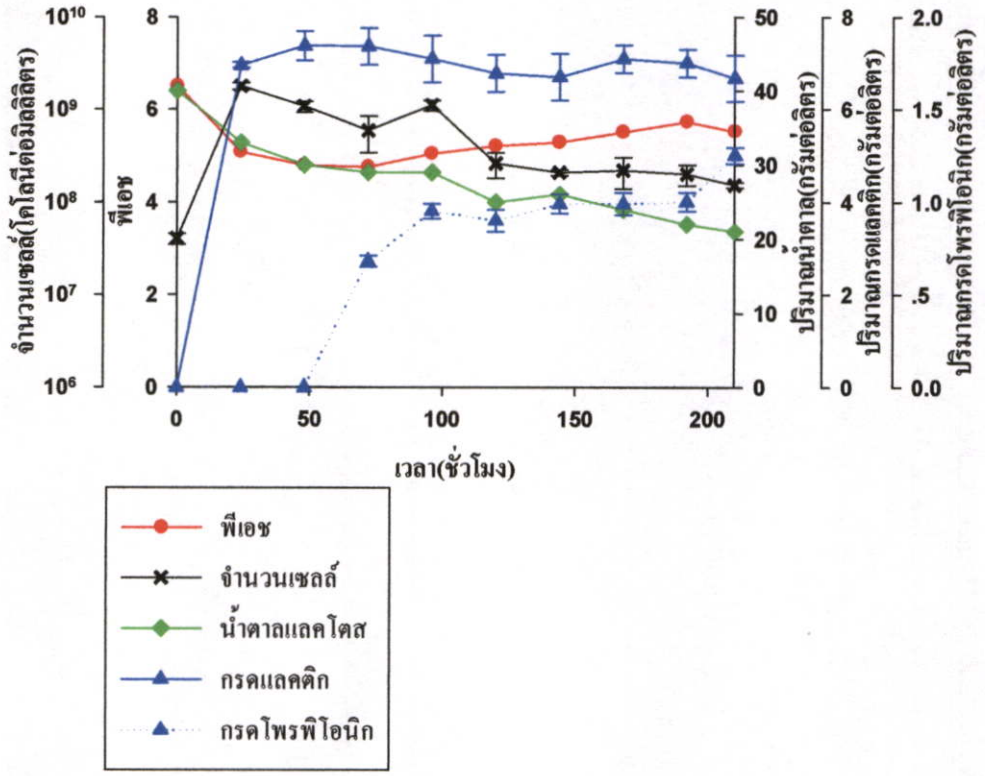


รูปที่ 4.6 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการทดลองชุดที่ 5 กับ 6 พบว่าในการทดลองชุดที่ 5 ซึ่งใช้ปริมาณหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ5 นั้นมีปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าการทดลองในชุดที่6 ซึ่งใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ10 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ10 โดยในการทดลองในการใช้เชื้อเดี่ยวของเชื้อ *P. acidipropionici* นั้นเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อ

เริ่มต้นร้อยละ5 กับ ร้อยละ10 จะให้ปริมาณกรดใกล้เคียงกัน แต่ในการใช้เชื้อเดี่ยวของเชื้อ *L. lactis* ในปริมาณร้อยละ10 จะได้ปริมาณกรดแลคติกสูงกว่าปริมาณร้อยละ5 ดังนั้นในการใช้เชื้อผสมโดยใช้เชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ10 จะทำให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกลดลง เนื่องจากปริมาณกรดแลคติกที่สูงเกินไปอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. acidipropionici* ทำให้เชื้อเจริญได้ไม่ดีและส่งผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

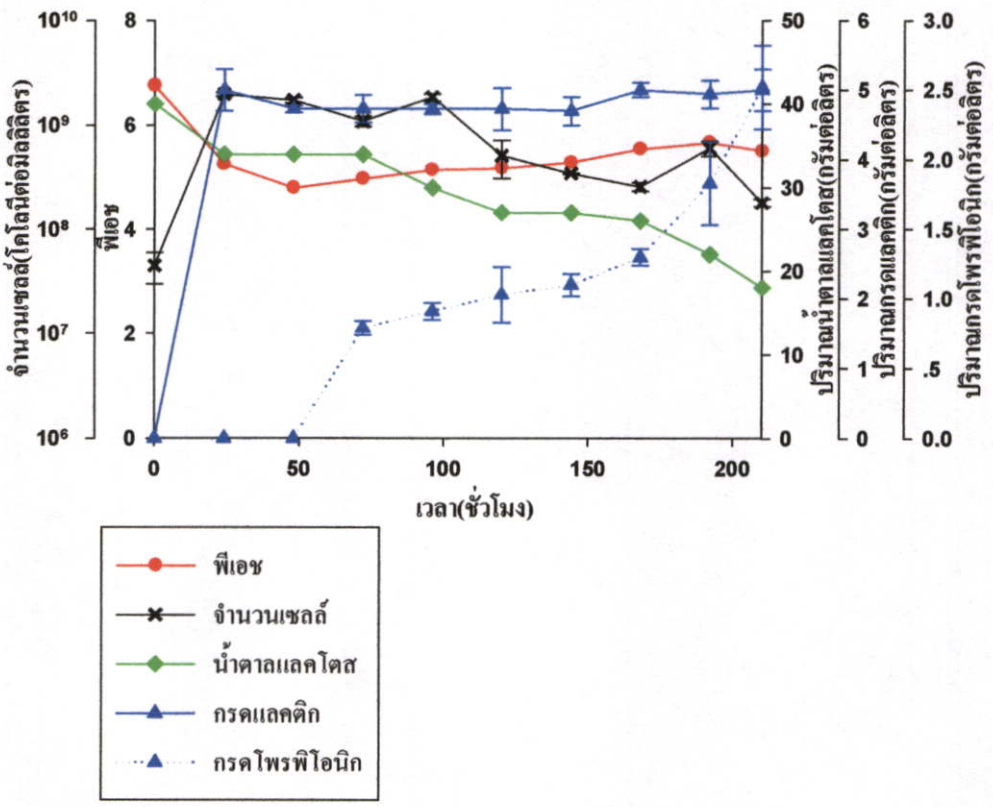
การทดลองชุดที่ 7 เติมปริมาณหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ10 ทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 1.24 กรัมต่อลิตร และกรดแลคติก 6.67 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาล 21 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ47.5 มีพีเอชเริ่มต้น6.5 และพีเอชต่ำสุด4.7 ในชั่วโมงที่72 และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 4.30 x 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 1.11 x 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่96 และในชั่วโมงที่210 มีจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 1.52 x 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการทดลองชุดที่7 กับชุดที่5 ซึ่งใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ5 เท่ากัน พบว่าในการทดลองชุดที่7 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกน้อยกว่าเพราะใช้เชื้อ *L. lactis* ร้อยละ10 แต่ในการทดลองชุดที่ 5 ใช้เชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 ผลการทดลองนี้จึงช่วยยืนยันได้ว่าเชื้อ *L. lactis* ในปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10 ไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นเชื้อผสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

การทดลองชุดที่ 8 เติมปริมาณหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ10 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ5 ทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 2.52 กรัมต่อลิตร และกรดแลคติก 5.00 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาล 18 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ55 มีพีเอชเริ่มต้น6.5 และมีพีเอชต่ำสุด4.8 ในชั่วโมงที่48 มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 4.50×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 1.84×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่96 เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนเซลล์ 1.80×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ10 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการทดลองชุดที่ 5 กับ 8 ซึ่งในการทดลองทั้ง 2 ชุดนี้ให้ปริมาณโพรพิโอนิกใกล้เคียงกัน โดยในการทดลองชุดที่8 มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกต่ำกว่าชุดที่5 เพียงเล็กน้อย ถึงแม้ในการทดลองชุดที่8 จะใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ10 แต่ในการทดลองชุดนี้ใช้เชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 จึงกล่าวได้ว่าในการใช้เชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นเชื้อผสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

จากการศึกษาปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ระหว่างการใช้เชื้อ *P. acidipropionici* เพียงเชื้อเดียวกับการใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อ *P. acidipropionici* ร่วมกับ *L. lactis* พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมจะทำให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกน้อยกว่าการใช้เชื้อเดี่ยวของเชื้อ *P. acidipropionici* เพียงเชื้อเดียว และทำให้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้น อาจเนื่องมาจากกรดแลคติกมีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acidipropionici* จึงทำให้เชื้อ *P. acidipropionici* ไม่สามารถใช้กรดแลคติกและผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ มีผลทำให้การใช้น้ำตาลลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Colomban และคณะ (1993) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* เจริญได้เร็วกว่าเชื้อ *P. acidipropionici* และไม่สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกได้

จากนั้นนำปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้เชื้อผสมในการทดลองชุดที่ 5 , 6 , 7 และ8 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในการทดลองทั้ง 4 ชุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ค) โดยการใช้เชื้อผสมของเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ5 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่นๆที่ใช้ในการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบการทดลองในการใช้เชื้อผสมที่เติมเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 กับร้อยละ10 พบว่าสูตรอาหารที่เติมเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ10 มีแนวโน้วที่จะผลิตกรดโพรพิโอนิกได้น้อยกว่าสูตรอาหารที่ใช้ *L. lactis* ร้อยละ5 เมื่อเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในปริมาณที่เท่ากัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณกรดแลคติกที่มากเกินไปจะมีผลต่อเชื้อ *P. acidipropionici* ทำให้ผลิตกรดโพรพิโอนิกได้น้อยลง เมื่อเปรียบเทียบการทดลองซึ่งเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ5 กับร้อยละ10 พบว่าสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้เชื้อผสมของหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ5 ร่วมกับ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ5 มาทำการศึกษาในหัวข้อต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการใช้เชื้อผสมในการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิก

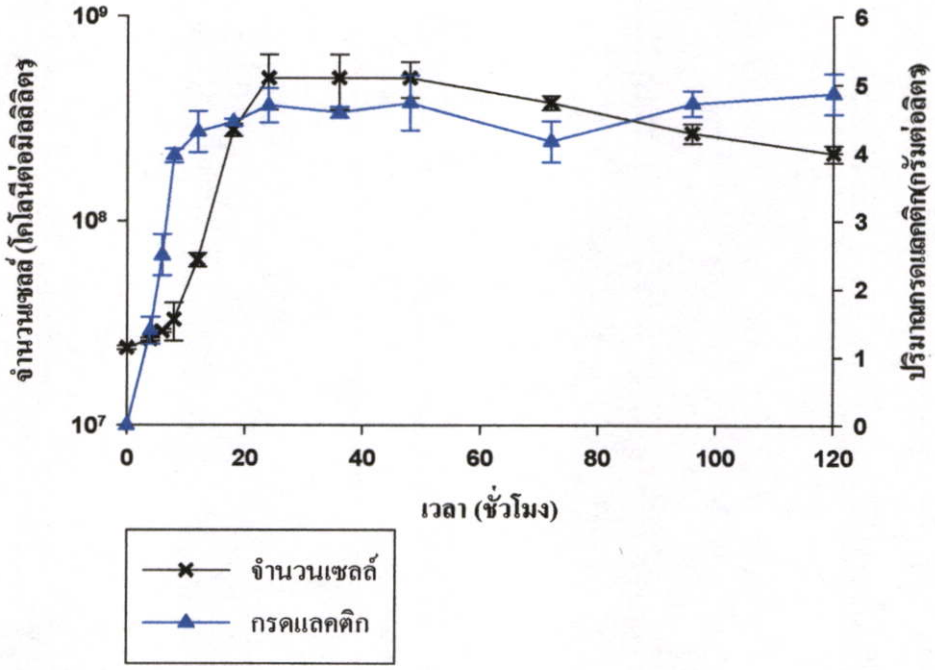
ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)
P. acidipropionici ร้อยละ5 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ5	210	2.77[a]	4.59
P. acidipropionici ร้อยละ10 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ10	210	1.34[c]	7.23
P. acidipropionici ร้อยละ5 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ10	210	1.24[d]	6.67
P. acidipropionici ร้อยละ10 ร่วมกับ *L. lactis* ร้อยละ5	210	2.52[b]	5.00

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

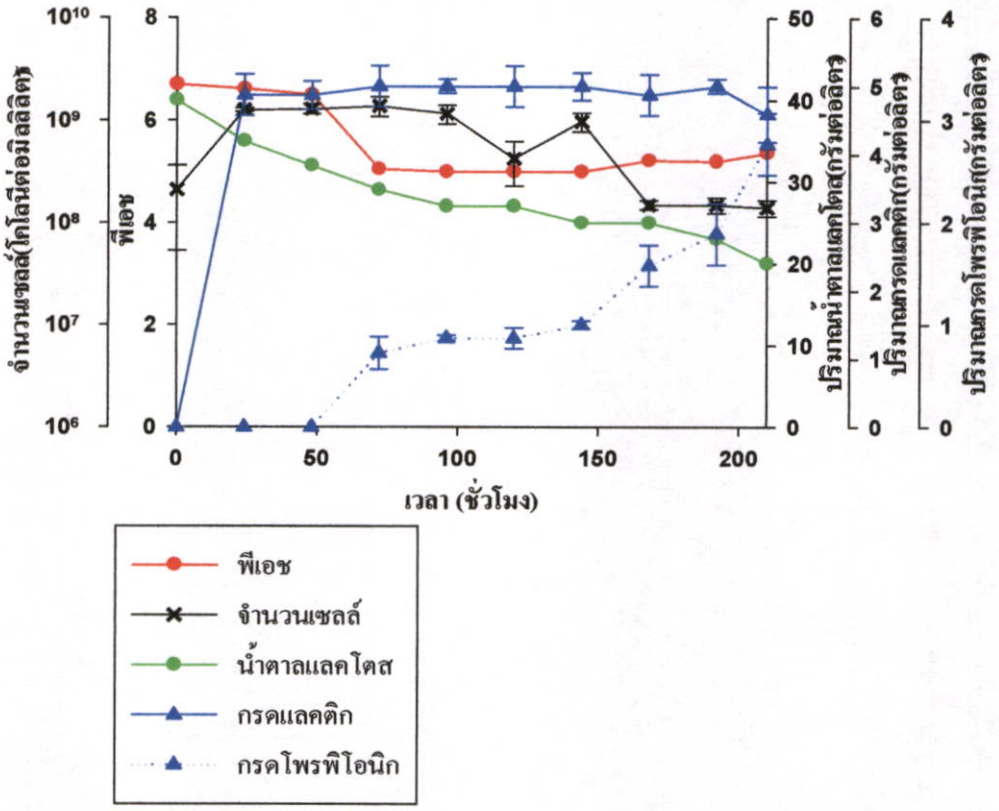
4.2 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ผสมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อและการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. lactis* (ร้อยละ 5) ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าชั่วโมงที่ 0 - 24 จะเป็นช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะ log phase และชั่วโมงที่ 24 - 48 จะเป็นช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะ stationary phase และการผลิตกรดแลคติกจะเกิดพร้อมกับการเจริญของเชื้อ โดยจะมีปริมาณกรดแลคติกสูงสุดในชั่วโมงที่24 จึงทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมเชื้อ *L. lactis* โดยแบ่งเป็นช่วงเวลาต่างๆคือ ชั่วโมงที่ 0, 12, 24 และ 48 ตามลำดับ



รูปที่ 4.9 แสดงการเจริญและปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5

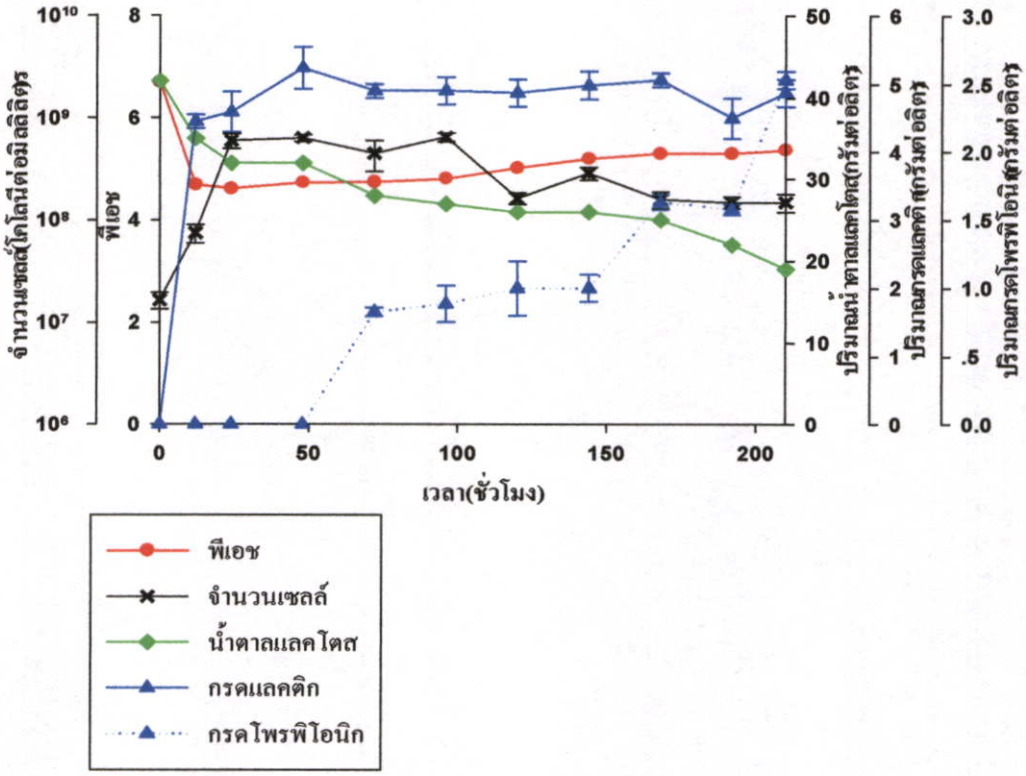
การทดลองชุดที่ 1 เป็นการศึกษาระยะเวลาในการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 โดยการเติมไปพร้อมกันเมื่อเริ่มทำการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) พบว่า เมื่อทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 210 ชั่วโมง ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 2.77 กรัมต่อลิตร และกรดแลคติก 4.59 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ50 มีพีเอชต่ำสุด5.0 ในชั่วโมงที่96 และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 3.00 x 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 9.80 x 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 144 หลังจากนั้นจำนวนเซลล์เริ่มลดลงเหลือจำนวนเซลล์ 1.40 x 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ไปพร้อมกันเมื่อเริ่มทำการทดลอง(ชั่วโมงที่ 0)

การทดลองชุดที่ 2 เป็นการเติมหัวเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 เมื่อเริ่มทำการทดลอง หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ในช่วงกึ่งกลางที่เชื้อ *L. lactis* ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงสุด (ชั่วโมงที่ 12) ผลการศึกษาพบว่าได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 2.53 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 210 ชั่วโมง มีกรดแลคติก 4.87 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาล 19 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ52.5 มีพีเอชต่ำสุด4.6 ในชั่วโมงที่24 และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 1.65 x 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 6.50 x 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่96 เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนเซลล์ 1.08 x 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.11

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการทดลองชุดที่ 1 กับชุดที่ 2 พบว่าได้ปริมาณกรดใกล้เคียงกัน ซึ่งในการทดลองชุดที่ 2 มีปริมาณกรดต่ำกว่าเล็กน้อย เนื่องจากการทดลองชุดที่ 2 ใส่เชื้อในชั่วโมงที่มากกว่าจึงทำให้เชื้อเจริญได้ช้ากว่าการทดลองชุดที่ 1 ซึ่งดูได้จากจำนวนเซลล์ในชั่วโมงที่210 ของการทดลองชุดที่ 1 จะมีจำนวนเซลล์มากกว่าชุดที่ 2

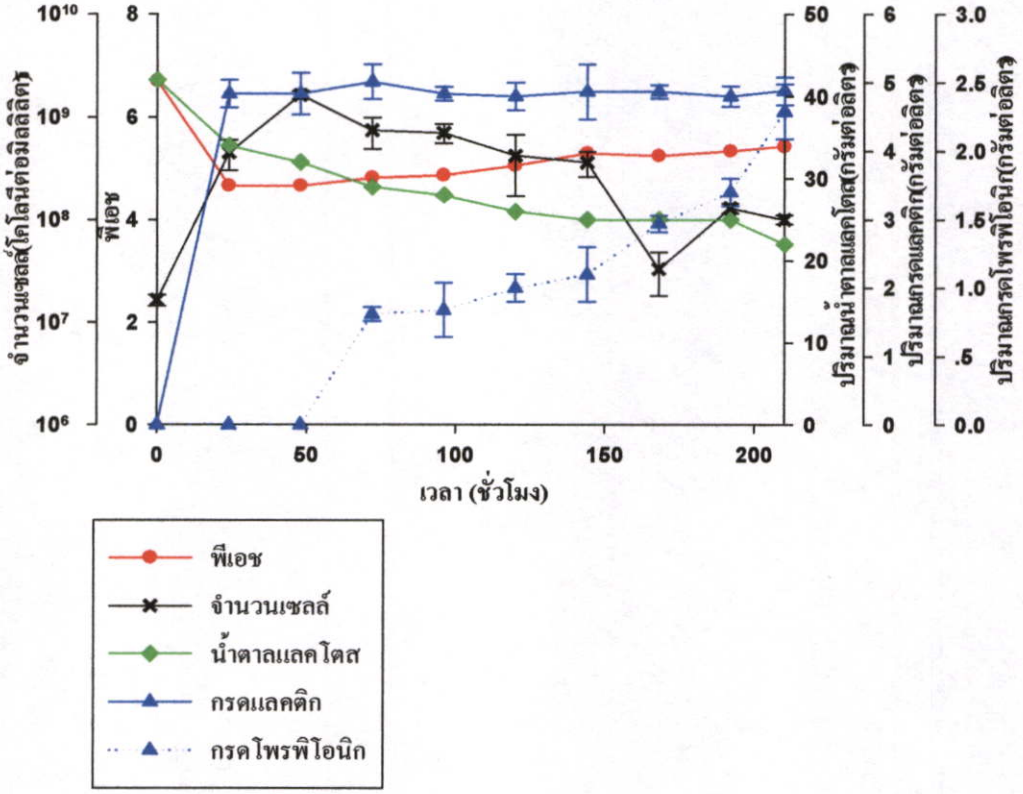


รูปที่ 4.11 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ในชั่วโมงที่12

การทดลองชุดที่ 3 เป็นการเติมหัวเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 เมื่อเริ่มทำการทดลอง หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ในช่วงที่เชื้อ *L. lactis* ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงสุด คือการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในชั่วโมงที่24 ผลการศึกษาพบว่าได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 2.29 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 210 ชั่วโมง มีกรดแลคติก 4.88 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาล 22 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ45 มีพีเอชต่ำสุด4.6 ในชั่วโมงที่24 และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 1.64×10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 1.64×10^{9} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่48 หลังจากนั้นจำนวนเซลล์มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนเซลล์ 1.00×10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.12

เมื่อเปรียบเทียบการทดลองชุดที่ 1, 2 และ 3 พบว่าในการทดลองชุดที่3 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกต่ำกว่าชุดอื่น เนื่องจากในการทดลองชุดที่ 3 จะใส่เชื้อในชั่วโมงที่24 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่มากกว่าชุดที่ 1 และ 2 ในการทดลองชุดที่ 1 จะได้ปริมาณกรดมากที่สุดรองลงมาคือ ชุดที่ 2 และ 3

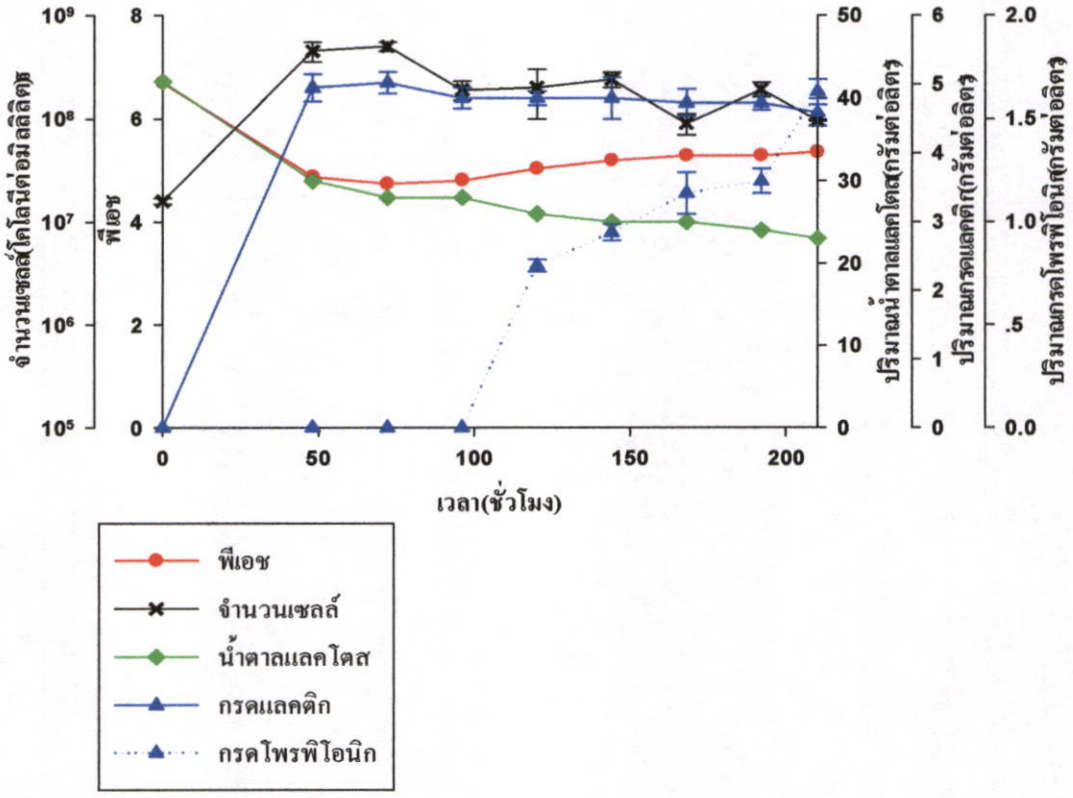
ซึ่งสัมพันธ์กับชั่วโมงที่ทำการเติมเชื้อ โดยเมื่อเติมเชื้อในชั่วโมงที่มากขึ้นปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะลดต่ำลง



รูปที่ 4.12 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ในชั่วโมงที่24

การทดลองชุดที่ 4 เป็นการเติมหัวเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 เมื่อเริ่มทำการทดลอง หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ในช่วงที่เชื้อ *L. lactis* ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงสุดและเชื้อ *L. lactis* อยู่ในระยะstationary phase คือการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในชั่วโมงที่48 ผลการศึกษาพบว่าได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 1.63 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักในสภาวะนิ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 210 ชั่วโมง มีกรดแลคติก 4.80 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาล 23 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ42.5 มีพีเอชต่ำสุด4.7 ในชั่วโมงที่72 และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 1.60 x 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 6.20 x 10^8 โคโลนี

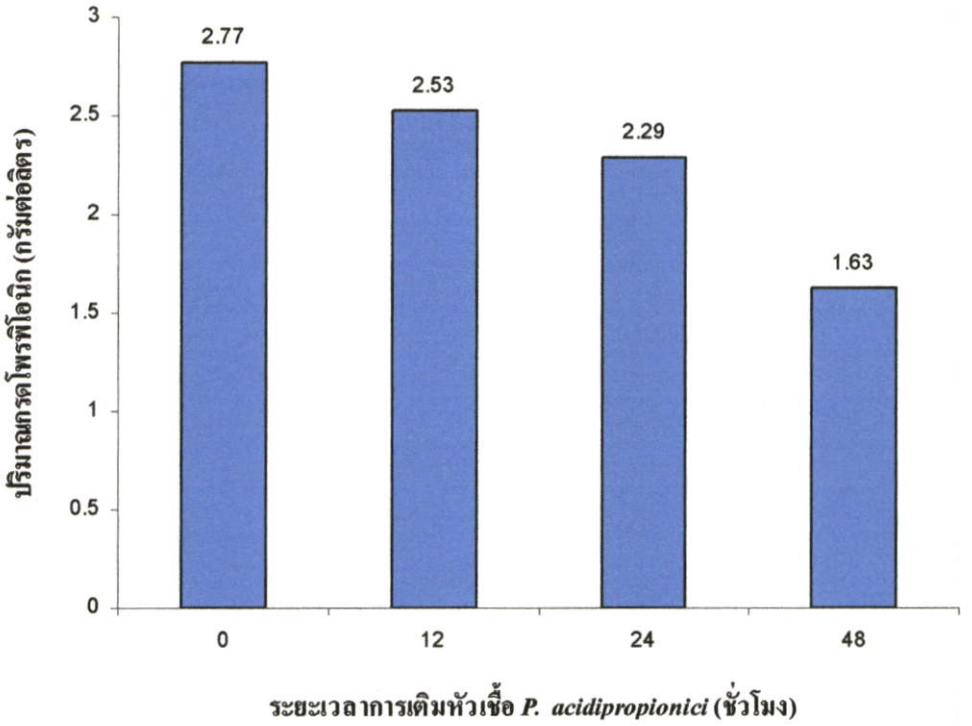
ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่48 เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนเซลล์ 9.60 x 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงค่าพีเอช จำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ที่ทำการหมักโดยการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ5 ในชั่วโมงที่48

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการศึกษาระยะเวลาการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* พบว่าจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ไปพร้อมกับเชื้อ *L. lactis* ในชั่วโมงที่0 คือได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 2.77 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในชั่วโมงที่12 , 24 และ 48 ซึ่งได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 2.53 , 2.29 , และ 1.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ซึ่งการเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในชั่วโมงที่48 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกน้อยที่สุด อาจเนื่องมาจากการที่เติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในชั่วโมงที่มากขึ้นทำให้เชื้อโตช้ากว่าการที่เติมในชั่วโมงที่0 และ 12 และกรดแลคติกที่มีอยู่ในอาหารอาจส่งผลทำให้เชื้อ *P. acidipropionici* เจริญเติบโตได้ไม่ดี สำหรับค่าแสดง

ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (Yield) และอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (Productivity) ในการทดลองทั้ง 4 ชุด แสดงในตารางที่4.2 เมื่อเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในชั่วโมงที่0, 12 , 24 และ48 ได้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.139, 0.120, 0.127 และ0.096 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ และได้อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.013, 0.012, 0.010 และ 0.007 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเมื่อเติมเชื้อ *P. acidipropionici* ในชั่วโมงที่0 จะได้ผลผลิตและอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด



รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกในการศึกษาระยะเวลาการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ปริมาณร้อยละ5

เมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธีทางสถิติดังแสดงในตารางที่4.2 พบว่าการศึกษาระยะเวลาการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ทุกชุดการทดลองให้ผลการผลิตกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ค) และในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ไปพร้อมกับเชื้อ *L. lactis* ในชั่วโมงที่0 นั้นให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด จึงเลือกใช้การเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ไปพร้อมกับเชื้อ *L. lactis* ในการทดลองในหัวข้อต่อไป

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าผลผลิตกรดโพรพิโอนิกและอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกในการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ5

ระยะเวลาการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici*	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรชั่วโมง)
ชั่วโมงที่0	210	2.77[a]	0.139	0.013
ชั่วโมงที่12	210	2.53[b]	0.120	0.012
ชั่วโมงที่24	210	2.29[c]	0.127	0.010
ชั่วโมงที่48	210	1.63[d]	0.096	0.007

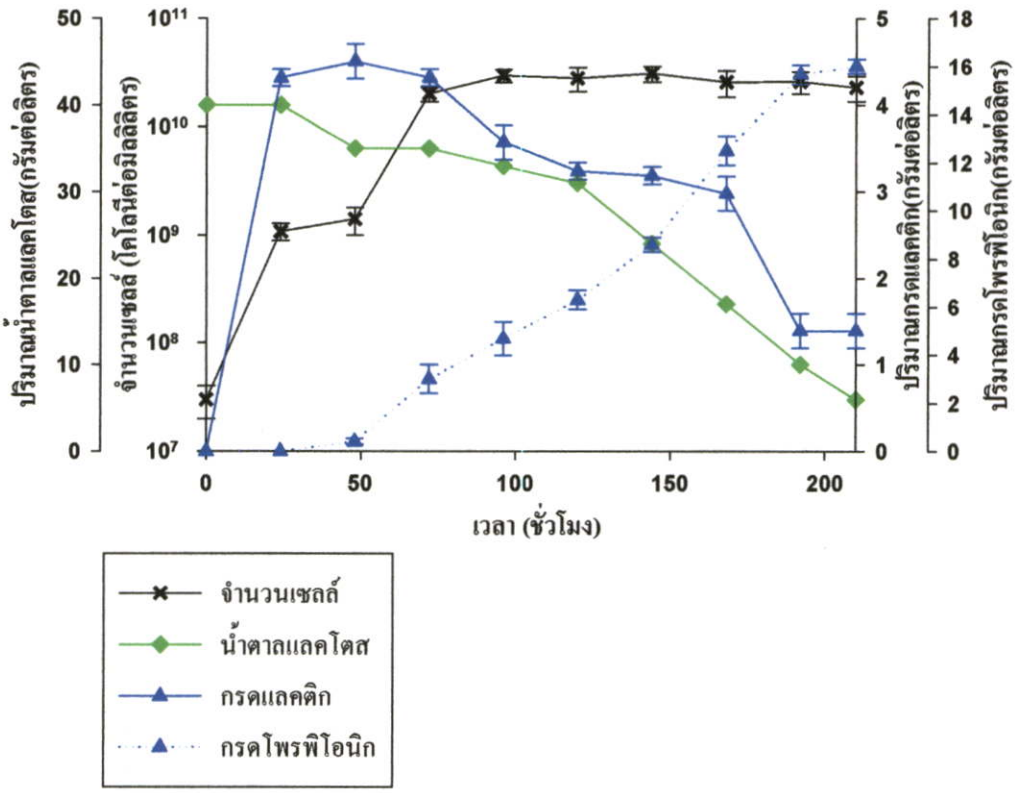
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3 ผลการศึกษาอัตราการกวนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้หัวเชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

การศึกษาอัตราการกวนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้หัวเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ร้อยละ5 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีการควบคุมสภาวะที่ใช้ในการหมัก คือ ควบคุมพีเอชที่6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่มีการพ่นอากาศ ในการทดลองชุดที่ 1 เป็นการใช้อัตราการกวน 0 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 210 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณ 16 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกรดแลคติก 4.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่24 – 72 หลังจากนั้นกรดแลคติกมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลองเหลือปริมาณกรดแลคติก 1.39 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาลแลคโตส 6 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปร้อยละ85 ซึ่งเริ่มต้นมีปริมาณน้ำตาลแลคโตส 40 กรัมต่อลิตร และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 3.00×10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 2.31×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.15 จากผลการทดลองที่กรดแลคติกมีแนวโน้มลดลงเนื่องจากในถังหมักมีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. acidipropionici* ทำให้เชื้อเจริญได้ดี ดูได้จากเชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 3.00×10^{7} โคโลนีต่อ

มิลลิลิตร เป็น 2.31 x 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้เชื้อใช้น้ำตาลแลคโตสได้มากขึ้น และเมื่อน้ำตาลแลคโตสมีปริมาณลดลงไม่เพียงพอที่เชื้อจะนำไปใช้ในการเจริญเชื้อจึงใช้กรดแลคติกเป็นซับสเตรตในการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิกอีกทางหนึ่งทำให้ปริมาณกรดแลคติกลดลง

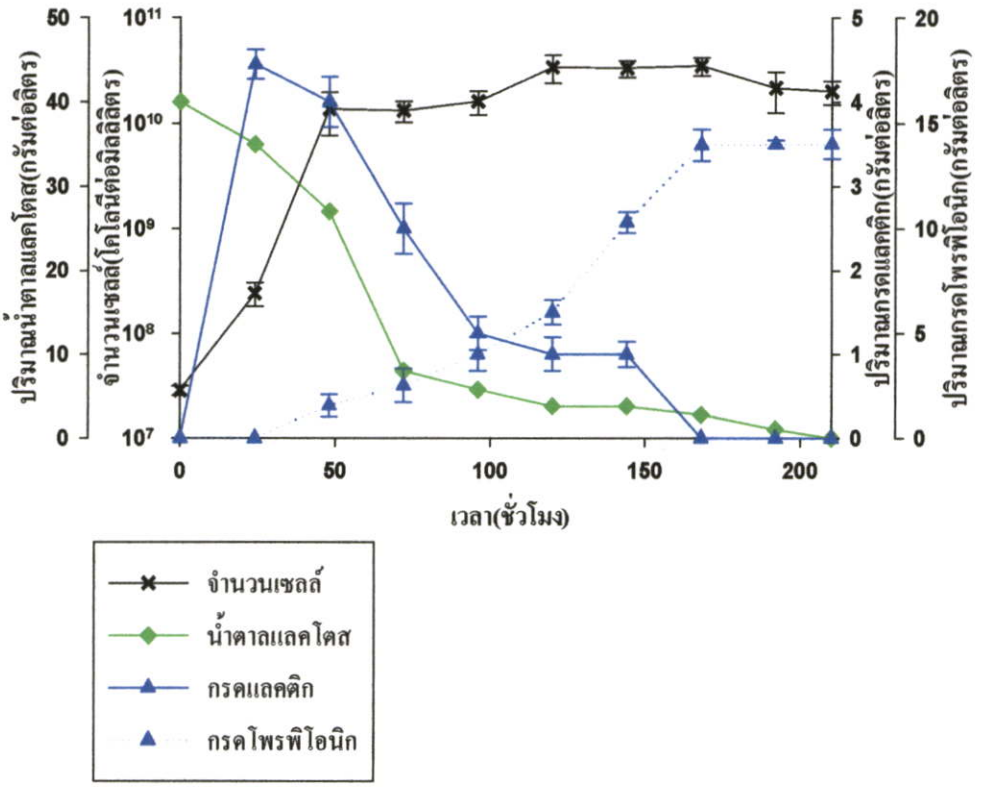


รูปที่ 4.15 แสดงจำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการกวน 0 รอบต่อนาที

ในการทดลองชุดที่ 2 เป็นการใช้อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุด 14 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่192 และมีกรดแลคติก 4.4 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่24 หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลง สำหรับปริมาณน้ำตาลแลคโตสซึ่งเริ่มต้นมีปริมาณ 40 กรัมต่อลิตร จะมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 2.87 x 10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 2.00 x 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่210 ดังแสดงในรูปที่ 4.16

เมื่อเปรียบเทียบการทดลองชุดที่ 1 กับ 2 พบว่าในการทดลองชุดที่ 1 มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากกว่าเล็กน้อยแต่ใช้ระยะเวลาในการผลิตนานกว่า แสดงว่าเมื่อมีการกวนจะทำ

ให้ช่วยลดระยะเวลาในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ ซึ่งการกวนนั้นมีผลทำให้เกิดการผสมระหว่างอาหารกับเชื้อได้ดีขึ้น เชื้อจึงสามารถเจริญและผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เร็วกว่า

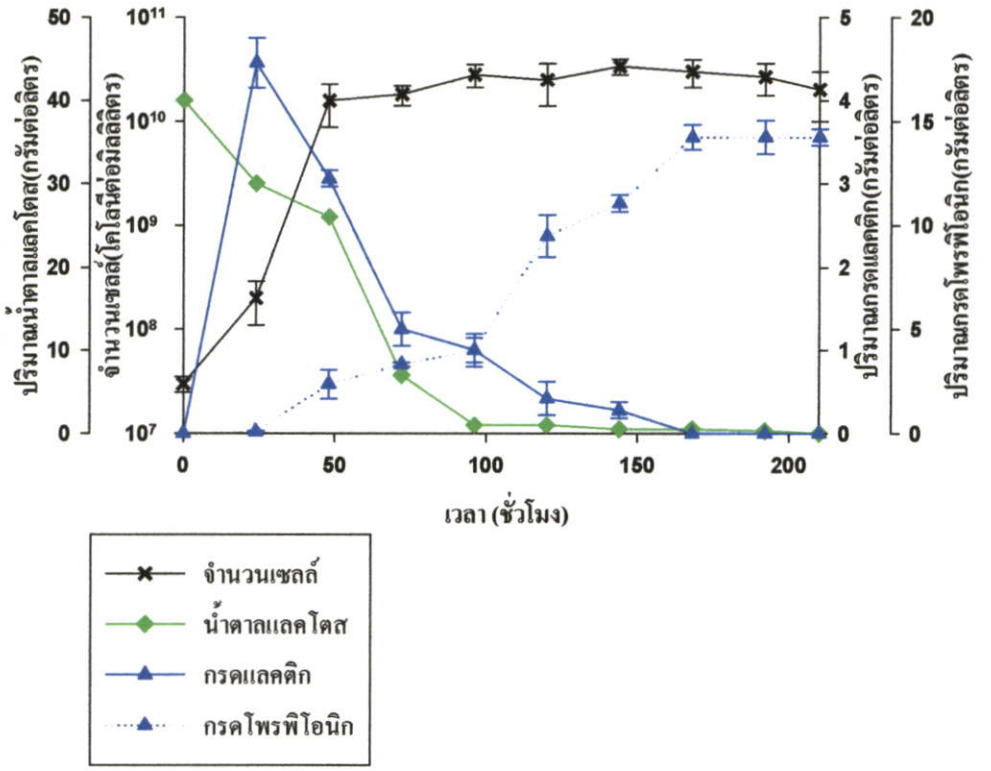


รูปที่ 4.16 แสดงจำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที

การทดลองชุดที่ 3 เป็นการใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที พบว่าในชั่วโมงที่24 มีปริมาณกรดแลคติก 4.45 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณกรดแลคติกจะลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่144 หลังจากนั้นจะไม่มีกรดแลคติกเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 14.24 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่168 หลังจากนั้นปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีแนวโน้มที่จะคงที่ไปเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ลดลงเรื่อยๆตั้งแต่ชั่วโมงที่0 จนถึงชั่วโมงที่120 เหลือปริมาณน้ำตาลแลคโตส 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งเริ่มต้นมีปริมาณน้ำตาลแลคโตส 40 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจะไม่เหลือน้ำตาลแลคโตสอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีแนวโน้มสูงขึ้น เนื่องมาจากเชื้อ *P. acidipropionici* สามารถใช้กรดแลคติกเป็น

แหล่งคาร์บอนเพื่อนำมาผลิตกรดโพรพิโอนิกได้อีกทางหนึ่ง และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 3.00 x 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 2.00 x 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.17

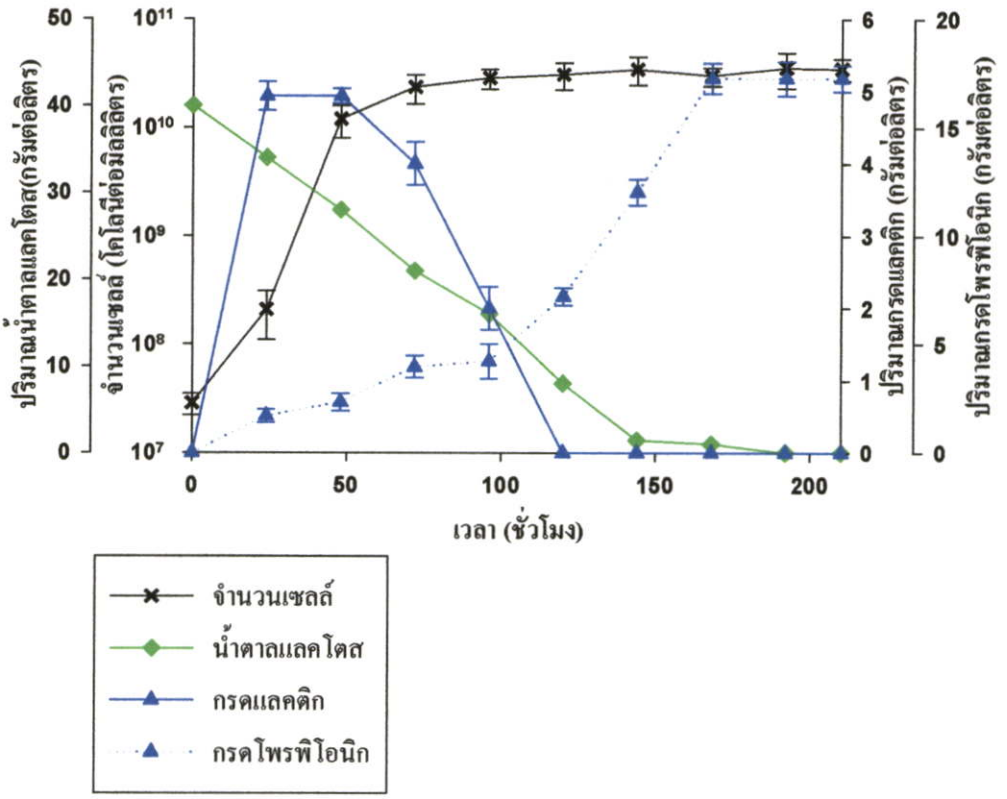
เมื่อเปรียบเทียบการทดลองทั้ง 3 ชุด พบว่าในการทดลองชุดที่ 1 กับ 2 มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกใกล้เคียงกัน แต่ในการทดลองชุดที่ 3 ใช้ระยะเวลาในการผลิตน้อยกว่า คือ 168 ชั่วโมง ส่วนการทดลองชุดที่2 ใช้ระยะเวลาในการผลิต 192 ชั่วโมง สำหรับในการทดลองชุดที่1 ให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากกว่าชุดที่ 2 กับ 3 เพียงเล็กน้อยแต่ใช้ระยะเวลาในการผลิตนานถึง 210 ชั่วโมง แสดงว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนจะทำให้ลดระยะเวลาในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้



รูปที่ 4.17 แสดงจำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที

การทดลองชุดที่ 4 เป็นการใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที พบว่าในชั่วโมงที่24 มีปริมาณกรดแลคติก 4.93 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณกรดแลคติกจะลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 120 หลังจากนั้นจะไม่มีกรดแลคติกเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 17.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่168 หลังจากนั้นปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีแนวโน้มที่จะคงที่ไป

เรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่ลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลองจะไม่เหลือน้ำตาลแลคโตสและกรดแลคติกอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเริ่มต้นมีปริมาณน้ำตาลแลคโตส 40 กรัมต่อลิตร สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อจะมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 2.90×10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 3.50×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.18

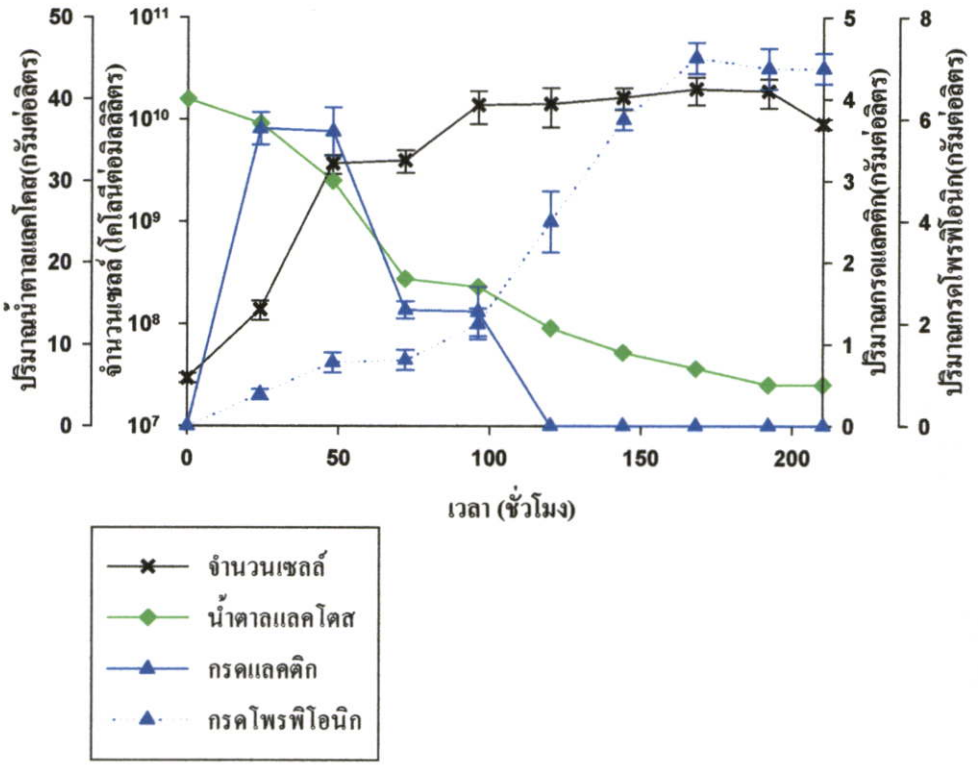


รูปที่ 4.18 แสดงจำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

จากการทดลองทั้ง 4 ชุด พบว่าการทดลองชุดที่ 3 กับ 4 ใช้ระยะเวลาในการผลิตกรดเท่ากัน แต่ในชุดที่ 4 จะมีปริมาณกรดมากกว่า และการทดลองชุดที่ 1 กับ 4 มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกใกล้เคียงกันซึ่งการทดลองที่4 มีปริมาณกรดมากกว่าเล็กน้อยแต่ใช้ระยะเวลาในการผลิตน้อยกว่า แสดงว่าเมื่อใช้การกวน 100 และ 150 รอบต่อนาที จะใช้ระยะเวลาในการผลิตกรดเท่ากันแต่เมื่อกวนด้วยอัตรา 150 รอบต่อนาทีทำให้มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากกว่าเล็กน้อย

การทดลองชุดที่ 5 เป็นการใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พบว่าในชั่วโมงที่24 มีปริมาณกรดแลคติก 3.64 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณกรดแลคติกจะลดลงเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 120

หลังจากนั้นจะไม่มีกรดแลคติกเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 7.21 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่168 หลังจากนั้นปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีแนวโน้มที่จะคงที่ไปเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง สำหรับน้ำตาลแลคโตสมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง และการเจริญเติบโตของเชื้อจะมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 2.95 x 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 9.00 x 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่210 ดังแสดงในรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 แสดงจำนวนเซลล์ ปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

จากการทดลองทั้ง 5 ชุด พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนถึง 200 รอบต่อนาที จะทำให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกน้อยที่สุด ถึงแม้ว่าจะใช้ระยะเวลาในการผลิตเท่ากับการทดลองชุดที่ 3 กับ 4 ก็ตาม แสดงว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนให้มากขึ้นจนถึง 200 รอบต่อนาที จะไม่ส่งผลดีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกแต่ยังทำให้ได้ปริมาณกรดน้อยลงไปอีก อาจเนื่องมาจากเมื่อเพิ่มอัตราการกวนจะส่งผลต่อเชื้อทำให้เชื้อได้รับอันตราย เชื้อจึงใช้น้ำตาลในการเจริญมากกว่าจะนำไปใช้เพื่อผลิตกรด ซึ่งดูได้จากปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างต่อเนื่องแต่ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มากนัก

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่ทำการหมักในถังหมัก พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่210 การทดลองที่ทำการกวนในอัตรา 0, 50, 100 รอบต่อนาที จะมีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน ในการกวนด้วยอัตรา 150 รอบต่อนาที จะมีจำนวนเซลล์สูงที่สุด และในการกวน 200 รอบต่อนาที เซลล์จะมีจำนวนน้อยที่สุด แต่การกวนในอัตรา 0 รอบต่อนาที จำนวนเซลล์จะเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่72 และเมื่อกวนในอัตรา 50, 100 และ 150 จำนวนเซลล์จะเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่48 แสดงว่าในการกวนด้วยอัตรา 150 รอบต่อนาที ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุด และเมื่อดูการเจริญของเชื้อเมื่อทำการหมักในฟลาสก์ พบว่าการเจริญของเชื้อในฟลาสก์มีจำนวนเซลล์น้อยกว่าในถังหมัก และยังมีแนวโน้มลดจำนวนลงในชั่วโมงที่168 จนสิ้นสุดการทดลอง แต่การเจริญของเชื้อในถังหมักไม่มีแนวโน้มการลดลงของเชื้อ ซึ่งแสดงว่าการเจริญของเชื้อในถังหมักดีกว่าในฟลาสก์จึงส่งผลให้เกิดการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีกว่าด้วย

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้หัวเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 ที่ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อัตราการกวน 0, 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวน 0 รอบต่อนาทีจะใช้เวลาในการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด คือใช้เวลาในการผลิตนาน 210 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 50 รอบต่อนาที ทำให้ลดระยะเวลาการผลิตให้เหลือเพียง 192 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 100 , 150 และ 200 รอบต่อนาที จะใช้ระยะเวลาการผลิตน้อยกว่าอัตราการกวน 50 รอบต่อนาที โดยจะใช้ระยะเวลาการผลิตเพียง 168 ชั่วโมง และเมื่อใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาทีจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด คือ 17.27 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือใช้อัตราการกวน 0, 100, 50 และ 200 รอบต่อนาที ซึ่งได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 16, 14.24, 14 และ 7.21 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการศึกษาอัตราการกวนทำให้ทราบว่าการกวนมีผลทำให้ระยะเวลาในการผลิตกรดโพรพิโอนิกสั้นลง โดยเมื่อใช้อัตราการกวน 0 รอบต่อนาทีจะใช้เวลาในการผลิตนานกว่าการใช้อัตราการกวน 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที แต่เมื่อใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาทีจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกน้อยลง อาจเนื่องมาจากเมื่อใช้อัตราการกวนมากเกินไปจะส่งผลทำให้เกิดแรงเฉือน ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ทำให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บ (อรไท สุขเจริญ.2543) ทำให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกในปริมาณที่น้อยลง ผลผลิตและอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกแสดงในตารางที่ 4.3 เมื่อใช้อัตราการกวน 0, 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ได้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.471, 0.359, 0.356, 0.443 และ 0.218 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.076, 0.073, 0.085, 0.103 และ 0.043 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ

จากนั้นทำการวิเคราะห์โดยวิธีทางสถิติโดยใช้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกในชั่วโมงที่168 ของการทดลองทุกชุด โดยเมื่อใช้อัตราการกวน 0, 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 12.5, 13.92, 14.24, 17.27 และ 7.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที ให้ผลการ

ผลิตกรดสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการทดลองชุดอื่นๆ ในการใช้อัตราการกวน 50 และ 100 รอบต่อนาที ให้ผลการผลิตกรดไม่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ค)ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้หัวเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ5 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร คือมีการควบคุมพีเอชที่6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่มีการพ่นอากาศ มีการกวนในอัตรา 150 รอบต่อนาที ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ

Ozadali และคณะ(1996) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* โดยการหมักแบบกึ่งกะ ใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร มีการควบคุมพีเอชที่6.5 อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 45 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 146 ชั่วโมง โดยในการหมักแบบกึ่งกะจะมีการเติมกลูโคสที่มีความเข้มข้น 79 กรัมต่อลิตรลงไปในถังหมักเมื่อกลูโคสใกล้หมด

Tyree และคณะ (1991) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากน้ำตาลโดยผ่านสารตัวกลาง คือกรดแลคติก ในการผลิตจะใช้เซลล์ตรึงของเชื้อผสมระหว่างเชื้อ *P. shermanii* ATCC 13673 ร่วมกับเชื้อ *L. xylosus* ATCC 15577 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชที่6.5 มีการกวนด้วยอัตรา 150 รอบต่อนาที สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 4.73 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และมีผลผลิตกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 0.34 กรัมต่อกรัม

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก ผลผลิตและอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เมื่อใช้หัวเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ5

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรชั่วโมง)
0	210	16	0.471	0.076
50	192	14	0.359	0.073
100	168	14.24	0.356	0.085
150	168	17.27	0.443	0.103
200	168	7.21	0.218	0.043

ตารางที่ 4.4 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติของปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการศึกษาการผันแปรอัตราการกวนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้หัวเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ 5 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรชั่วโมง)
0	168	12.5^{c}	0.543	0.074
50	168	13.92^{b}	0.374	0.083
100	168	14.24^{b}	0.356	0.085
150	168	17.27^{a}	0.443	0.103
200	168	7.21^{d}	0.225	0.043

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อเดี่ยวของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ5 ที่ทำการหมักในฟลาสก์ และการผลิตโดยใช้เชื้อผสมของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ5 ที่ทำการหมักในถังหมัก ทำการกวน 150 รอบต่อนาที ซึ่งได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 12.66 และ 17.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แม้ว่าจะใช้เวลาในการผลิตไม่เท่ากันแต่สามารถเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้จากค่าอัตราการผลิต ซึ่งพบว่าเมื่อใช้เชื้อผสมที่ทำการหมักโดยใช้ถังหมัก จะมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.103 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการใช้เชื้อเดี่ยวของเชื้อ *P. acidipropionici* ที่มีอัตราการผลิต 0.060 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิก และอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกในการใช้เชื้อเดี่ยวของเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ5 ที่หมักในฟลาสก์ กับการผลิตโดยใช้เชื้อผสมที่หมักในถังหมัก

	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อกรัม)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรชั่วโมง)
เชื้อเดี่ยวที่หมักในฟลาสก์	210	12.66	0.136	0.060
เชื้อผสมที่หมักในถังหมัก	168	17.27	0.443	0.103

ในการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้หัวเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ5 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* ปริมาณร้อยละ5 เมื่อทำการผลิตในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ซึ่งได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 2.77 กรัมต่อลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 210 ชั่วโมง แต่เมื่อทำการผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตรนั้นมีปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากขึ้น เนื่องมาจากการผลิตในถังหมักมีการควบคุมสภาวะต่างๆ คือ ควบคุมพีเอชที่6.5 ให้คงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium* (Tittster,1940;Champagne และคณะ, 1989 ; Crespo,1990 ; Yang และคณะ, 1994) ทำให้เชื้อ *P. acidipropionici* สามารถใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้อีกทางหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ

Quesada-Chanto และคณะ(1994) ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าที่พีเอช6.5 จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด และในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการใช้กรดแลคติกเป็นซับสเตรตนั้นมีการศึกษาของ

Barbirato และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอล เปรียบเทียบกับซับสเตรตอื่นๆ คือ กลูโคสและกรดแลคติก เมื่อใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 25562 ร่วมกับเชื้อ *C. propionicum* ATCC 25522 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชที่6.8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นซับสเตรตจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 0.844 โมลต่อโมล ในชั่วโมงที่73 เมื่อใช้กลูโคสเป็นซับสเตรตจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 1.445 มิลลิโมลต่อ 100 มิลลิโมล ในชั่วโมงที่69 และเมื่อใช้กรดแลคติกเป็นซับสเตรตจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 0.745 โมลต่อโมล ในชั่วโมงที่72

นอกจากนี้การหมักในถังหมักมีการกวนด้วยใบพัด ซึ่งการกวนมีผลทำให้เกิดการผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อกับเชื้อที่ใช้ในการหมักทำให้เชื้อสามารถใช้สารอาหารที่อยู่ในถังหมักได้ดียิ่งขึ้น ทำให้ได้ปริมาณกรดมาก และใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ

Yang และ Huang (1995) ศึกษาการผลิตโพรพิโอเนตจากเวย์โดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4875 ร่วมกับ *L. lactis* ทำการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เชื้อ *L. lactis* สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสในเวย์เปลี่ยนไปเป็นแลคเตต เพื่อให้เชื้อ *P. acidipropionici* ใช้แลคเตตเป็นซับสเตรตในการผลิตโพรพิโอเนต และพบว่าในการเปลี่ยนแลคเตตไปเป็นโพรพิโอเนตจะช้ากว่าการเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสไปเป็นแลคเตต และในการหมักจะได้ผลผลิตคล้ายกับการหมักโดยใช้เชื้อเดี่ยวของ *Propionibacterium* คือ โพรพิโอเนต อะซิเตต และซัคซิเนต นอกจากนั้นยังพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการหมักเมื่อใช้เชื้อผสมจะเร็วกว่าการหมักโดยใช้เชื้อเดี่ยว จึงกล่าวได้ว่าการใช้เชื้อผสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกไม่สามารถเพิ่มปริมาณกรดโพรโอนิก แต่ช่วยลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลงได้

ดังนั้นการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมเมื่อทำการผลิตในถังหมักจึงดีกว่าการผลิตในฟลาสก์ เพราะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าเนื่องจากการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักสามารถควบคุมพีเอช และมีการกวน จึงทำให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสม คือเวย์เติมแหล่งแร่ธาตุซึ่งประกอบด้วย K_2HPO_4 ปริมาณ 0.25 กรัมต่อลิตร $MnSO_4 . 4 H_2O$ ปริมาณ 0.05 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 . 7H_2O$ ปริมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัดปริมาณร้อยละ1 และ $CaCO_3$ ปริมาณร้อยละ1 พบว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร้อยละ5 และใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ร้อยละ5 สำหรับระยะเวลาในการเติมหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ที่เหมาะสม คือการเติมหัวเชื้อทั้ง 2 ลงไปพร้อมกันเมื่อเริ่มทำการทดลองจะทำให้ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด 2.77 กรัมต่อลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 210 ชั่วโมง เมื่อทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด คือ 17.27 กรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการหมัก 168 ชั่วโมง มีผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.443 กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.103 กรัมต่อลิตรชั่วโมง มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก $2.90x10^7$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น $3.5x10^{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตรเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

บรรณานุกรม

กุลยา จันทร์อรุณ. 2533. **เคมีอาหาร**. กรุงเทพฯ: หน่วยศึกษานิเทศน์ กรมการฝึกหัดครู.

ชลัท ศานติวรางคณา. 2534. **การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเครื่องดื่มจากเวย์**. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.

ประวัติ ตันบุญเอก, ดารา พวงสุพรรณ, ปริศนา เหมสุจิ และอรุณี วงษ์อุไร. 2525. **การศึกษาสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดสารพิษแอลฟลาทอกซิน**. รายงานผลการวิจัยของกองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.

วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2532. **เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการนมและผลิตภัณฑ์นม**. กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

สมใจ ภัสสัตยางกูล. 2537. **การศึกษาวิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ และการนำไปปรับใช้ในการผลิตสารเมตาบอไลท์จากแบคทีเรียโพรพิโอนิก**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรนารถ อร่ามเรือง.2550. **การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965**.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.

ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ. 2526. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเกี่ยวกับเทคโนโลยีอาหารนม ชุดที่ 3. เชียงใหม่ : สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์.

ศิวาพร ศิวเวช. 2546. **วัตถุเจือปนในอาหาร**. กรุงเทพฯ :มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรไท สุขเจริญ. 2543. **วิศวกรรมชีวเคมี**. กรุงเทพฯ :มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

Alfa – Laval. 1987. **Dairy Handbook**. Food Engineering AB, Sweden. 333 pp.

Arasaratnam, V., Senthuran, A. and Balasubramaninm, K. 1996. "Supplementation of whey with glucose and different nitrogen source for lactic acid production by *Lactobcillus delbrueckii*". **Enzyme and Microbial Technology**. 19 : 482 – 486.

A.O.A.C. 2000. **Official Method of Analysis of A.O.A.C. Internationa**l. 17th ed. A.O.A.C. International.The United States of America.

Altaf, MD., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Vijay, E., and Reddy, G. 2006. "Single step fermentation of starch to L(+)lactic acid by *Lactobcillus amylophilus* GV6 in SSF using

inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract-Optimization by RSM". **Process Biochemistry.** 41 : 465 – 472.

Barbirato, F., Chedaille, D. and Bories, A. 1997. "Propionic acid fermentation from glycerol : comparison with conventional substrates". **Applied Microbiology and Biotechnology.** 47 : 441 – 446.

Bogdanova, G.J. 1974. "New whole Products of improve quality (in Russian)". **Moscow. Pishcevaya Promishlenost.**

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.

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.

Crespo, J.P.S.G.1990. "Modeling of immobilized cell reactor for propionic acid fermentation". **Biotechnology and Bioengineering**. 36 : 705 – 716.

Daniel, R. 1995. **Microbial Physiology and Metabolism**. Wm.C. Brown Communication, Inc.

Dennis, J., Curtis,C. and William P.1990. "Biological production of acrylic acid from cheese whey by resting cells of *Closstridium rpopionicum*". **Biotechnology Progress**. 6 :237 – 242.

Dobois, M., Gill, K.A., Hamilton, J.K., Rebersand, P.A. and Smith, F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". **Analitical Chemistry**. 28 : 350-356.

Fitzpatrick, J.J. and O'Keeffe, U. 2001. "Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid". **Process Biochemistry**. 37 : 183 – 186.

Gebgardt, A.G., Kucheras, R.V., Laska, D.V. and Vogrin, A.G. 1970. "The interrelationship of nitrogen metabolism with the cabamide synthetic ability of *Propionibacterium shermanii*" . **Microbiology**. 39 : 380 – 384.

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

Gurr, M.J., Marshall, V.M. and Fuller, F. 1984. "Fermented milk". **Intestinal microflora and nutrition In Fermente Milk**. IDF Bulletin 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* ssp. *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.

Kadam, S., Patil, S., Bastawde, K., Khire, J. and Gokhale, V. 2006. " Strain improvement of *Lactobcillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production". **Process Biochemistry**. 41 : 120 – 126.

Kessler, H.G. 1981.**Food Engineering and Dairy Technology**. Verlag A. Kessien, Germany. 654 pp.

Kosikowski, F.V. 1977. **Cheese and fermented milk foods. Enwards Erothers**, Inc. Ann Arbor. Michigan : 701 pp.

Kurosawa, H.,Ishikawa, H. and Tanaka, H. 1988. "L- lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*". **Biotechnolog and Bioengineering** . 31 : 183 – 187.

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 propionbacteria-contribution of organic acids". **Journal of Food Microbiology.** 98 : 157 – 165.

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 *Lactobcillus delbrueckii* ssp. *lactic* DSM 20073". **Enzyme and Microbial Technology**. 39 : 861 – 867.

Marshall, K.R. 1982 . "Industrial isolation in developments in dairy chemistry". **Journal Applied Science.** 339 – 373.

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.

Menon, A. and Shemin, D. 1967. "Concurrent decrease of enzymic activities concerned with the synthesis of coenzyme B12 and of propionic acid in *Propionibacteria*". **Archricultural Biochemistry and Biophysiology**. 121 : 304 – 310.

Nielsen, E.W. and Ullum, J.A. 1989. **Dairy Technology**. Danish Turnkey Dairies Ltd., New York. 418 pp.

Ozadali, F., Glatz, B.A. and Glatz, C.E. 1996. "Fed-batch fermentation with and without on-line extraction for propionic and acetic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 44 : 710 – 716.

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**. 106 pp.

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

Quesada-Chanto, A., Afschar, A.S. and Wagner, F. 1994 . "Optimization of a *Propionbacterium acidipropionici* continous 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 treatments". **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.

Roukas, T. and Kotzekidou, P. 1998. "Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture". **Enzyme and Microbial Technology**. 22 : 199 – 204.

Schuppert, B., Schink, B. and Trosch, W. 1992. "Batch and continuous production of propionic

Acid from whey permeate by *Propionibacterium acidi-propionici* in a three-electrode amperometric culture system". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 37 : 549 – 553.

Scott, R. 1986.**Cheesemaking Practise**. Science Publishers, London. 529 pp.

Seshadri, N. and Mukhopadhyay, S.N. 1993. "Influence of environmental parameters on propionic acid upstream bioprocssing by *Propionibacterium acidipropionici*". **Journal of Biotechnology**. 29 : 321 – 328.

Shaposhrikow, V.N. and Vorob'eva, 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 St. 2005. "Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor". **Biotechnology and Bioengineering**. 91 : 325 – 337.

Thompson, R.C. 1943. "The B-vitamin requirement of the Propionibacteria". **Journal of Bacteriology**. 46 : 99 – 104.

Tittster, R.P. 1940. "The influence of hydrogen ion concentration up on the growth of Propionibacterium". **Journal of Bacteriology**. 39 : 95 – 96.

Tyree, R.W., Clausen, E.C. and Gaddy, J.L. 1991. "The production of propionic acid from sugars by fermentation through lactic acid as an intermediate". **Journal of Chemists Technology and Biotechnology**. 50 : 157 – 166.

Vandegraft, 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.

Webb, B.H.and Whitter, O.R. 1970. **Byproduct from milk**. 2nd. Edition. The AVI Publ. Co.Inc. Westprot, Connecticut : 428 pp.

Westerguard, V. 1983. **Milk Powder Technology Evaporations and Spray Drying**. A/S Niro-Atomizer, Copenhagen, Denmark. 147 pp.

Wood, H.G. and Werkman, C.H. 1940. "The relationship of bacterial utilization of CO_2 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". **Applied Environment Microbiology**. 57 : 281-288 .

Yang, S. and Huang, Y. 1995. "A noval 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://www.firehouse.com/mz/images/2003/9/12_organic3.gif

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

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

http://www.ratjes.nl/ lactose.html

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

www.funpecrp.com.br/.../images/gmr0075fig1.jpg

www. molgen.biol.rug.nl/.../images/llactis.jpg

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

1.1 อาหารเหลว MRS ประกอบด้วย

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

วิธีการ

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

1.2 อาหารแข็ง MRS ประกอบด้วย

meat extract	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม

ไตรแอมโมเนียมซิเตต (CH_3COONH_3)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . 4 H_2O$)	0.05	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

วิธีการ

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

1.3 อาหารแข็ง NA ประกอบด้วย

สารสกัดเนื้อ (beef extract)	3	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม

วิธีการ

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

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

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

วิธีการเตรียมน้ำเกลือร้อยละ 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 ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็ง
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน
6. นับจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร โดยดูณค่าเฉลี่ยนั้นด้วยระดับความเจือจางที่ตรวจนับ

2. การวิเคราะห์น้ำตาลแลคโตสโดยวิธี Dobois,1956

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. คิวเวตแก้ว
3. ปิเปต

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)
2. ฟีนอล 5%โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม

3. สารละลายแลคโตสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งแลคโตสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแลคโตสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

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

วิธีการ

1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายแลคโตสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1 มิลลิลิตร

2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆปล่อยลงที่ข้างหลอด

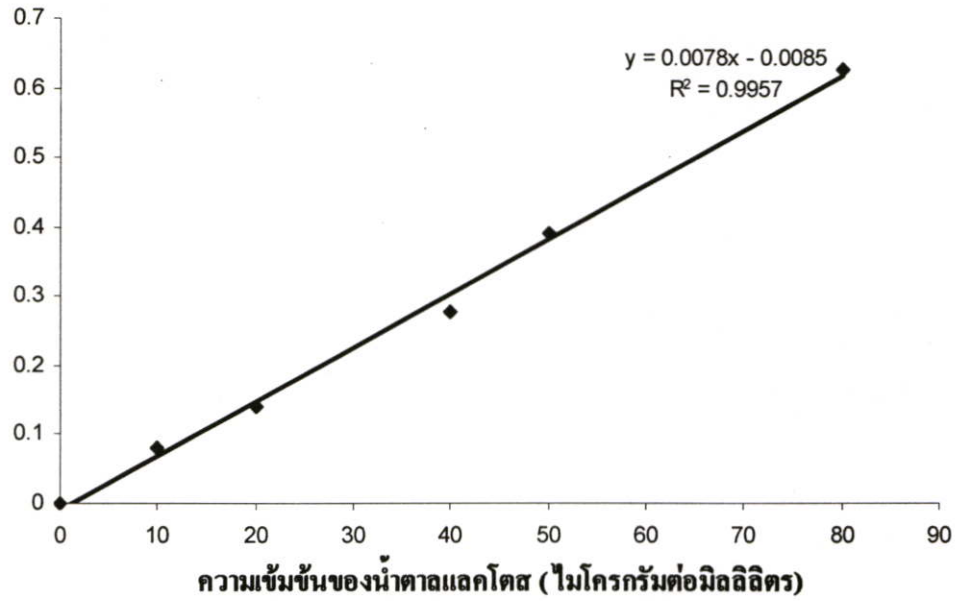
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ ข-1 เพื่อหาความเข้มข้นของแลคโตสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร



รูปที่ ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้น 0 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและกรดแลคติกด้วย HPLC

(Hight Performannce Liquid Chromatography)

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมภ์ Inertsil C8-3 โดยมีโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การเตรียมโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 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

เตรียมสารละลายกรดฟอสฟิวริก (H_3PO_4) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยปิเปตกรดฟอสฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 3.4 มิลลิลิตร ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

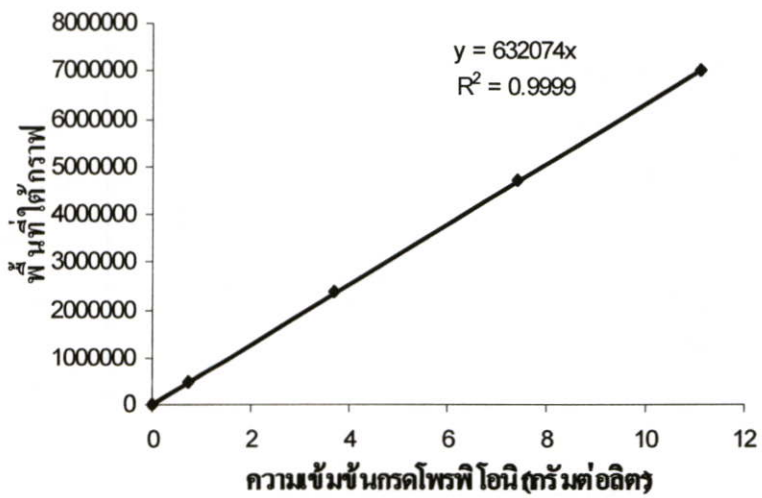
2. นำสารละลายมาตรฐานเข้มข้นโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ปรับพีเอชให้ได้พีเอช 3 ด้วยสารละลายมาตรฐานเข้มข้นกรดฟอสฟิวริก

การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดโพรพิโอนิก

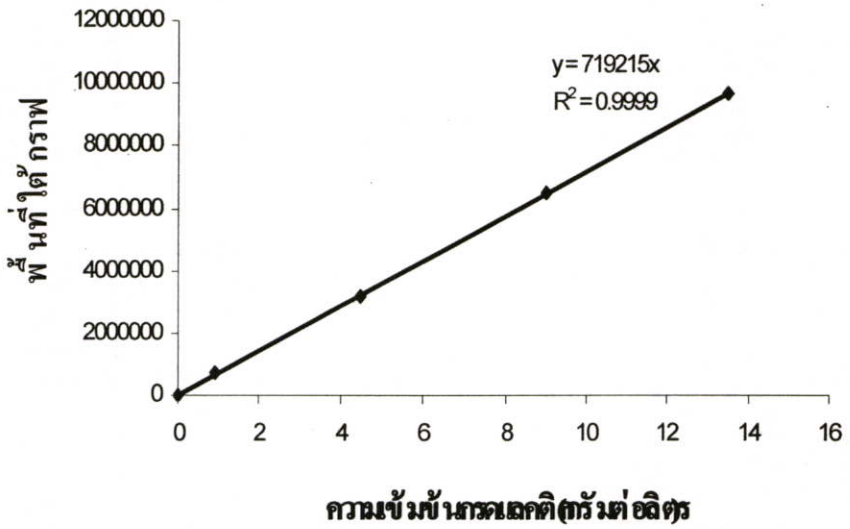
เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกด้วย HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดโพรพิโอนิก โดยคำนวณความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกมาตรฐานที่มีหน่วยมิลลิโมลาร์เป็นหน่วยกรัมต่อลิตร โดยกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ เมื่อเปลี่ยนหน่วยจะเท่ากับ 0.74, 3.70, 7.4 และ 11.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ ข-2

การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแลคติก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแลคติกความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์นำสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วย HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นกรดแลคติกโดยคำนวณความเข้มข้นของกรดแลคติกมาตรฐานที่มีหน่วยมิลลิโมลาร์เป็นหน่วยกรัมต่อลิตร โดยกรดแลคติกความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ เมื่อเปลี่ยนหน่วยจะเท่ากับ 0.9, 4.5, 9, 13.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ ข-3



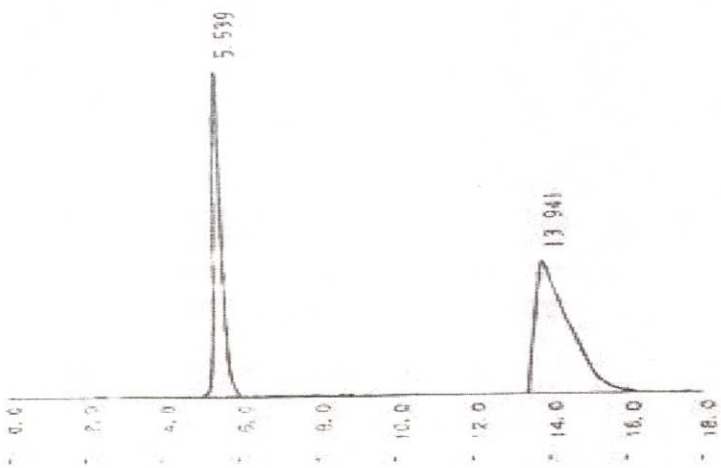
รูปที่ ข-2 แสดงกราฟมาตรฐานกรดโพรพิโอนิก



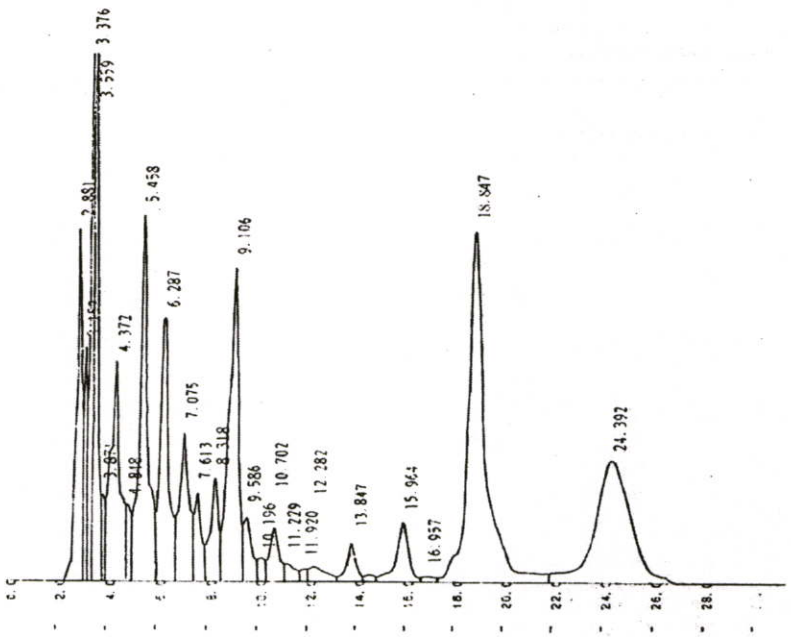
รูปที่ ข-3 แสดงกราฟมาตรฐานกรดแลคติก

ตัวอย่างโครมาโตแกรม

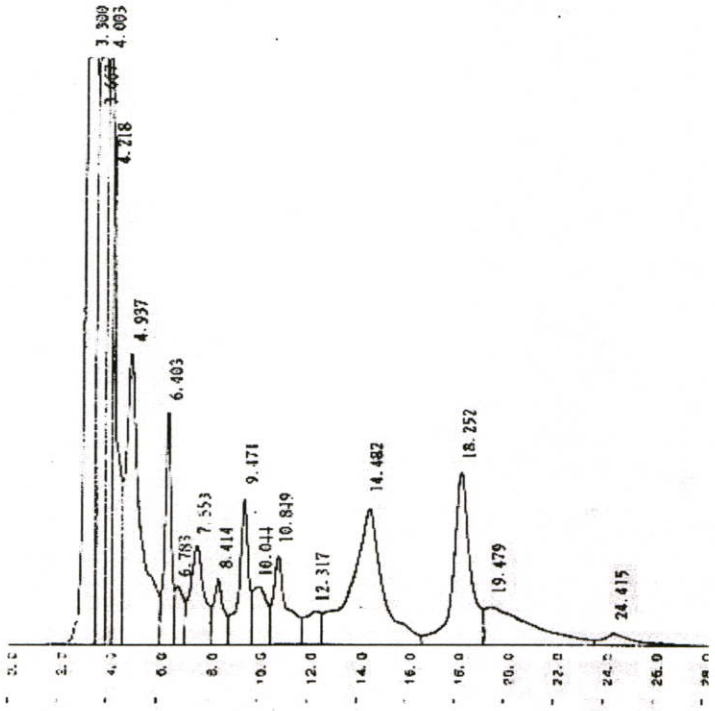
โครมาโตแกรมของสารมาตราฐานกรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก แสดงดังรูปข-4 แสดงให้เห็นเวลา retention time ของกรดทั้ง 2 ชนิด โดย retention time ของกรดแลคติก เท่ากับ 5.539 นาที และกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 13.941 นาที



รูปที่ ข-4 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก



รูปที่ ข-5 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่ทำการหมักโดยเชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมพีเอช6.5 ไม่พ่นอากาศ กวนด้วยอัตรา 150 รอบต่อนาที ในชั่วโมงที่ 72



รูปที่ ข-6 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่ทำการหมักโดยเชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมพีเอช6.5 ไม่พ่นอากาศ กวนด้วยอัตรา 150 รอบต่อนาที ในชั่วโมงที่ 168

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.617	3	1.872	4680.688	.000
Within Groups	.003	8	.000		
Total	5.620	11			

data

Duncan

		Subset for alpha = .05			
propionic	N	1	2	3	4
P5%+L10%	3	1.2400			
P10%+L10%	3		1.3400		
P10%+L5%	3			2.5200	
P5%+L5%	3				2.7700
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2. ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมหัวเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ผสมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.168	3	.723	1806.750	.000
Within Groups	.003	8	.000		
Total	2.171	11			

data

Duncan

propionic	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
48 hr.	3	1.6300			
24 hr.	3		2.2900		
12 hr.	3			2.5300	
0 hr.	3				2.7700
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

3. ผลการศึกษาอัตราการกวนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	163.161	4	40.790	1019.758	.000
Within Groups	.400	10	.040		
Total	163.561	14			

data

Duncan

propionic	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
200 rpm.	3	7.2100			
0 rpm.	3		12.5000		
50 rpm.	3			13.9200	
100 rpm.	3			14.2400	
150 rpm.	3				17.2700
Sig.		1.000	1.000	.078	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ
วัน เดือน ปี เกิด	8 มกราคม 2524
ภูมิลำเนา	กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ปีการศึกษา 2546
ที่อยู่ปัจจุบัน	100/473 ซ.10/2 ม.ชัยพฤกษ์1 ถ.คุ้มเกล้า เขตลาดกระบัง กทม. 10520