# รายงานการวิจัย

เรื่อง

การใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมในกากน้ำตาลเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

**Using Coconut Water Waste as a Nutrient Supplement to Molasses for Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965**


คณะผู้วิจัย

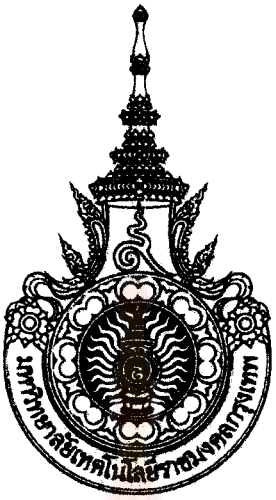
1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์กาญจนา ชินสำราญ
2. รองศาสตราจารย์สุขใจ ชูจันทร์
3. นางสาวฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ



โครงการวิจัยทุนสนับสนุนงานวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

งบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2554

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ



# รายงานการวิจัย

เรื่อง

## การใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมในกากน้ำตาลเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

## Using Coconut Water Waste as a Nutrient Supplement to Molasses for Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965


คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์กาญจนา ชินสำราญ
2. รองศาสตราจารย์สุขใจ ชูจันทร์
3. นางสาวฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ



โครงการวิจัยทุนสนับสนุนงานวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

งบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2554

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

# กิตติกรรมประกาศ

กิตติกรรมประกาศนี้จัดทำขึ้นเพื่อแสดงความขอบคุณต่อมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ ที่ให้ความสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ.2554 ในสาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ขอแสดงความขอบคุณผู้ร่วมโครงการวิจัย คือ รองศาสตราจารย์สุขใจ ชูจันทร์ นางสาวฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ และผู้ช่วยวิจัย นายสุริยะ ธูสรานนท์ ที่ร่วมกันทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือบางชนิดในการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้คำปรึกษาและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยเรื่องนี้ โดยเฉพาะอาจารย์ในสาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ และผู้ทรงคุณวุฒิจากสถาบันวิจัยและพัฒนาที่ช่วยพิจารณารายงานการวิจัยและให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงงานวิจัยให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผู้ช่วยศาสตราจารย์กาญจนา ชินสำราญ

หัวหน้าโครงการวิจัย

กันยายน 2555

**หัวข้องานวิจัย** การใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมในกากน้ำตาลเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

**นักวิจัย** ผู้ช่วยศาสตราจารย์กาญจนา ชินสำราญ
รองศาสตราจารย์สุขใจ ชูจันทร์
นางสาวฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ

**พ.ศ.** 2554

## บทคัดย่อ

การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้กากน้ำตาลและน้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริม พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลซึ่งมีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตรและใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลาย การเปรียบเทียบสารที่ทำให้เป็นกลางชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต ($K_2CO_3$) พบว่า แคลเซียมคาร์บอเนตให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้นสูงสุด เมื่อทำการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมและควบคุมพีเอชโดยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัมต่อลิตรร่วมกับใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงถึง 9.88 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตสูงสุด 0.063 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการเกษตร สามารถนำมาใช้เป็นซับสเตรตที่มีราคาถูกในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับห้องปฏิบัติการได้

คำสำคัญ : กรดโพรพิโอนิก *Propionibacterium acidipropionici* โมลาส น้ำมะพร้าว

**Research Title** The use of coconut water as a nutrient supplement in molasses for the production of propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965.

**Researcher** Assist. Prof. Kanjana Chinsamran

Assoc. Prof. Sukjai choojun

Miss Rutairat Suttisuwan

**Year** 2011

## Abstract

Propionic acid production from molasses with coconut water as a nutrient supplement by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 has been studied. The results showed that the suitable medium to produce propionic acid contained 40 g/l concentration of molasses, 10 g/l yeast extract and coconut water as a solvent. Among 3 neutralizing agents, calcium carbonate ($CaCO_3$), sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) and potassium carbonate ($K_2CO_3$), Calcium carbonate gave the highest propionic acid concentration. Production of propionic acid in a 5 liter fermentor using optimal medium and pH control (20 g/l $CaCO_3$ incombination with KOH) yielded 9.88 g/l of propionic acid with production rate 0.063 g/l/h. Therefore, this study proved that by-product from agricultural Industry can be used as cheap raw substrate for propionic acid production in laboratory scale fermentor.

Key words : Propionic acid, *Propionibacterium acidipropionici*, malasses, coconut water

# สารบัญเรื่อง

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... II
สารบัญเรื่อง ..... III
สารบัญตาราง ..... V
สารบัญภาพ ..... VI

บทที่ 1 บทนำ
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย ..... 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย ..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 3

บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม
2.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก ..... 4
2.2 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก ..... 6
2.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก ..... 10
2.4 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก ..... 12
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ..... 14
2.6 กากน้ำตาล ..... 19
2.7 น้ำมะพร้าว ..... 25

บทที่ 3 เนื้อหาการวิจัย
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย ..... 27
3.2 สารเคมีและวัสดุการเกษตร ..... 27
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ ..... 28

# สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

3.4 การศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ..... 29
3.5 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลายร่วมด้วย ..... 29
3.6 การศึกษาชนิดของสารที่ทำให้เป็นกลางที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ..... 30
3.7 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ..... 30
3.8 การวัดกรดโพรพิโอนิก ด้วยเครื่อง HPLC ..... 31
3.9 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ ..... 31

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์
4.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลในกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก ..... 32
4.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลายร่วมด้วย ..... 35
4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารที่ทำให้เป็นกลาง ..... 38
4.4 ผลการศึกษา การผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ..... 40

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ ..... 43
บรรณานุกรม ..... 44
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี ..... 50
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ ..... 52

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก ..... 5

2.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆที่เวลา 70 ชั่วโมง ..... 11

2.3 ปริมาณแร่ธาตุรองชนิดต่างๆ ในกากน้ำตาล ..... 21

2.4 ส่วนประกอบและปริมาณสารอาหารต่างๆ ของกากน้ำตาล ..... 21

2.5 ปริมาณวิตามินชนิดต่างๆ ในกากน้ำตาล ..... 21

2.6 ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าว ..... 26

4.1 การเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เมื่อใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ ..... 32

4.2 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลาย ..... 35

4.3 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการใช้สารที่ทำให้เป็นกลางชนิดต่างๆ ..... 38

4.4 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ..... 40

# สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก ..... 4
2.2 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของโซเดียมโพรพิโอเนต ..... 4
2.3 เชื้อ *Propionibacterium* sp. ..... 10
2.4 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสและแลคเตตโดยเชื้อ *Propionibacterium* ..... 12
2.5 การสร้าง ซัคซิเนต และ โพรพิโอเนต โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ..... 13
2.6 วิถีอะคริเลตของการสร้างโพรพิโอเนต ..... 14
2.7 กากน้ำตาล ..... 19
4.1 การเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เมื่อใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ ..... 33
4.2 การเปรียบเทียบค่าพีเอช การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณเซลล์มีชีวิตของการหมักกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 20, 30, 40, 50 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ..... 34
4.3 การเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิก ระหว่างชุดการทดลองต่างๆ ..... 36
4.4 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช(A) การลดลงของน้ำตาล (B) ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 (C) ที่เวลาต่างๆ ของแต่ละชุดการทดลอง .. 37
4.5 การเปรียบเทียบค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาของชุดการทดลองที่มีการใช้สารที่ทำให้เป็นกลางแต่ละชนิด ..... 38
4.6 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การลดลงของน้ำตาล ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965(C) ที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาของชุดการทดลองที่มีการใช้สารที่ทำให้เป็นกลางแต่ละชนิด ..... 39
4.7 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือและปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจากการศึกษาในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ในสภาวะต่างๆ ..... 42
ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้น 0 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ..... 53
ข-2 แสดงค่า Retention time ของกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก ..... 60
ข-3 โครมาโตแกรมของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ชั่วโมงเริ่มต้น ..... 60

# สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

ข-4 โครมาโตแกรมของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ชั่วโมง 566 ..... 61

ข-5 กราฟมาตรฐานของกรดโพรพิโอนิกที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆ..... 61

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ผลิตภัณฑ์อาหารเช่นอาหารสัตว์ ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ส่วนใหญ่จะเกิดการเน่าเสียเนื่องจากเชื้อราเป็นจำนวนมากในทุกๆปี การใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อราเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย แต่ในปัจจุบันมีข้อเรียกร้องจากผู้บริโภคในการใช้สารช่วยในการเก็บรักษาอาหารที่ปลอดภัยมากขึ้น จึงเป็นเหตุให้เกิดความสนใจในการใช้กรดอินทรีย์ ทั้งในรูปของกรดโดยตรงหรือเกลือของกรด มาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ โดยกรดโพรพิโอนิกก็เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่อยู่ในความสนใจ เนื่องจาก กรดโพรพิโอนิกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ประเภทราและแบคทีเรียบางชนิดได้ดีเป็นพิเศษ นอกจากนี้กรดโพรพิโอนิกยังสามารถใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้อย่างแพร่หลายเช่น ในทางการแพทย์ ใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นส่วนผสมในยาควบคุมการเต้นของหัวใจ ในด้านอุตสาหกรรมพลาสติก กรดโพรพิโอนิกถูกใช้ในรูปของสารละลาย เซลลูโลส-โพรพิโอเนต ในการขึ้นรูปพลาสติก แต่ในประเทศไทยยังไม่มีการผลิตกรดโพรพิโอนิกจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตเชิงพาณิชย์นิยมผลิตโดยกระบวนการทางเคมีเนื่องจากได้ผลผลิตสูงตามความต้องการและมีระยะเวลาในการผลิตเร็วกว่ากระบวนการทางชีวภาพ แต่กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้มีกระบวนการผลิตที่ก่อให้เกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อมในช่วงการทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เกิดสารที่เป็นอันตราย เช่น โพรพิโอนอลดีไฮด์ (Propionaldehyde) เมทิลโพรพิลคีโตน(methyl propylketone) ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการผลิตทางชีวภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกขึ้น เนื่องจากกระบวนการผลิตไม่ทำให้เกิดสารที่เป็นอันตราย ค่าใช้จ่ายในการผลิตไม่สูง โดยการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยกระบวนการทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium* ในการผลิต

การผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพมีข้อจำกัด คือ ในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์จะมีปริมาณที่น้อย เช่น การหมักแบบกะ (batch fermentation) สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียงร้อยละ 1-3 ซึ่งใช้เวลาในการหมัก 7-14 วัน (Schuppert และคณะ, 1992) จึงได้มีการคิดหาวิธีเพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีต่างๆ เช่น การใช้การตรึงเซลล์ (Yang และคณะ, 1994 ; Suwannakham และYang, 2005) การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) (Martinez-Campos และ Torre, 2002) การใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) และการคัดเลือกอาหารที่

เหมาะสมกับการผลิตกรดโพรพิโอนิก (Quesada-Chanto และคณะ, 1994) งานวิจัยนี้เป็นแนวทางในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตโดยใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิต

กากน้ำตาลเป็นผลผลิตพลอยได้จากการผลิตน้ำตาล ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบราคาถูกและเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ปัจจุบันมีการนำกากน้ำตาลใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ทำปุ๋ย ใช้ในอุตสาหกรรมกระบวนการหมัก เช่น กรดน้ำส้ม กรดแลคติก แต่เมื่อนำกากน้ำตาลมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่า ได้ผลผลิตที่ไม่ดีนัก ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ใช้กากน้ำตาลซึ่งมีการเติมน้ำมะพร้าวเป็นตัวเสริมแร่ธาตุให้กับกระบวนการหมักมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อเพิ่มผลผลิต ซึ่งเป็นอีกแนวทางเลือกในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากวัตถุดิบเหลือใช้เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าทางการเกษตรอีกทางหนึ่ง

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมในกากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

1.2.2 ศึกษาชนิดของสารที่ทำให้เป็นกลางในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

1.2.3 ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมในกากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ขั้นแรกทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลในกากน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก จากนั้นทดลองใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลายในขั้นตอนการเตรียมกากน้ำตาลเพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิก ศึกษาชนิดของสารที่ทำให้เป็นกลางในการเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น ขั้นสุดท้ายศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร และทำการวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ตลอดการทดลอง

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงแนวทางการเพิ่มผลผลิตของการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริม

1.4.2 เป็นการเพิ่มมูลค่าของกากน้ำตาลที่เป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการเกษตรมาใช้เพื่อลดต้นทุนในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

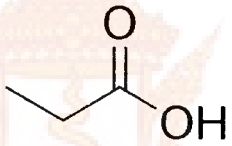
1.4.3 เป็นแนวทางในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

# บทที่ 2

## การทบทวนวรรณกรรม

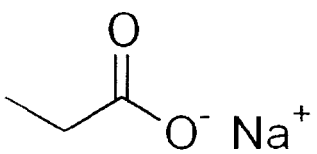
### 2.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกจัดเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ได้จากการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต โดยแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทเชื้อรา นอกจากนี้ยังพบกรดโพรพิโอนิกตามธรรมชาติได้ในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ในเหงื่อของคน และในอาหารประเภทหมักดอง เป็นต้น กรดโพรพิโอนิกมีสูตรโมเลกุลคือ $CH_3CH_2COOH$ สูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก แสดงดังตารางที่ 2.1




ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่ไม่แตกตัว มีประโยชน์ในการทำลายจุลินทรีย์โดยไปละลายสารภายในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีการตั้งสมมติฐานว่ากรดโพรพิโอนิกสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยไปรบกวนการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ ส่งผลให้สภาพภายในเซลล์มีความเป็นกรดมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ช่วยในการยับยั้งการเจริญและทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของกรดโพรพิโอนิกที่ทำให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 3.4 ถึง 4.5 โดยที่พีเอช 4 จะมีโมเลกุลของกรดและเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 88 ในขณะที่พีเอช 6 จะมีโมเลกุลของกรดและเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 6.7 ซึ่งกรดที่ไม่แตกตัวนี้ทำให้เกิดการยับยั้งการใช้อาหารของจุลินทรีย์ อีกทั้งกรดโพรพิโอนิกจะมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นเมื่อมีแอนไอออนไปรบกวนการแตกตัวของกรดโพรพิโอนิก กรดโพรพิโอนิกที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะอยู่ในรูปของเกลือ ได้แก่ เกลือโซเดียม แคลเซียม และโพแทสเซียม (ศิวาพร, 2546) สูตรโครงสร้างโมเลกุลของโซเดียมโพรพิโอเนต แสดงดังภาพที่ 2.2




ภาพที่ 2.2 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของโซเดียมโพรพิโอเนต

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก

| คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ | กรดโพรพิโอนิก |
|---|---|
| น้ำหนักโมเลกุล | 74.08 |
| แฟคเตอร์แปลงหน่วย (Conversion factor) | 1 พีพีเอ็มเท่ากับ 3.03 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตรหรือ 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตรเท่ากับ 0.33 พีพีเอ็ม ที่ 25 องศาเซลเซียส |
| จุดหลอมเหลว | -21 องศาเซลเซียส |
| จุดเดือด | 141 องศาสเซลเซียส |
| ความหนาแน่นไอ | 2.56 |
| ความสามารถในการละลาย | สามารถละลายน้ำได้ |
| ค่าพีเอช | 2.5 ที่ 20 องศาเซลเซียส |
| ความถ่วงจำเพาะ | 0.99 |
| ความหนืด | 2.4 ที่ 20 องศาเซลเซียส |
| การละลายในสารละลาย | ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ |
| จุดวาบไฟ | 52 องศาเซลเซียส |
| จุดลุกติดไฟได้เอง | 495 องศาเซลเซียส |
| อัตราการระเหย | ไม่ระเหย |
| ความคงตัว | มีความคงตัว |
| สภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง | ความร้อน เปลวไฟและแหล่งจุดไฟ |
| สารที่เข้ากันไม่ได้ | เบสเข้มข้น เออมีน สารประกอบฮาโลเจนเข้มข้น สารออกซิไดส์อย่างแรง โลหะ สารรีดิวซ์อย่างแรง |

ที่มา : ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์ (มปป)

กรดโพรพิโอนิกมีความปลอดภัยในการใช้ในอาหาร จึงไม่ได้กำหนดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในอาหารบางประเภทซึ่งกำหนดความเข้มข้นสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ ดังนี้ ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งให้ใช้ได้ในปริมาณสูงสุดไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 1 กิโลกรัม (ศิวาพร, 2546) สำหรับผลิตภัณฑ์ประเภทขนมปัง ให้ใช้ได้ในปริมาณสูงสุดไม่เกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 1 กิโลกรัม (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2527 ฉบับที่ 84 เรื่องวัตถุเจือปนในอาหาร) นอกจากนี้มีรายงานการใช้กรดโพรพิโอนิกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนี้

Vandegraft และคณะ (1975) รายงานการใช้กรดโพรพิโอนิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 กับเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 28 พบว่า ตลอดการทดลอง 29 สัปดาห์ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* กับ *Aspergillus ochraceus* และไม่พบสารอะฟลาทอกซิน $B_1$ กับสารโอคราทอกซินเลย

Buchanan และ Ayres (1976) รายงานว่าการใช้กรดโพรพิโอนิกเข้มข้น 0.1 กรัมต่อ100ลิตรของอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อซึ่งมีพีเอช 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. parasiticus* และการสร้างอะฟลาทอกซินได้บางส่วน แต่ถ้าเพิ่มเป็น 0.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการสร้างอะฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 7 วัน

Racker และคณะ (1992) รายงานว่ากรดโพรพิโอนิกร้อยละ0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 26.8 และ 29.6 ได้ตลอดการทดลอง 42 สัปดาห์

Filya และคณะ (2004) รายงานว่าการใช้ *P. acidipropionici* เพียงชนิดเดียวหรือผสมร่วมกันกับ *Lactobacillus plantarum* จะมีผลต่อกระบวนการหมักและสภาวะการให้อากาศของข้าวสาลี ข้าวฟ่าง และข้าวโพด ซึ่งเป็นอาหารสัตว์ พบว่า การใช้เชื้อ *P. acidipropionici* เพียงชนิดเดียวจะมีการสร้างกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติกในระดับที่สูงกว่าการใช้เชื้อ *L. plantarum* เพียงชนิดเดียวและเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* กับ *L. plantarum* จะเป็นผลดีต่อการยับยั้งกิจกรรมของยีสต์ที่มีต่อข้าวสาลี ข้าวฟ่าง และข้าวโพดในอาหารสัตว์

## 2.2 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ 2 วิธี

### 2.2.1 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี

ในปัจจุบันการผลิตกรดโพรพิโอนิกในเชิงพาณิชย์นิยมใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากใช้เวลาในการผลิตสั้นและได้ผลผลิตตามต้องการ โดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของโพรพิโอนอลดีไฮด์ที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียส ดังสมการที่ (1) และ (2)

$$\underset{\text{คาร์บอนโมโนออกไซด์}}{CO} + \underset{\text{ไฮโดรเจน}}{H_2} + \underset{\text{เอทีลีน}}{C_2H_4} \longrightarrow \underset{\text{โพรพิโอนอลดีไฮด์}}{CH_3CH_2CHO} \qquad (1)$$

$$\underset{\text{โพรพิโอนอลดีไฮด์}}{CH_3CH_2CHO} + \underset{\text{ออกซิเจน}}{1/2O_2} \longrightarrow \underset{\text{กรดโพรพิโอนิก}}{CH_3CH_2COOH} \qquad (2)$$

### 2.2.2 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล

*Propionibacterium* อย่างไรก็ดาม วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากผลผลิตที่ได้มีปริมาณน้อยโดยมีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องดังนี้

Woskow และ Glatz (1991) รายงานผลการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคโตสจากหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P9 และ 200910 หมักแบบกะและหมักแบบกึ่งกะ พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ 200910 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกปริมาณ 47 กรัมต่อลิตร สูงกว่าผลผลิตที่ได้จากสายพันธุ์ P9 และให้ผลผลิตกรดสูงสุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ

Quesada-chanto และคณะ (1994) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *P. acidipropionici* ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกและวิตามินบี 12 จากซูโครส พบว่าปริมาณของ $FeSo_4.7H_2O$ 1.5 มิลลิกรัม ธาตุโคบอลต์ 0.75 มิลลิลิตร และ 5,6 ไดเมททิลเบนซิมิดสโซล 0.3 มิลลิกรัม เป็นปริมาณแร่ธาตุที่จำเป็นนอกเหนือจากแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของซูโครสที่ปริมาณ 30 ถึง 170 กรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลให้เกิดการยับยั้งจากซับสเตรตและสำหรับการผลิตเพื่อให้ได้กรดโพรพิโอนิกนั้นต้องทำในสภาวะที่ไม่มีอากาศที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนการผลิตวิตามินบี 12 ต้องทำในสภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.5

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก ได้แก่กลูโคส และแลคเตดจาก corn steep liquor (CSL) โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P9 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและเชื้ออิสระในสภาพการหมักแบบกะ แบบกึ่งกะ และแบบต่อเนื่อง พบว่าการหมักแบบกะจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดในเวลา 36 ชั่วโมง การใช้แลคเตดเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าการใช้กลูโคส ส่วนการหมักแบบกึ่งกะจะใช้เวลาหมักนาน 250 ชั่วโมง ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ได้จากการใช้กลูโคสเท่ากับ 57 กรัมต่อลิตร สูงกว่าการใช้แลคเตดที่ได้ผลผลิตกรด 45.6 กรัมต่อลิตร และในสภาพการหมักทั้งแบบกะและแบบต่อเนื่อง เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าเซลล์อิสระ

Ramsay และคณะ (1998) ศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพเพื่อเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสเป็นกรดโพรพิโอนิก ในการศึกษาใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ส่วนที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 60 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 2.5 กรัมต่อลิตร การเกิดกรดจะเกิดควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของเชื้อ มีอัตราการเจริญจำเพาะคือ 0.1 ต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Ricker และคณะ (1980) ศึกษาการตรึงเซลล์ *P.thoenii* สายพันธุ์ P 20 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกในสภาพการหมักแบบกะ ใช้กลูโคสและแลคเตตเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ปริมาณกลูโคสเท่ากับ 75 กรัมต่อลิตร และแลคเตต 42 กรัมต่อลิตรจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่ 34 กรัมต่อลิตร และ 22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีอัตราการใช้กลูโคสและการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่พีเอช 6.0 แต่ผลผลิตที่ได้สูงสุดเมื่อควบคุมพีเอชเท่ากับ 7.0

Himmi และคณะ (2000) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* และ *P.freudenreichii spp.shermanii* พบว่า เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด โดย *P.acidipropionici* มีความสามารถใช้สารตั้งต้นได้เร็วกว่า คือ 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดสูงกว่า คือ 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อมีการผลิตกรดอะซิติก ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตกรดโพรพิโอนิกในปริมาณเพิ่มขึ้น โดยปริมาณของกรดอะซิติกที่ได้จะมากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 2 เท่า ส่วนเชื้อ *P.freudenreichii* เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการใช้กลีเซอรอลกับการสร้างผลผลิต จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *P. acidipropionici*

Martinez - Campos และ Torre (2002) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *P.acidipropionici* ในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ มีการเติมกลูโคสและแลคเตต ซึ่งกลูโคสและแลคเตตจะถูกใช้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การใช้กลูโคสและแลคเตตร่วมกันจะเพิ่มอัตราการผลิตโพรพิโอนิกต่ออะซิเตต (P/A) และยังเป็นการเพิ่มส่วนของธาตุคาร์บอนสำหรับที่จะนำไปใช้ในการผลิตชีวมวล ผลผลิตของโพรพิโอเนตต่ออะซีเตตเท่ากับ 7.6 เมื่อใช้แลคเตตและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์ อัตราส่วนโพรพิโอเนตต่ออะซีเตตเท่ากับ 1.34 เมื่อใช้แลคเตตอย่างเดียว และ 1.85 เมื่อใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียว

Suwannakham และ Yang (2005) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *P. acidipropionici* ATCC 4875 เปรียบเทียบระหว่างการใช้เซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงในถังหมักแบบ fibrous bed ให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 71.8 ± 0.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระถึงร้อยละ 20-59

วรัญญา (2550) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ของเชื้อ *P.freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงในน้ำล้างซากไก่ พบว่า มีการผลิตกรดโพรพิโอนิกออกมานอกเซลล์ (1.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่าในเซลล์ (1.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ปริมาณกรดโพรพิโอนิกผลิตได้ในอาหาร complete medium น้ำล้างซากไก่ที่เติม

ธาตุอาหาร น้ำล้างซากไก่ที่รวมกับอาหาร complete medium ในปริมาณที่เท่ากัน และในน้ำล้างซากไก่ มีค่าเท่ากับ 1.89 1.52 1.47 และ 0.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

ฤทัยรัตน์ (2550) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากหางนมโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4865 ร่วมกับเชื้อ *Lactococus lactis* TISTR 1401 พบว่า ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 5 และหัวเชื้อ *Lactococus lactis* ปริมาณร้อยละ 5 โดยการเติมหัวเชื้อทั้ง 2 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกันเมื่อเริ่มทำการทดลอง เมื่อทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่ต้องพ่นอากาศ ใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาทีได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากที่สุดคือ 17.27 กรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการหมัก 168 ชั่วโมง ได้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.443 กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.103 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก $2.90 \times 10^{7}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น $3.50 \times 10^{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

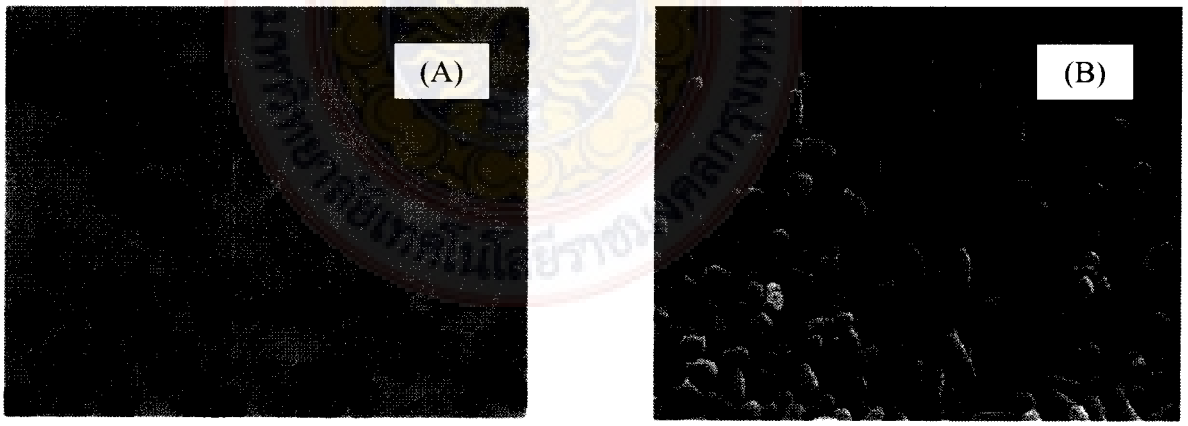
สุรนารถ (2550) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุดคือ เวย์เติมยีสต์สกัดปริมาณร้อยละ 1 แคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณร้อยละ 1 และแหล่งแร่ธาตุ ซึ่งประกอบด้วย $K_2HPO_4$ 0.25 กรัมต่อลิตร $MnSO_4.4H_2O$ 0.05 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร ทำการหมักด้วยถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชที่ 6.5 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณ 15.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 300 ได้ค่าผลผลิตกรดโพรพิโอนิก และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.39 และ 3.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ทดสอบการยับยั้งเชื้อราเปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายด้วยวิธีทางเคมีพบว่า กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยวิธีทางชีวภาพมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้เช่นเดียวกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี

พรวิสาข์ (2551) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้หางนมเป็นซับสเตรต พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีหางนมเป็นส่วนประกอบหลัก เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในถังหมัก 2 ลิตรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 216 ชั่วโมงสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 15.16 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อใช้การตรึงเซลล์ที่มีการควบคุมระยะทางจากปลายสายยางที่ปล่อยสารสารละลายเจลจนถึงผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ในการขึ้นรูปเม็ดเจล ในระยะ 4 ถึง 6 เซนติเมตร ควบคุมอัตราการไหลของเม็ดเจล 7 มิลลิเมตรต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตกรด

โพรพิโอนิกที่ได้ สามารถหมักกรดโพรพิโอนิกได้ 2 รอบการหมัก ให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกรวม 29.24 กรัมต่อลิตร (ปริมาณกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 15.85 และ 13.39 กรัมต่อลิตร ในการหมักรอบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) มากกว่าเซลล์อิสระที่ระยะเวลา 216 ชั่วโมงเท่ากัน

**2.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก**

แบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกจัดอยู่ในสกุล *Propionibacterium* เรียกว่าเป็น Propionic - acid bacteria (Quesada-Chanto, 1994) พบครั้งแรกโดยแยกได้จากเนยสวิส ซึ่งในกระบวนการหมักจะใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ทำให้เกิดลักษณะรูพรุนในเนื้อเนยแข็ง จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างหลายแบบได้แก่ รูปร่างกลม ท่อนยาว มีการเจริญแบบแฟคัลเททีฟแอนแอโรบ (facultative anaerobe) อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิก ซัคซินิก อะซีติก และคาร์บอนไดออกไซด์ จากการหมัก เจริญเติบโตช้า แบคทีเรียประเภทนี้มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม โดยกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ *Propionibacterium freudenreichii, P.cyclohexanicum, P. acidpropionici, P. jensenii* และ *P. coccoides* ซึ่งกลุ่มนี้ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็ง การผลิตวิตามินบี 12 การผลิตกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น ลักษณะของเชื้อ *Propionibacterium* แสดงดังภาพที่ 2.3 และข้อมูลการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.2




ภาพที่ 2.3 เชื้อ *Propionibacterium* sp.

(A) การย้อมติดสีแกรมบวกของเชื้อ *Propionibacterium* sp.

(B) เชื้อ *Propionibacterium* sp.ที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ตารางที่ 2.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆที่เวลา 70 ชั่วโมง

| Species | Strain reference | Propionic acid (70 h) กรัมต่อลิตร | pH |
|---|---|---|---|
| *P. acidipropionic* | 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 4870 | 8.0 | 4.62 |
| *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 |
| *P. jensenii* | ATCC 4870 | 0.0 | 5.82 |
| | CNRZ 87 | 2.0 | 5.10 |
| | ATCC 4867 | 0.0 | 5.10 |
| | CNRZ 731 | 0.0 | 4.11 |

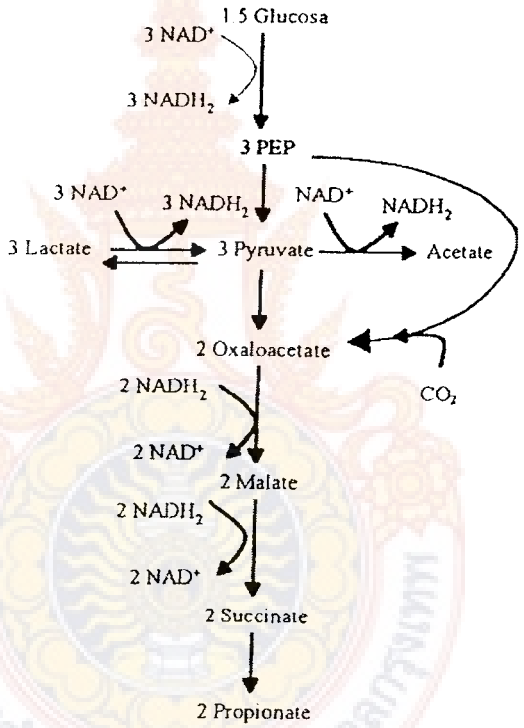
ที่มา : Colomban และคณะ (1993)

## 2.4 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก

การผลิตกรดโพรพิโอนิกสามารถเกิดขึ้นได้หลายวิถีด้วยกันโดยคาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ถูกใช้ไปในการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลผลิตโดยเชื้อ *Propionibacterium*

### 2.4.1 การสร้างกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสและแลคเตต

โดยเริ่มจากสารตัวกลางที่สำคัญคือ ไพรูเวท ออกซาโลอะซิเตต และซัคซิเนต ตามลำดับที่ได้มาจากกลูโคสหรือ แลคเตต (Papoutsakis และ Meyer, 1985) ดังภาพที่ 2.4

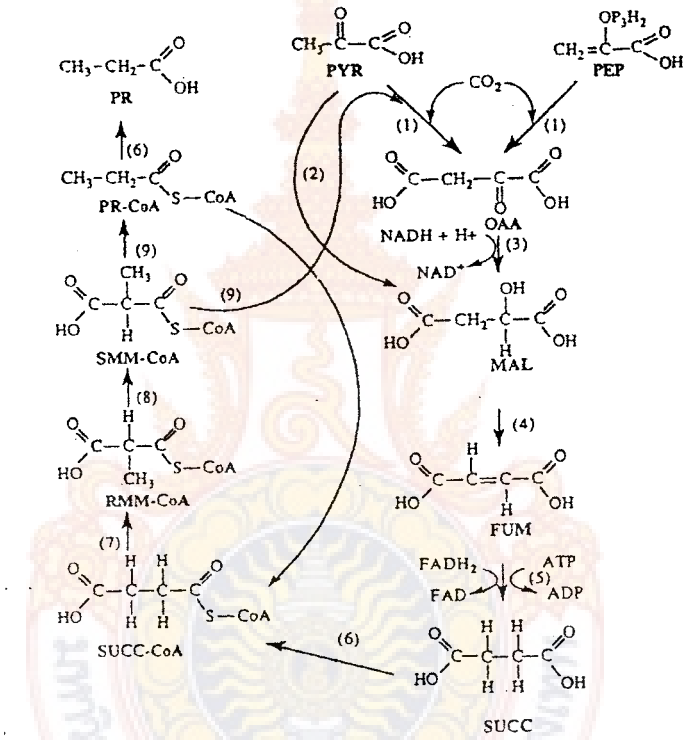



ภาพที่ 2.4 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสและแลคเตตโดยเชื้อ *Propionibacterium* ที่มา : Papoutsakis และ Meyer (1985)

### 2.4.2 การเปลี่ยนไพรูเวทเป็นซัคซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

การสร้างจะเริ่มต้นจากการสร้างออกซาโลอะซิเตตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้กับไพรูเวท หรือให้กับฟอสโฟอีนอลไพรูเวท และถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอล-มาเลตโดยการทำงานของเอนไซม์มาลิกดีไฮโดรจิเนส เกิดเป็นกรดมาลิก โดยกรดมาลิกที่ได้จะถูกดึงน้ำออกโดยเอนไซม์ฟูมาเรสทำให้ได้กรดฟูมาริก (ปฏิกิริยานี้ผันกลับได้) จากนั้นฟูมาริกจะถูกเปลี่ยนให้เป็นซัคซิเนตโดยเอนไซม์ฟูมาเรตรีดักเตส ซัคซิเนตเป็นตัวกลางในกระบวนการ โดยซัคซิเนตจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โคเอทรานเฟอเรส ได้ซัคซินิลโคเอ ซัคซินิลโคเอจะเปลี่ยนไปเป็นอาร์-เมททิลมาโลนิลโคเอ โดย

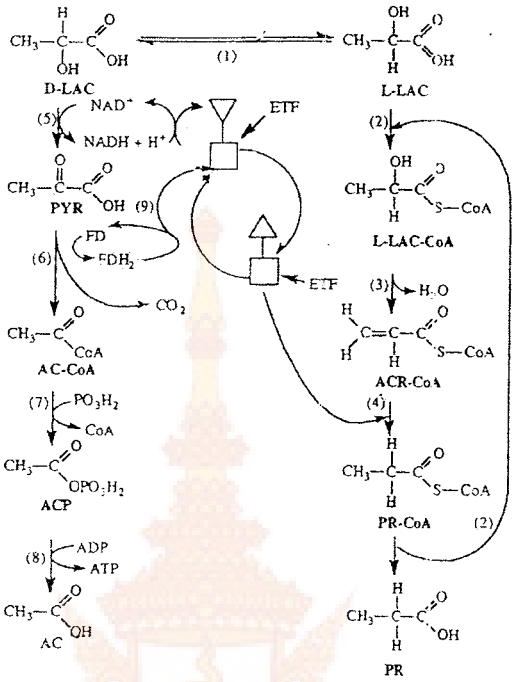
เอนไซม์อาร์-เมททิลมาโลนิลมิวเตส หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนอาร์-เมททิลมาโลนิลโคเอไปเป็นเอส-เมททิลมาโลนิลโคเอ คาร์บอนของเอส-เมททิลมาโลนิลโคเอจะถูกย้ายออกไปรวมกับไพรูเวท ทำให้เกิดการสร้างออกซาโลอะซิเตต เมื่อคาร์บอนเคลื่อนย้ายออกไปจะทำให้ได้โพรพิโอนิลโคเอ หลังจากนั้นโคเอจะถูกย้ายออกจากโมเลกุลเพื่อนำไปใช้กับซัคซินิกตัวต่อไป และทำให้ได้กรดโพรพิโอนิก ดังแสดงในภาพที่ 2.5




ภาพที่ 2.5 การสร้าง ซัคซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์
ที่มา : Daniel (1995)

**2.4.3 วิถีอะครีเลต (acrylate) ของการสร้างโพรพิโอเนต**

กรดโพรพิโอนิกจะถูกสร้างขึ้นตามลำดับโดยเริ่มต้นจากการเปลี่ยนรูปของแอล-แลคเตตไปเป็นแอล-แลคติลโคเอโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์โคเอทรานเฟอเรส แอล-แลคติลโคเอจะเปลี่ยนรูปกลายไปเป็นอะซิติลโคเอโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีไฮดราเทสอะเซติลโคเอ อะเซติลโคเอจะเปลี่ยนไปเป็นโพรพิโอนิลโคเอ โดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของฟลาโวโปรตีน โพรพิโอนิลโคเอจะย้ายโมเลกุลโคเอไปสู่แอล-แลคเตตเพื่อสร้างแอล-แลคติลโคเอ และเกิดเป็นกรดโพรพิโอนิกอิสระ การสร้างอะซิเตต และคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดควบคู่กับการสร้างโพรพิโอเนต ดังภาพที่ 2.6




ภาพที่ 2.6 วิถีอะคริเลตของการสร้างโพรพิโอเนต

ที่มา : Daniel (1995)

## 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

### 2.5.1 แหล่งคาร์บอน

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

แบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก ดังสมการ

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

(กลูโคส) (กรดโพรพิโอนิก) (กรดอะซิติก)

แบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* ยังสามารถเปลี่ยนกรดแลคติกไปเป็นกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติกดังสมการ

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

(กรดแลคติก) (กรดโพรพิโอนิก) (กรดอะซิติก)

Lewis และ Yang (1992(a)) ศึกษาผลของซับสเตรตที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 ที่ถูกตรึง ซับสเตรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนประกอบด้วย แลคโตส กลูโคส และแลคเตต ในการหมักเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นเท่ากัน พบว่า แลคเตตจะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่สูงกว่าแหล่งคาร์บอนอื่นๆ

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาการเปลี่ยนน้ำตาลหรือกากน้ำตาลไปเป็นกรดโพรพิโอนิกของ *P. acidipropionici* ในกระบวนการหมักแบบกะที่อัตราการเจือจาง 0.1 ต่อชั่วโมงได้กรดโพรพิโอนิก 30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิต 0.36 – 0.45 กรัมกรดโพรพิโอนิกต่อกรัมซูโครส และคิดเป็นอัตราการเกิดผลผลิตได้ 3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในการศึกษาความคงตัวของเซลล์ที่ถูกตรึงโดยทำการหมักแบบกะใช้ *Propionibacterium acidipropionici* P200910 พบว่า การผลิตกรดโพรพิโอนิกในรอบที่ 10 จะมีค่าร้อยละ 50 - 70 ของรอบที่หนึ่งโดยใช้อาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

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

Yang และ Huang (1995) ทดลองทำการหมักแบบ recycle batch จากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกจะได้ร้อยละ 90 ของผลผลิตทางทฤษฎี

Barbirato และคณะ (1997) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับกลูโคสและกรดแลคติก โดยใช้เชื้อ 3 สายพันธุ์ คือ *Propionibacterium acidipropionici* *Propionibacterium acnes* และ *Clostridium popionicium* ทำการหมักแบบกะใช้กลีเซอรอลเป็นซับสเตรตเริ่มต้นปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ผลผลิตส่วนใหญ่ที่ได้ คือกรดโพรพิโอนิก (0.844 โมลต่อโมล) และได้ผลิตผลพลอยได้ คือกรดซัคซินิก (0.055โมลต่อโมล) กรดอะซิติก (0.023โมลต่อโมล) กรดฟอร์มิก (0.020โมลต่อโมล) และ n-propanol (0.036โมลต่อโมล) พบว่า เมื่อใช้กลูโคสและกรดแลคติกเป็นซับสเตรตจะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกต่ำ คือร้อยละ 17 และร้อยละ 13 ตามลำดับซึ่งจะต่ำกว่าใช้กลีเซอรอลเป็นซับสเตรต นอกจากนี้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นจะส่งผลให้อัตราการผลิตกรดสูงขึ้น (0.36 กรัมต่อลิตรชั่วโมง) และได้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกคือ 42 กรัมต่อลิตร

Himmi และคณะ (2000) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลและกลูโคสโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* และ *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* ทำการหมักแบบกะในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ได้กรดโพรพิโอนิกเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ และได้ผลิตผล

พลอยได้ คือ กรดอะซิติก กรดซัคซินิก และ n-propanol

**2.5.2 แหล่งไนโตรเจน**

สมใจ (2537) ทดลองศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium* sp. Arl AKU 1251 พบว่ายีสต์สกัดมีผลต่อการเจริญของเชื้อมากโดยในอาหารสังเคราะห์ที่ขาดยีสต์สกัด เชื้อจะเจริญได้น้อยในขณะที่ขาด pancreatic digest of casein หรือ acid hydrolysate of casein เชื้อยังคงมีอัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์

Prescott และ Dunn (1959) พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่ออัตราการหมักและอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติก *Propionibacterium shermanii* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด ยีสต์สกัด เนื้อสัตว์ แต่ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

Colomban และคณะ (1993) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยใช้แหล่งไนโตรเจนดังนี้ ยีสต์สกัด ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด โปรตีนเวย์เข้มข้น พบว่า เมื่อใช้ยีสต์สกัดผลิตกรดโพรพิโอนิกจะได้ปริมาณสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ

Yang และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในเวย์ โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ คือยีสต์สกัด และทริปทิเคสซอยบรอท พบว่า จะได้ปริมาณกรดสูงสุดเมื่อใช้ ยีสต์สกัด และทริปทิเคสซอยบรอทเติมลงไปในเวย์ปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

Yang และ Huang (1995) ศึกษาการหมักแบบกะของ *Propionibacterium acidipropionici* พบว่าเมื่อเพิ่มยีสต์สกัดร้อยละ 1 ลงในอาหารจะได้อัตราการผลิต 0.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าอาหารที่ไม่เติมยีสต์สกัด

**2.5.3 แหล่งเกลือแร่**

Gebgardt และคณะ (1970) ศึกษาพบว่าโคบอลท์มีอิทธิพลต่อการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโคบอลท์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเชื้อ *Propionibacterium shermanii* ร้อยละ 55 - 60 ของน้ำหนักแห้ง แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโคบอลท์การเจริญของเชื้อจะลดลง

Quesada–Chanto และคณะ (1994) พบว่า เหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญของ *Propionibacterium shermanii* โดยเมื่อเติม $FeSO_4.7H_2O$ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารจะเป็นความเข้มข้นปริมาณที่เหมาะสมในการเจริญ

**2.5.4 แหล่งวิตามิน**

Thompson (1943) ทดลองศึกษาพบว่า กรดแพนโททินิกและไบโอติน เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของ *Propionibacterium shermanii* และ *Propionibacterium jensenii*

**2.5.5 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)**

แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารที่ช่วยรักษาค่าพีเอช (บัฟเฟอร์) โดยแคลเซียมคาร์บอเนตเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดโพรพิโอนิกจะได้เกลือแคลเซียมโพรพิโอเนตและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นผลช่วยลดปฏิกิริยาการยับยั้งเชื้อโดยกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นยังมีผลช่วยให้เกิดสภาวะไม่มีอากาศให้สมบูรณ์มากขึ้น (Altaf และคณะ, 2006) ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกยังไม่มีการรายงานการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต แต่ในการผลิตกรดแลคติกได้มีรายงานการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตอย่างแพร่หลาย

Kurosawa และคณะ (1988) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus awamori* ร่วมกับ *Streptococcus lactis* ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสูตรอาหารที่ทำการหมักเติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเป็น 5 ทำการกวนด้วยอัตรา 150 – 190 รอบต่อนาที ได้ผลผลิตกรดสูง 50 กรัมต่อลิตร

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* เติมกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในเวย์ ทำการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง สูตรอาหารมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อใช้กลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัดปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ทำการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่าง cane sugar ร้อยละ 10 กับยีสต์สกัดร้อยละ 1 เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 5 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส พีเอช 7 กวนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่า การหมักด้วย cane sugar ได้ผลผลิตกรดสูงสุด

Michelson และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* SIM-7DSM 14043 เปรียบเทียบกับเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073 อาหารที่ใช้ทำการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเป็น 6 พบว่า *Lactobacillus delbrueckii* ผลิตกรดแลคติกได้ 52 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 และเชื้อ *Bacillus coagulans* ผลิตกรดแลคติกได้ 56 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 10

Altaf และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV6 ทำการหมักในอาหารแข็ง ใช้แหล่งไนโตรเจนราคาถูกแทนเปปโตนและยีสต์สกัด ในอาหารที่ใช้ในการหมักเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อเปลี่ยนกรดแลคติกเป็นเกลือแลคเตตและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นทำให้เกิดสภาวะไม่มีอากาศให้สมบูรณ์มากขึ้น ภาวะที่ใช้ในการหมักคือพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน พบว่าผลิตกรดแลคติกได้ร้อยละ 96 (กรัมกรดแลคติกที่ผลิตได้ต่อกรัมซับสเตรตที่ใช้ไป)

**2.5.6 พีเอชของอาหาร**

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

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

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

**2.5.7 อุณหภูมิ**

โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของ *Propionibacterium sp.* อยู่ระหว่าง 30 - 35 องศาเซลเซียส

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

Quesada - Chanto และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะมี

ประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตวิตามินบี 12

Yang และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 ใช้อุณหภูมิ 25, 30 และ35 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**2.5.8 การให้อากาศ**

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

Menon และ Shemin (1967) พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium shermanii* ภายใต้สภาวะมีอากาศอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกจะต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

Quesada - Chanto และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุดในสภาวะไม่มีอากาศเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตกรดอะซิติก การผลิตวิตามินบี 12 จะเพิ่มมากขึ้น

## 2.6 กากน้ำตาล (molasses)

เป็นของเหลวเหนียวข้น สีน้ำตาลดำ ดังภาพที่ 2.7 เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยเนื่องจากกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยนั้น เริ่มจากการนำอ้อยเข้าหีบ ได้น้ำอ้อยกรองเอากากออกแล้วเคี่ยวน้ำอ้อยจนได้ผลึกของน้ำตาลทรายตกตะกอนออกมา แยกผลึกน้ำตาลทรายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ผลผลิตพลอยได้ที่สำคัญจากการผลิตน้ำตาลทรายด้วยวิธีนี้ ได้แก่ กากน้ำตาล ขี้ตะกอน (filter cake) และกากอ้อย (bagasse) โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากน้ำตาลจะเป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ตกผลึก (สันทัด, 2544)

ภาพที่ 2.7 กากน้ำตาล (molasses)

**2.6.1 ชนิดของกากน้ำตาล**

Association of America Feed Control Officials (1982) แบ่งชนิดของกากน้ำตาลออกเป็น 5 ชนิด คือ

1. Cane molasses

เป็นผลิตผลพลอยได้ (by-product) จากการผลิตหรือการทำน้ำตาลทรายจากอ้อยให้บริสุทธิ์ กากน้ำตาลชนิดนี้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ร้อยละ 46 ซึ่งแสดงออกมาในรูปของน้ำตาลอินเวิร์ท มีความชื้นร้อยละ 27 และเมื่อเจือจาง 2 เท่าสามารถวัดความหวานได้ประมาณ 75.5 องศาบริกซ์

2. Beet molasses

เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลจากบีท กากน้ำตาลชนิดนี้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ48 ซึ่งแสดงออกมาในรูปของน้ำตาลอินเวิร์ท และเมื่อเจือจาง 2 เท่าสามารถวัดความหวานได้ประมาณ 79.5 องศาบริกซ์

3. Citrus molasses

เป็นส่วนของน้ำผลไม้ที่เหลือจากการผลิตผงมะนาว กากน้ำตาลชนิดนี้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 45 ซึ่งแสดงออกมาในรูปของน้ำตาลอินเวิร์ท และเมื่อเจือจาง 2 เท่าสามารถวัดความหวานได้ประมาณ 71 องศาบริกซ์

4. Hemicellulose molasses

เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตไม้อัด มีลักษณะเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นเนื่องจากการใช้อุณหภูมิและความดันสูง โดยที่ไม่มีการใช้กรด ด่าง หรือเกลือในกระบวนการผลิต กากน้ำตาลชนิดนี้ประกอบด้วย เพนโทส เฮกโซส และ คาร์โบไฮเดรต ในปริมาณไม่น้อยกว่าร้อยละ55

5. Starch molasses

เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลเดกซ์โทรสจากแป้งข้าวโพด หรือเมล็ดข้าวฟ่าง ซึ่งแป้งเหล่านี้จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ หรือกรด กากน้ำตาลชนิดนี้ ประกอบด้วย น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ43 ซึ่งแสดงออกมาในรูปของน้ำตาลเดกซ์โทรส มีส่วนของน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 50 และมีปริมาณของแข็งไม่ต่ำกว่าร้อยละ 77

**2.6.2 ส่วนประกอบของกากน้ำตาล**

ส่วนประกอบของกากน้ำตาลจะผันแปรไม่แน่นอน ขึ้นกับสายพันธุ์และกรรมวิธีในการผลิตน้ำตาล ซึ่งปริมาณสารอาหารต่างๆ ปริมาณแร่ธาตุรอง และปริมาณวิตามินของกากน้ำตาล แสดงดังตารางที่ 2.3, 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.3 ปริมาณแร่ธาตุรองชนิดต่างๆ ในกากน้ำตาล

| Mineral | Cane | Beet | Citrus |
|---|---|---|---|
| Copper, mg/kg | 36 | 13 | 30 |
| Iron, mg/kg | 249 | 117 | 400 |
| Manganese, mg/kg | 35 | 10 | 20 |
| Zinc, mg/kg | 13 | 40 | --- |

ที่มา : Association of American Feed Control Official (1982)

ตารางที่ 2.4 ส่วนประกอบและปริมาณเสารอาหารต่างๆ ของกากน้ำตาล

| Item | Cane | Beet | Citrus | Extract | Starch |
|---|---|---|---|---|---|
| Brix | 79.5 | 79.5 | 71.0 | 65.0 | 78.0 |
| Total Solids (%) | 75.0 | 77.0 | 65.0 | 65.0 | 73.0 |
| Specific Gravity | 1.41 | 0.41 | 1.36 | 1.32 | 1.40 |
| Total Sugars (%) | 46.0 | 48.0 | 45.0 | 55.0 | 50.0 |
| Crude Protein (%) | 3.0 | 6.0 | 4.0 | 0.5 | 0.4 |
| Nitrogen Free Extract (%) | 63.0 | 62.0 | 55.0 | 55.0 | 65.0 |
| Total Fat (%) | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.5 | 0.0 |
| Total Fiber (%) | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.5 | 0.0 |
| Ash (%) | 8.1 | 8.7 | 6.0 | 5.0 | 6.0 |
| Calcium, (%) | 0.8 | 0.2 | 1.3 | 0.8 | 0.1 |
| Phosphorus, (%) | 0.08 | 0.03 | 0.15 | 0.05 | 0.2 |
| Potassium, (%) | 2.4 | 4.7 | 0.1 | 0.04 | 0.02 |
| Sodium, (%) | 0.2 | 1.0 | 0.3 | --- | 2.5 |
| Chlorine, (%) | 1.4 | 0.9 | 0.07 | --- | 3.0 |
| Sulfur, (%) | 0.5 | 0.5 | 0.17 | --- | 0.05 |
| Energy (kcal/kg) | | | | | |
| Swine (ME) | 2343 | 2320 | 2264 | 2231 | --- |
| Poultry ($ME_n$) | 1962 | 1962 | --- | --- | --- |

ที่มา : Association of American Feed Control Official (1982)

ตารางที่ 2.5 ปริมาณวิตามินชนิดต่างๆ ในกากน้ำตาล

| Vitamin | Cane | Beet | Citrus |
|---|---|---|---|
| Biotin, mg/kg | 0.36 | 0.46 | --- |
| Choline, mg/kg | 745.0 | 716.0 | --- |
| Pantothenic Acid, mg/kg | 21.0 | 7.0 | 10.0 |
| Riboflavin, mg/kg | 1.8 | 1.4 | 11.0 |
| Thiamine, mg/kg | 0.9 | --- | --- |

ที่มา : Association of American Feed Control Official (1982)

**2.6.3 ความเป็นพิษของกากน้ำตาล**

ถึงแม้ว่ากากน้ำตาลจะมีองค์ประกอบที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์มากมาย แต่ก็ยังมีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อยู่ด้วย ตัวอย่างเช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์

(sulfurdioxide) ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรอล (hydroxymethyl furfural) โพแทสเซียมอิมิโดไดซัลโฟ-เนต (potassium imidodisulphonate) กรดไขมัน (fatty acid) เมลานอยดิน (melaniodin) และธาตุโลหะหนัก เช่น ทองแดง สังกะสี

เมื่อนำกากน้ำตาลที่ได้รับมาจากโรงงานน้ำตาลไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และทำให้เป็นของเหลวหนืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งกากน้ำตาลมา 700 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 5 ลิตร คนให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งสารละลายกากน้ำตาลมาทำการกำจัดโลหะหนัก สามารถปรับปรุงคุณภาพโดยวิธีต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. การปรับปรุงคุณภาพโดยใช้เรซินแลกเปลี่ยนไอออนบวก (Cation exchange resin) (Roukas, 1998)

- นำเรซินแลกเปลี่ยนไอออนบวกมา 20 กรัม เติมลงในสารละลายกากน้ำตาล 100 มิลลิลิตร
- นำสารละลายกากน้ำตาลไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm. อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง
- กรองเรซินออกโดยใช้กระดาษกรอง
- นำสารละลายกากน้ำตาลมาปรับพีเอชเป็น 5.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มอล (10N NaOH)
- นำสารละลายกากน้ำตาลไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การปรับปรุงคุณภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (Sulphuric acid treatment) (Roukas, 1998)

- นำสารละลายกากน้ำตาลมา 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด ด่าง (pH) เป็น 0.3 ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (1N NaOH)
- นำสารละลายกากน้ำตาลที่ปรับพีเอชแล้ววางทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำสารละลายกากน้ำตาลมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 g (8000 rpm.) เป็นเวลา 15 นาที เก็บน้ำส่วนที่แยกตะกอนมาปรับพีเอชให้เป็น 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มอล (10N NaOH)
- นำสารละลายกากน้ำตาลไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การปรับปรุงคุณภาพด้วยไตรแคลเซียมฟอสเฟต (Tricalcium phosphate treatment) (Roukas, 1998)

- นำสารละลายน้ำตาลมา 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล (1N NaOH)
- นำไปต้มให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- นำสารละลายกากน้ำตาลมาเติมไนไตรแคลเซียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.03 โมลาร์ ในขณะที่ยังร้อน
- นำสารละลายกากน้ำตาลวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำสารละลายกากน้ำตาลมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 g (8000 rpm.) เป็นเวลา 15 นาทีเก็บน้ำส่วนที่แยกตะกอนมาปรับพีเอชให้เป็น 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 นอร์มอล (5N NaOH)
- นำสารละลายกากน้ำตาลไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. การปรับปรุงคุณภาพด้วยโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ และ อีดีทีเอ (Potassium ferrocyanide EDTA treatment) (Roukas, 1998)

- นำสารละลายน้ำตาลมา 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 นอร์มอล (N HCl)
- นำไปต้มให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- นำสารละลายกากน้ำตาลมาเติมโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์อีดีทีเอ เข้มข้น 1000 ppm ในขณะที่ยังร้อน
- นำสารละลายกากน้ำตาลวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำสารละลายกากน้ำตาลมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 g (8000 rpm.) เป็นเวลา 15 นาทีเก็บน้ำส่วนที่แยกตะกอนมาทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. การปรับปรุงคุณภาพผงถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) (Kotzamanids และคณะ, 2002)

- เติมผงถ่านกัมมันต์ 15 กรัม ในสารละลายกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 10% ปริมาณ 200 มิลลิลิตร
- นำส่วนผสมที่ได้ไปให้ความร้อน และกวนตลอดเวลาที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- กรองผงถ่านกัมมันต์ออกโดยใช้กระดาษกรอง what man เบอร์ 1
- ทำซ้ำจนกว่าสารละลายใส

- นำสารที่กรองได้ไปปรับค่าพีเอชเป็น 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล (1 N NaOH)
- นำสารละลายกากน้ำตาลไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**2.6.4 การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาล**

ประโยชน์ที่ได้จากการใช้กากน้ำตาลมีมากมาย เนื่องจากกากน้ำตาลประกอบด้วย น้ำตาล , แร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ ประโยชน์ที่เห็นได้โดยตรง เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตแอลกอฮอล์สำหรับการผลิตสุรา และการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตแก๊สโซฮอล์ อุตสาหกรรมผลิตผงชูรส อุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมการผลิตยีสต์

Satyanarayana และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตไรโบฟลาวินจากกากน้ำตาลและถั่วแขกซึ่งใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และถั่วแขกเป็นแหล่งไนโตรเจนโดยใช้เชื้อ *Eremothecium ashbyii*

Liakopoulou-Kyriakides และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตแซนแทนกัมจากกากน้ำตาลโดยใช้เชื้อ *Xanthomonas campestris* ATTC 1395 พบว่าในระยะการหมัก 24 ชั่วโมง สามารถผลิตแซนแทนกัมได้ 53 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเป็น 175 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการเติม $K_2HPO_4$ 4 กรัมต่อลิตร และมีพีเอชเริ่มต้นเป็นกลาง

Carvalho และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อย โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ในสภาวะการหมักแบบกึ่งกะ ซึ่งได้ผลผลิตของเอทานอลสูงสุดเป็น 16.9 กรัมต่อลิตร

Shoda (2004) ศึกษาการผลิต Bacterial cellulose จากกากน้ำตาลที่ผ่านการบำบัด (treat) โดยใช้กรดซัลฟิวริก ทำให้ได้ความเข้มข้นของ Bacterial cellulose สูงถึงร้อยละ 76 ซึ่งมากกว่ากากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการบำบัด (untreat)

Wee (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลคติก (L (+)- lactic acid) จากกากน้ำตาลโดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* ในสภาวะการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อสภาวะการหมัก คือมีพีเอชเป็น 7.0 จะผลิตกรดแลคติกได้ 95.7 กรัมต่อลิตร มีผลได้ (yield) เป็นร้อยละ 94.9 และอัตราการผลิต (productivity) เป็น 4.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Dumbrepatil และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาลโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Delbrueckii* Mutant Uc-3 ในสภาวะการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นสูงถึง 190 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลคติกได้ 166 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิต (productivity) เป็น 4.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Buenaventurada และ Tokiwa (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลคติก (D-lactic acid) โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* จากกากน้ำตาล (sugarcane molasses) , น้ำผลไม้จากอ้อย (sugarcane juice) และน้ำผลไม้จากบีท (sugarcane beet) ความเป็นกรดด่าง 6.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ผลผลิตของกรดแลคติกจากสารตั้งต้นคือ กากน้ำตาล, น้ำผลไม้จากอ้อย และน้ำผลไม้จากบีทเป็น 107 กรัมต่อลิตร 120 กรัมต่อลิตร และ 84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Dong-Hua และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตเออโกสเตอรอล (Ergosterol) จากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรม พบว่า มีการผลิตเออโกสเตอรอล 52.6 มิลลิกรัมต่อกรัม จากการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร มีระยะการหมัก 30 ชั่วโมง โดยเลี้ยงในระดับฟลาสก์ที่มีการเขย่า

## 2.7 น้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวมีลักษณะเป็นของเหลวใสอยู่ภายในผลมะพร้าว มีส่วนประกอบสำคัญดังตารางที่ 2.6 ซึ่งพบว่าในน้ำมะพร้าวอ่อน น้ำตาลส่วนใหญ่ เป็นน้ำตาลรีดิวส์ซิงร้อยละ 2.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนน้ำมะพร้าวแก่มีเพียงร้อยละ 1.45 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อผลมะพร้าวอ่อนเจริญเป็นมะพร้าวแก่ ทั้งปริมาณและชนิดของน้ำตาล ตลอดจนของแข็งทั้งหมดภายในน้ำมะพร้าวต่างมีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยปริมาณน้ำตาลจะลดลงเมื่อมะพร้าวมีอายุมากขึ้น

น้ำมะพร้าวแก่ 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วยวิตามินหลายชนิด เช่น กรดนิโคทินิก 0.64 ไมโครกรัม กรดพาโนทีริก 0.52 ไมโครกรัม ไบโอติน 0.2 ไมโครกรัม ไบโอฟราวิน 0.01 ไมโครกรัม และกรดโพรริก 0.52 ไมโครกรัม กรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) ประมาณ 0.7-3.7 มิลลิกรัม และยังประกอบไปด้วยสารเคมีซึ่งเป็นสารจำพวกโพแทสเซียมเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้น้ำมะพร้าวแต่ละแหล่งจะมีความแตกต่างกัน เป็นผลมาจากความแตกต่างกันในด้านของพันธุ์มะพร้าวและแหล่งที่ปลูกเป็นหลัก

น้ำมะพร้าวเป็นผลิตผลพลอยได้จากการเกษตร เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานทำกะทิและขนม ขั้นตอนการผลิตกะทิจะต้องผ่านการผ่าซีกมะพร้าวเพื่อนำเนื้อมะพร้าวไปผลิตกะทิซึ่งน้ำมะพร้าวที่ได้ออกมานั้นไม่พบการนำไปใช้ประโยชน์ใดๆนอกจากระบายทิ้งสู่สิ่งแวดล้อมซึ่งอาจเป็นปัญหามลภาวะ โดยน้ำมะพร้าวสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ทำให้เซลล์เจริญเติบโตและแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว เนื่องจากน้ำมะพร้าวมีแร่ธาตุและสารอาหารที่อุดมสมบูรณ์ จากการทิ้งน้ำมะพร้าวสู่สิ่งแวดล้อม น้ำมะพร้าวจะทำให้จุลินทรีย์ในธรรมชาติเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา

ตารางที่ 2.6 ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าว

| ส่วนประกอบ | น้ำมะพร้าวแก่ (%) | น้ำมะพร้าวอ่อน (%) |
|---|---|---|
| ของแข็งทั้งหมด | 5.4 | 6.5 |
| น้ำตาลรีดิวส์ซิง | 0.2 | 4.4 |
| แร่ธาตุต่างๆ | 0.5 | 0.6 |
| โปรตีน | 0.1 | 0.01 |
| ไขมัน | 0.1 | 0.01 |
| กรดต่างๆ (mg) | 60.0 | 120.0 |
| pH | 5.2 | 4.5 |
| Potassium (mg) | 247.0 | 290.0 |
| Soduim (mg) | 48.0 | 42.0 |
| Calcium (mg) | 40.0 | 44.0 |
| Magnesium (mg) | 15.0 | 10.0 |
| Phosphorous (mg) | 6.3 | 9.2 |
| Iron (mg) | 79.0 | 106.0 |
| Copper (mg) | 26.0 | 26.0 |

ที่มา : Coconut Development Board (2012)

ตัวอย่างการนำน้ำมะพร้าวแก่มาใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น

- ในประเทศศรีลังกา นำน้ำมะพร้าวมาหมักทำยางเกิดการตกตะกอน
- ในประเทศอินเดีย และมาเลเซีย นำน้ำมะพร้าวมาเป็นสาร coagulant ใน Latex
- ในประเทศฟิลิปปินส์ ใช้น้ำมะพร้าวผลิตน้ำส้มสายชู โดยเชื้อ *Acetobacter rances* ในการหมัก เนื่องจากน้ำมะพร้าวมีปริมาณน้ำตาลซูโครสอยู่มาก
- ในประเทศไทยมีการผลิตวุ้นมะพร้าวโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เชื้อ *Acetobacter xylinum* เป็นตัวผลิตแผ่นวุ้นเซลลูโลส

แต่ในปัจจุบันการนำน้ำมะพร้าวมาใช้ประโยชน์ยังมีลักษณะของการใช้งานที่จำกัดอยู่ไม่กี่รูปแบบ เนื่องจากขาดข้อมูลการทดลองเปรียบเทียบกับอาหารมาตรฐานต่างๆ ที่สถาบันซึ่งเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ยอมรับ ซึ่งเป็นเรื่องที่ต้องศึกษาต่อไป แต่เป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายว่าน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหารที่มีแร่สารอาหารและแร่ธาตุที่หลากหลาย (อภิชาติ, 2545)

# บทที่ 3
# เนื้อหาการวิจัย

## 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

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

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 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)

อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่นๆ ที่จำเป็นในการเลี้ยงเชื้อและการวิเคราะห์

## 3.2 สารเคมีและวัสดุการเกษตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

กลูโคส (glucose)

น้ำกลั่น

ไดโพแทสเซียสไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 .7H_2O$)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . 4 H_2O$)

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

โซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$)

โพแทสเซียมคาร์บอเนต ($KCO_3$)

สารละลายฟีนอล 5%

ผงวุ้น

โมลาส

น้ำมะพร้าว

## 3.3 เชื้อจุลินทรีย์

### 3.3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

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

### 3.3.2 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อจำนวน 1 ลูป แล้วจิ้ม (stab) ลงบนอาหารวุ้น MRS (ภาคผนวก ก.) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันจุกสำลีที่ปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุก ๆ 2 สัปดาห์

### 3.3.3 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก.) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

### 3.4 การศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.20 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 โดยทำการแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลที่วัดตามวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois, 1956) เท่ากับ 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เตรียมอาหารแต่ละสูตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 350 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 ($\pm$ 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อจากข้อ 3.3.3 ร้อยละ 5 ลงในอาหารแต่ละสูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารควบคุมพีเอช เก็บตัวอย่างน้ำหมักครั้งละ 4 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 9 วัน ทำการตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี plate count (AOAC, 1997) วัดพีเอช หาปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และวัดความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (ภาคผนวก ข) และทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ

### 3.5 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลายร่วมด้วย

ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 3.4 เปรียบเทียบกับการใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลาย โดยแบ่งเป็นชุดการทดลอง ดังนี้

สูตรที่ 1 กากน้ำตาล + น้ำ + ยีสต์สกัดและแร่ธาตุ

สูตรที่ 2 กากน้ำตาล + น้ำมะพร้าว + ยีสต์สกัดและแร่ธาตุ

สูตรที่ 3 กากน้ำตาล + ยีสต์สกัด + น้ำมะพร้าว

การเตรียมอาหารแต่ละสูตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 350 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 ($\pm$ 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อจากข้อ 3.3.3 ร้อยละ 5 ลงในอาหารแต่ละสูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารควบคุมพีเอช เก็บตัวอย่างน้ำหมักครั้งละ 4 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง

เป็นเวลา 9 วัน ทำการตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี plate count วัดพีเอช ปริมาณกรดโพรพิโอนิก โดยเครื่อง HPLC และวัดความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก และทำการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรมทางสถิติ

### 3.6 การศึกษาชนิดของสารที่ทำให้เป็นกลางที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

นำชุดการทดลองที่มีความเหมาะสมที่สุดจากขั้นตอนที่ 3.5 โดยเตรียมอาหารในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 350 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 ($\pm$ 0.1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อจากข้อ 3.3.3 ร้อยละ 5 ลงในอาหาร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง ทำการทดสอบความเหมาะสมของสารที่ทำให้เป็นกลาง 3 ชนิด คือ $CaCO_3$, $NaHCO_3$ และ $K_2CO_3$ โดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวล (w/w) เก็บตัวอย่างน้ำหมักครั้งละ 4 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 9 วัน ทำการตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี plate count วัดพีเอช หาปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC และวัดความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก และทำการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรมทางสถิติ

### 3.7 การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตรโดยมีการเปรียบเทียบดังนี้

ถังที่ 1 ใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดจากหัวข้อ 3.5 ร่วมกับ สารที่ทำให้เป็นกลางที่เหมาะสมที่สุด โดยไม่มีการควบคุมค่าพีเอช

ถังที่ 2 ใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดจากหัวข้อ 3.5 ร่วมกับการควบคุมค่าพีเอชที่ 6.5โดยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)

ถังที่ 3 ใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดจากหัวข้อ 3.5 ร่วมกับการควบคุมค่าพีเอชที่ 6.5 โดยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) และสารที่ทำให้เป็นกลางที่เหมาะสมที่สุด

ทำการหมักแบบกะ ด้วยสภาวะนิ่งและไม่มีการให้อากาศ ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 3.5 ลิตร (ร้อยละ70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 216 ชั่วโมง. การตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิต

ด้วยวิธี plate count วัดพีเอช หาปริมาณกรดโพรพิโอนิกโดยเครื่อง HPLC และวัดความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก และทำการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรมทางสถิติ

### 3.8 การวัดกรดโพรพิโอนิก ด้วยเครื่อง HPLC

นำน้ำหมักไปกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใช้ Inertsil C8-3 column และใช้ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (พีเอช 3) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวทำชะที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที (รายละเอียดวิธีการใช้เครื่อง HPLC ดังภาคผนวก ข)

### 3.9 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิจัยในหัวข้อ 3.4 ถึง 3.7 ใช้การวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

# บทที่4

## ผลการวิจัยและวิจารณ์

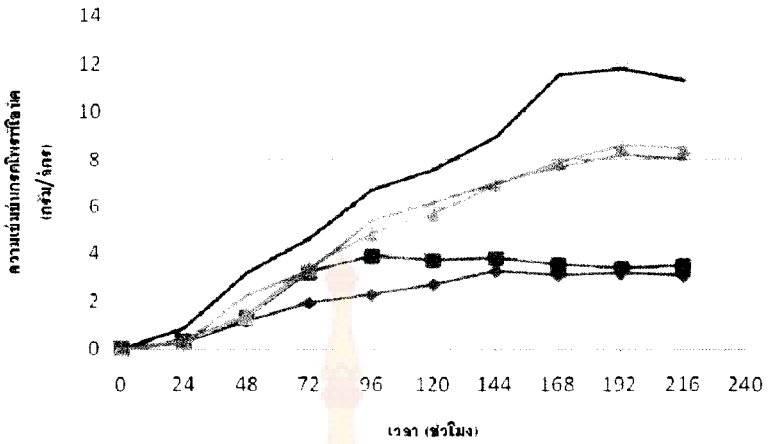
### 4.1 ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลในกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

จากการศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาล ที่ความเข้มข้น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับแหล่งน้ำตาลจากกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 216 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในตารางและภาพที่ 4.1 พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุด 11.81 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 192 แต่เมื่อใช้กากน้ำตาลเความเข้มข้น 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุด 8.585 และ 8.215 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมง 192 ซึ่งให้ผลผลิตน้อยกว่าการใช้กลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรเล็กน้อย ส่วนปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 20 และ 30 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่ชั่วโมง 144 คือ 3.27 และ 3.82 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งถือว่าเป็นความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เมื่อใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ

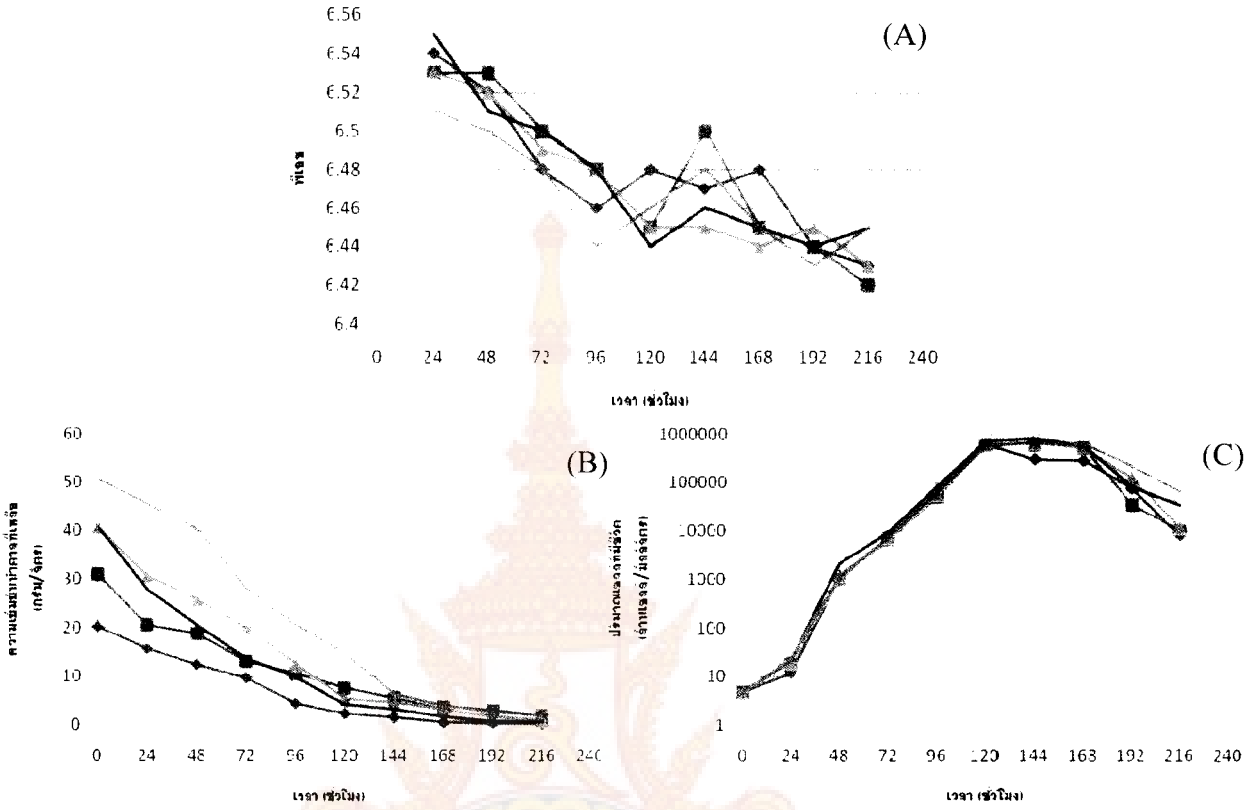
| ความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร) | ชั่วโมงที่ใช้ในการหมัก |
|---|---|---|
| กากน้ำตาล 20 | $3.27^{c}$ | 144 |
| กากน้ำตาล 30 | $3.82^{c}$ | 144 |
| กากน้ำตาล 40 | $8.58^{b}$ | 192 |
| กากน้ำตาล 50 | $8.22^{b}$ | 192 |
| น้ำตาลกลูโคส 40 | $11.81^{a}$ | 192 |

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.5$




ภาพที่ 4.1 การเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เมื่อใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ: กากน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร และ กากน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การลดลงของน้ำตาล และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อต่อเวลาที่ระยะเวลาต่างๆ เป็นไปดังภาพที่ 4.2 พบว่า ค่าพีเอชในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลจากกากน้ำตาล และชุดควบคุมซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเล็กน้อยจากเริ่มต้น (พีเอช = 6.5) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนั้นมีแนวโน้มลดลง ดังแสดงในภาพที่ 4.2 (A) และค่าพีเอชไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงไปมากตามปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น เนื่องจาก มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปเพื่อควบคุมค่าพีเอชในน้ำหมักระหว่างกระบวนการหมัก จากภาพที่ 4.2 (B) แสดงถึงการลดลงของน้ำตาลต่อเวลาที่ระยะเวลาต่างๆ ซึ่งพบว่าทุกชุดการทดลองมีการใช้น้ำตาลจนเกือบหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 ถึง 192 เมื่อพิจารณาภาพที่ 4.2 (C) พบว่าจำนวนเซลล์มีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ชั่วโมง 96 เป็นต้นไป และจำนวนเซลล์เริ่มลดลงที่ชั่วโมง 144 อย่างรวดเร็ว จนต่ำสุดที่ชั่วโมง 216 ซึ่งจะเห็นว่าจำนวนเซลล์มีความสัมพันธ์กันกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลง




ภาพที่ 4.2 การเปรียบเทียบค่าพีเอช (A) การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลที่เหลือ (B) และปริมาณเซลล์มีชีวิต (C) ของการหมักกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 20, 30, 40, 50 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร : —◆— กากน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร, —■— กากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร, —▲— กากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร, ——น้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร และ —×— กากน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลอง พบว่า กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เนื่องจากสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูง ซึ่งอาจจะน้อยกว่าการใช้กลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบราคาของกากน้ำตาลกับน้ำตาลกลูโคสแล้ว พบว่ากากนาตาลมีราคาถูกกว่ามาก ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ กากน้ำตาลความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นแนวทางในการปรับปรุงกากน้ำตาลเพื่อให้เป็นซับสเตรตในการผลิตกรดโพรพิโอนิกต่อไป

## 4.2 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลายร่วมด้วย

จากการทดลองในข้อ 4.1 ทำให้ทราบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ 40 กรัมต่อลิตรมีความเหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดโพรพิโอนิก จึงได้ทำการทดลองต่อไปโดยนำน้ำมะพร้าวมาใช้เป็นตัวทำละลาย แทนน้ำกลั่นในขั้นตอนของการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกำหนดให้

การทดลองชุดที่ 1 คือ กากน้ำตาล + น้ำ + ยีสต์สกัดและแร่ธาตุ

การทดลองชุดที่ 2 คือ กากน้ำตาล + น้ำมะพร้าว + ยีสต์สกัดและแร่ธาตุ

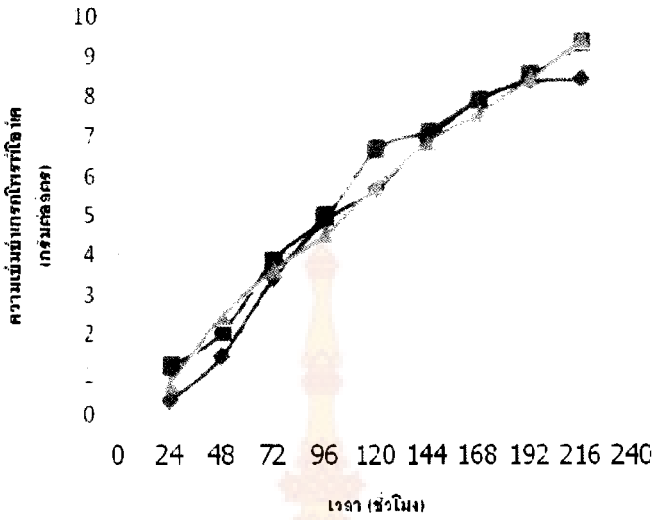
การทดลองชุดที่ 3 คือ กากน้ำตาล + น้ำมะพร้าว + ยีสต์สกัด

ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.3 พบว่า ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการทดลองทุกชุดมีความใกล้เคียงกัน โดยในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งใช้กากน้ำตาลร่วมกับยีสต์สกัดและแร่ธาตุจะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 8.43 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งใช้กากน้ำตาลร่วมกับน้ำมะพร้าวที่ใช้เป็นตัวทำละลายแทนน้ำกลั่นร่วมกับยีสต์สกัดและแร่ธาตุ ให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 9.34 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 192 และในชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลร่วมกับน้ำมะพร้าวที่ใช้เป็นตัวทำละลายร่วมกับยีสต์สกัดแต่ไม่มีการเพิ่มแร่ธาตุ จะให้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 9.45 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 192

ตารางที่ 4.2 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลาย

| ชุดการทดลองที่ | ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร) | ชั่วโมงที่ใช้ในการหมัก |
|---|---|---|
| 1 | 8.43 [b] | 216 |
| 2 | 9.34 [a] | 192 |
| 3 | 9.45 [a] | 192 |

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.5$



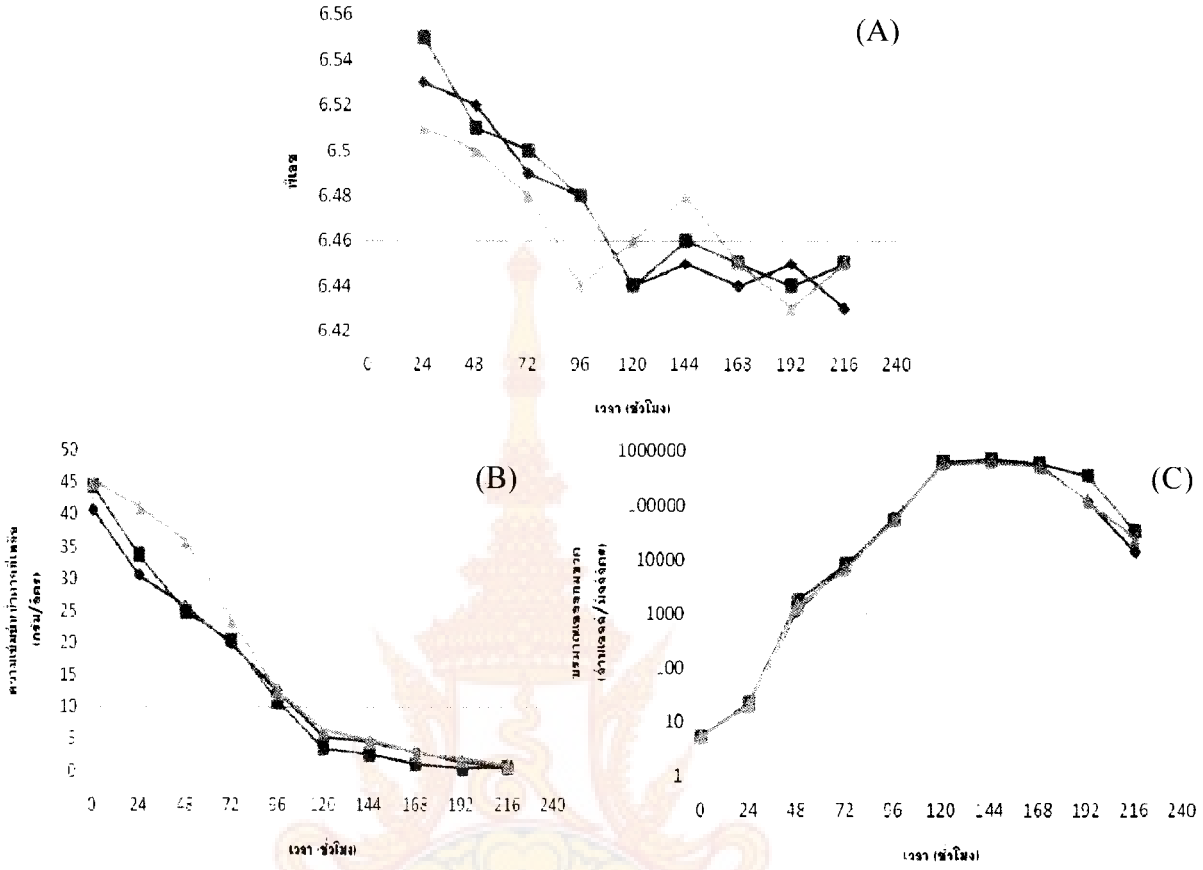

ภาพที่ 4.3 การเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิก ระหว่างชุดการทดลองต่างๆ

การทดลองชุดที่ 1 คือ กากน้ำตาล + น้ำ + ยีสต์สกัดและแร่ธาตุ

การทดลองชุดที่ 2 คือ กากน้ำตาล + น้ำมะพร้าว + ยีสต์สกัดและแร่ธาตุ

การทดลองชุดที่ 3 คือ กากน้ำตาล + น้ำมะพร้าว + ยีสต์สกัด

เมื่อพิจารณา ถึงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การลดลงของน้ำตาล และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นไปดังภาพที่ 4.4 พบว่า ค่าพีเอชในแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกันมากนักโดยจะลดลงเล็กน้อยซึ่งเป็นผลมาจากการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปเพื่อควบคุมค่าพีเอชในน้ำหมักระหว่างกระบวนการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 4.4 (A) การลดลงของน้ำตาลต่อเวลาที่ระยะเวลาต่างๆ ซึ่งพบว่าทุกชุดการทดลองมีการใช้น้ำตาลจนเกือบหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 ถึง 192 ทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 4.4 (B) ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* พบว่า ระดับเซลล์ของชุดการทดลองที่มีการใช้น้ำมะพร้าวร่วมกับยีสต์สกัดและแร่ธาตุจะมีการเจริญของเซลล์มากที่สุด อาจเนื่องมาจากมีแร่ธาตุสังเคราะห์ที่เติมเพิ่มลงไปและแร่ธาตุจากน้ำมะพร้าว แต่ในส่วนชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งไม่มีการเติมแร่ธาตุสังเคราะห์ลงไปนั้นเซลล์ก็ยังคงสามารถเจริญเติบโตได้ดีซึ่งอาจเนื่องมาจากน้ำมะพร้าว (coconut water) สามารถกระตุ้นเซลล์ให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโน กรดอินทรีย์ กรดนิวคลีอิก พิวรีน (purine) น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอล์ วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต และธาตุอาหาร หลายชนิด (อภิชาติ, 2545)




ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงคาพีเอช(A) การลดลงของน้ำตาล (B) ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 (C) ที่เวลาต่างๆ ของแต่ละชุดการทดลอง

การทดลองชุดที่ 1 คือ กากน้ำตาล + น้ำ + ยีสต์สกัดและแร่ธาตุ

การทดลองชุดที่ 2 คือ กากน้ำตาล + น้ำมะพร้าว + ยีสต์สกัดและแร่ธาตุ

การทดลองชุดที่ 3 คือ กากน้ำตาล + น้ำมะพร้าว + ยีสต์สกัด

จากผลการทดลอง พบว่า ชุดการทดลองที่มีการใช้น้ำมะพร้าวร่วมด้วยในชดการทดลองที่ 3 จะให้ผลการผลิตกรดโพรพิโอนิก 9.45 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 192 ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองที่ 1 ที่ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 8.43 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 216 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งมีการใช้น้ำมะพร้าวและแร่ธาตุร่วมด้วยผลปรากฏว่าสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 9.34 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 192 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีแร่ธาตุ และกรดอะมิโนอยู่หลายชนิด จึงสามารถไปทดแทนแร่ธาตุที่ไม่ได้เติมลงไปได้ (นพมณี, 2545) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ชุด

การทดลองที่ 3 ที่มีการใช้น้ำมะพร้าวแต่ไม่ต้องเติมแร่ธาตุอื่นเพิ่มเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีทางชีวภาพ

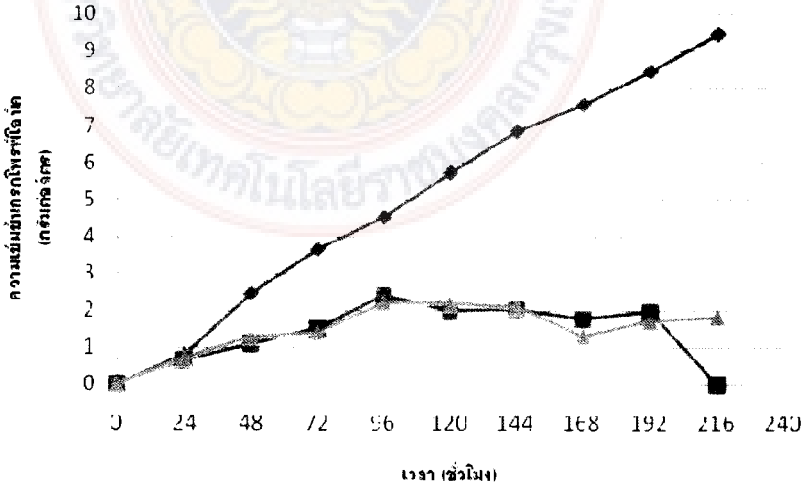
## 4.3 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารที่ทำให้เป็นกลาง

จากการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารที่เป็นกลาง 3 ชนิด คือ $CaCO_3$, $NaHCO_3$ และ $K_2CO_3$ โดยใช้สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมมากที่สุดจากการศึกษาข้อ 4.2 และชั่วโมงในการหมัก 192 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 พบว่า เมื่อใช้ $CaCO_3$ สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุดถึง 9.60 เมื่อเปรียบเทียบกับ $NaHCO_3$ และ $K_2CO_3$ ซึ่งผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียง 1.96 และ 1.70 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.5

ตารางที่ 4.3 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการใช้สารที่ทำให้เป็นกลางชนิดต่างๆ

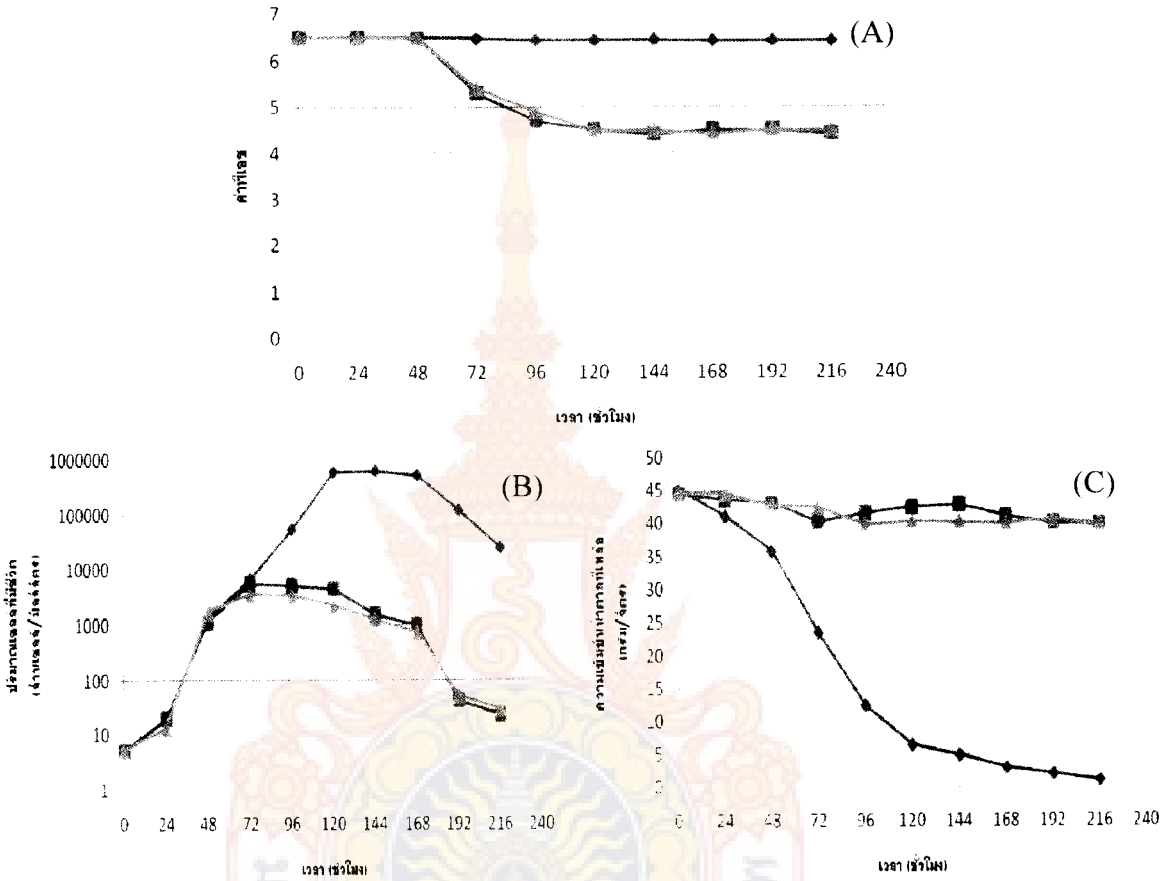
| ชนิดของสารที่ทำให้เป็นกลาง | ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| $CaCO_3$ | 9.60 [a] |
| $NaHCO_3$ | 1.96 [b] |
| $K_2CO_3$ | 1.70 [b] |

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.5$




ภาพที่ 4.5 การเปรียบเทียบค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาของชุดการทดลองที่มีการใช้สารที่ทำให้เป็นกลางแต่ละชนิด: $CaCO_3$, $NaHCO_3$, $K_2CO_3$

เมื่อพิจารณา ถึงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การลดลงของน้ำตาล และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* เป็นไปดังภาพที่ 4.6




ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช(A) การลดลงของน้ำตาล(B) ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965(C) ที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาของชุดการทดลองที่มีการใช้สารที่ทำให้เป็นกลางแต่ละชนิด : $CaCO_3$, $NaHCO_3$, $K_2CO_3$

ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในชุดการทดลองที่มีการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารที่ทำให้เป็นกลาง เซลล์มีการเจริญได้ดีมากกว่าชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตและโพแทสเซียมคาร์บอเนต ซึ่งการเจริญของเชื้อหยุดชะงักไปเมื่อเวลาประมาณ 72 ชั่วโมง เนื่องมาจากสภาวะความเป็นกรดที่สอดคล้องกับค่าพีเอช พบว่าค่าพีเอชของชุดทดลองที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารที่ทำให้เป็นกลาง มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตและโพแทสเซียมคาร์บอเนต กลับพบว่าเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชอย่างรวดเร็ว ณ ชั่วโมงที่ 48 เนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นเป็นสารที่ทำให้เป็นกลางที่ไม่ละลาย

ในสารอาหารทำให้เมื่อเชื้อมีการผลิตกรดโพรพิโอนิกออกมาแคลเซียมคาร์บอเนตจะสามารถมาสะเทินกับกรดและยังคงปรับสภาพภายในฟลาสก์ให้มีความเป็นกลางได้ (Huang และคณะ, 2005) ส่วนสารที่ทำให้เป็นกลางอีกสองชนิดนั้นต่างสามารถละลายได้ในสารอาหาร ทำให้ในขั้นตอนการเตรียมอาหารและปรับพีเอชจะถูกสะเทินกับบัฟเฟอร์กรดที่ใช้ในการปรับพีเอช และทำได้เพียงปรับสภาวะในช่วงแรกเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติในการละลายของสารที่ทำให้เป็นกลางที่แตกต่างกัน ทำให้ทั้งค่าน้ำตาลที่เหลือและปริมาณการผลิตกรดต่างให้ผลการทดลองไปในทางเดียวกัน ดังแสดงในภาพที่ 4.6 เช่นเดียวกับการทดลองของ Hong-Wei และคณะ (2009) พบว่าแคลเซียมคาร์บอเนตให้ผลในการเป็นสารที่ทำให้เป็นกลางดีที่สุด ในการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) , สารละลายแอมโมเนียคอลและโซเดียมไปคาร์บอเนต

ซึ่งจากผลการทดลองในขั้นตอนนี้สามารถที่จะสรุปได้ว่าสารที่ทำให้เป็นกลางที่มีความเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ แคลเซียมคาร์บอเนต

## 4.4 การศึกษา การผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) โดยเติมอยู่ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต (เติมอยู่ภายในอาหาร) ร่วมกับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)โดยเติมภายหลัง ในขั้นตอนการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และการใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียว ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4

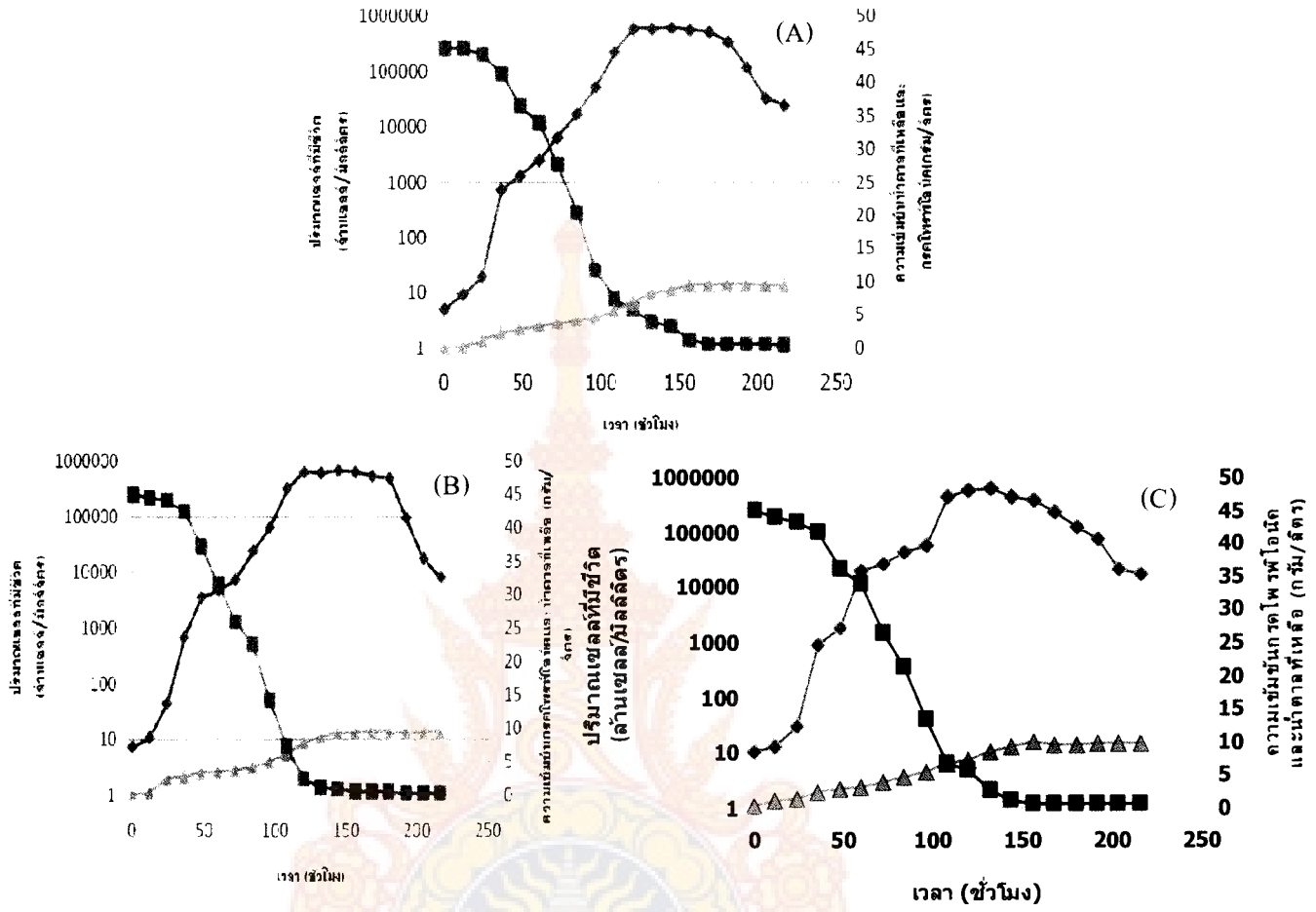
ตารางที่ 4.4 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

| สภาวะที่ศึกษา | ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร) | ชั่วโมงที่ใช้ในการหมัก | ผลผลิต (กรัมต่อกรัม) | อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรชั่วโมง) |
|---|---|---|---|---|
| เติม $CaCO_3$ | 9.66 [b] | 192 | 0.2168 | 0.0503 [b] |
| เติม KOH | 9.43 [c] | 192 | 0.2113 | 0.0491 [c] |
| เติม $CaCO_3$ ร่วมกับเติม KOH | 9.88 [a] | 156 | 0.2223 | 0.0633 [a] |

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.5$

จากผลการทดลอง พบว่า ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 9.43 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 192 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเพียงอย่างเดียว (9.66 กรัมต่อลิตร) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 9.88 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 156 ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบทางสถิติ พบว่า ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์นั้นให้ผลการผลิตกรดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเพียงอย่างเดียว โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเพียงอย่างเดียวจะใช้ระยะเวลาในการผลิตนานกว่า 36 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4.7

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตพบว่าเมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกับเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ จะมีอัตราการผลิตสูงสุดถึง 0.0633 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จึงกล่าวได้ว่าเป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังปฏิกรณ์ในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งในงานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น แต่ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในการผลิตว่ามีความคุ้มทุนหรือไม่ที่จะเลือกใช้การหมักในสภาวะนี้




ภาพที่ 4.7 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือและปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต จากการศึกษาในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ในสภาวะต่างๆ : ◆ ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต, ■ ความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือและ ▲ ความเข้มข้นกรดโพรพิโอนิก

(A) เติมแคลเซียมคาร์บอเนต($CaCO_3$)

(B) ควบคุมค่าพีเอชที่ 6.5 โดยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)

(C) เติมแคลเซียมคาร์บอเนต($CaCO_3$) และการควบคุมค่าพีเอชที่ 6.5 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์(KOH)

# บทที่ 5

## สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาผลิตกรดโพรพิโอนิก จากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อหาสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลร่วมกับน้ำมะพร้าว พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่ใช้กากน้ำตาลซึ่งมีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรร่วมกับยีสต์สกัดและน้ำมะพร้าว นั้นมีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยไม่จำเป็นต้องเติมธาตุอาหารลงไปเพิ่มเติม ส่วนการนำไปทำการผลิตต่อในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร พบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในขั้นตอนการควบคุมความเป็นกรด-เบสของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงถึง 9.88 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตกรดสูงสุด 0.063 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตรในระดับห้องปฏิบัติการ

ข้อเสนอแนะ เนื่องจากโมลาสเป็นผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการเกษตรที่มีราคาถูก จึงควรมีการทำวิจัยในขั้นขยายระดับให้ใหญ่มากขึ้นกว่าในระดับห้องปฏิบัติการและหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกต่อไป

# บรรณานุกรม


นพมณี โทปุญญานนท์. 2545. **การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. 162 หน้า.

พรวิสาข์ ยุ่นประยงค์. 2551. "การผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อยับยั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยใช้หางนมเป็นซับสเตรต". **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต** สาขาชีววิทยาประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ. 2550. "การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากหางนมโดยเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4865 ร่วมกับเชื้อ *Lactococus lactis* TISTR 1401. **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต** สาขาชีววิทยาประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วรัญญา อาจหาญ. 2550. "การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ของเชื้อ Propionibacterrium freudenreicchii TISTR446 ที่ถูกตรึงในน้ำล้างไก่". สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ

ศิวาพร ศิวเวช. 2546. **วัตถุเจือปนในอาหาร**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ. 169 หน้า.

ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์, กรมควบคุมมลพิษ. มปป. "เอกสารข้อมูลความปลอดภัยเคมีภัณฑ์" [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก : http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?vID =742 (วันที่สืบค้น 10 กันยายน 2555)

สมใจ ภัสสัตยางกูล. 2537. **การศึกษาวิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ และการนำไปปรับใช้ในการผลิตสารเมตาบอไลท์จากแบคทีเรียโพรพิโอนิก**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2544, **เทคโนโลยีสำหรับชนบท เล่มที่ 4** สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สุรนารถ อร่ามเรือง. 2550. "การผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยวิธีการหมักแบบกะของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965" **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต** สาขาชีววิทยาประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อภิชาติ ชิดบุรี. 2545. **เอกสารประกอบการสอนวิชา การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช(บรรยาย)**. สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, ลำปาง. 283 หน้า.

Altaf, M.D., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Vijay, E., and Reddy, G. 2006. "Single step fermentation of starth 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.

AOAC. Research Institute. The referee, inside lab management, Association of official analytical chemists. Washington, D.C. 1997.

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.

Association of American Feed Control Official. 1982. Official publication, AAFCO. *C.R* Spooner, Department of agriculture. Atlanta, GA

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

Buenaventurada, P.C. and Tokiwa, Y. 2007. "Production of D-Lactic acid from Sugarcane molasses, Sugarcane juice and Sugarcane beet juice by *Lactobacillus delbrueckii.*". **Biotechnology Letters.** 29(9) : 1329-1332.

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.

Carvalho, J.C.M., Vitolo, M., Sato, S. and Aguarone, E. 2003. "Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* grown in sugarcane blackstrap molasses through a fed-batch process: optimization by response surface methodology". **Appl Biochem Biotechnol.** 110 (3) : 151-64

Champagne, C.P., Baillargeon, C. and Goulet, A. 1989. "Whey fermentation by immobilized cells *Propionibacterium shermanii*". **Journal of Applied Bacteriology**. 66 : 175 – 184.

Coconut Development Board. 2012. "Coconut Products" [Online]. Available :http://coconutboard.nic.in/tendnutr.htm. (Retrieved September 10, 2012)

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., Almeida, J.S., Moura, M.J. and Carrondo, M.J.T. 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.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. "Calorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry.** 28 : 350-356.

Dong-Hua, X., Ya-Li, L., Xiu-Ping, L. Jun-Nan., Li-Juan, MA. 2007. "Study on Extraction Process of Ergosterol from S.cervisiae Dry Yeast". **Food Science**. School of Biological Engineering,Changchun University of Technology. 28 : 93-96.

Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J. and Gokhale, D. 2007. "Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation". **Applied and Environmental Microbiology**. p 333–335.

Filya, E. S. and Karabulut, A. 2004. " The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages". **Journal of Applied Microbiology** . 97 : 818–826.

Gebgardt, A.G., Kucheras, R.V., Laska, D.V. and Vogrin, A.G. 1970. "The relation between nitrogen metabolism and the cabamide-synthetic capacity of *Propionibacterium shermanii*". **Mikrobiologiia.** 39(3) : 447-452

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.

Hong-Wei Y., Tsia-Ju C., Wei-Chin P., Hsien-Jen W., 2009. "Effect of neutralizing agents on lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using sweet potato starch." **World J Microbiol Biotechnol**.26:437-441.

Huang, L.P., Jin, B. And Zhou, J. 2005. "Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*". **Biochemical Engineering Journal**. 23 : 265-276.

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.

Kotzanmanidis, C., Roukas, T. and Skaracis, G. 2002. Optimization of lactic acid production from beet molasses Lactobacillus delbrueckii NCIMB 8130, World **J. Microbiol Biotechnol.** 18 : 442-448

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 (a). "Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* :effect of growth substrate". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 37 : 437 – 442.

Liakopoulou-Kyriakides, M., Psomas, S.K., Kyriakidis, D.A. 1999. "Xanthan gum production by Xanthomonas campestris w.t. fermentation from chestnut extract". **Applied Biochemistry And Biotechnology**. 82 : 175-183

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.

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.

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.

Papoutsakis, E.T. and Meyer, C.L. 1985. "Fermentation equations for propionic acid bacteria and production of assorted oxychemicals from various sugars". **Biotechnology bioengineering.** 27 : 67-80.

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

Quesada-Chanto, A., Afschar, 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.

Richter, K and Kotzekidou. 1998. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized Lactobacillus casei cell using fedbatch culture. **Enz and Micro Technol** 22 : 199-204.

Ricker, N.L., PittMan, E.F. and King, C.J. 1980. "Solvent extraction with amines for recovery of acetic acid from dilute aqueous industrial streams". **Journal of Separation Process Technology.** 1(2) : 23-30.

Roukas, T. 1998. "Pretreatment of Beet Molasses to increase Pullulan Production". **Process Biochem.** 33(8) : 805-810.

Satyanarayana, M., Raju, D.C. and Prabhakar, G. 1992. " Bioproduction of riboflavin from molasses and lentils". **Bioprocess and Biosystems Engineering.** 8 : 247-249

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.

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.

Shoda, M. 2004. "Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium". **Biotechnol. Progr**. 20 : 1366– 1371.

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.

Vandegraft, E.E., Hesseltine, C.W. and Shotwell, O.L. 1975. " Grain preservative : Effect on Aflatoxin and ochratoxin production". **Cereal Chemists**. 52 : 79 – 84.

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 .

Wee, Y. 2004. "Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of Enterococcus faecalis". **Enzyme and Microbial Technology**. 35 : 568-573.

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.

Yutaka Tokiwa. 2007. "Production of d-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by Lactobacillus delbrueckii". **Biotechnology Letters** 29 : 1329-1332

Coconut Development Board, [Online]. Available : http://coconutboard.nic.in/tendnutr.htm, 10 September 2012

# ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก
## อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

**1.1 อาหารเหลว (MRS broth)** 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 agar) 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

## 2. สารเคมี

**สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 3**

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

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

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

# ภาคผนวก ข

## วิธีวิเคราะห์

### 1. การวิเคราะห์น้ำตาลแลกโตส วิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (DuBois,1956)

**อุปกรณ์**

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

**สารเคมี**

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

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

**วิธีการ**

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

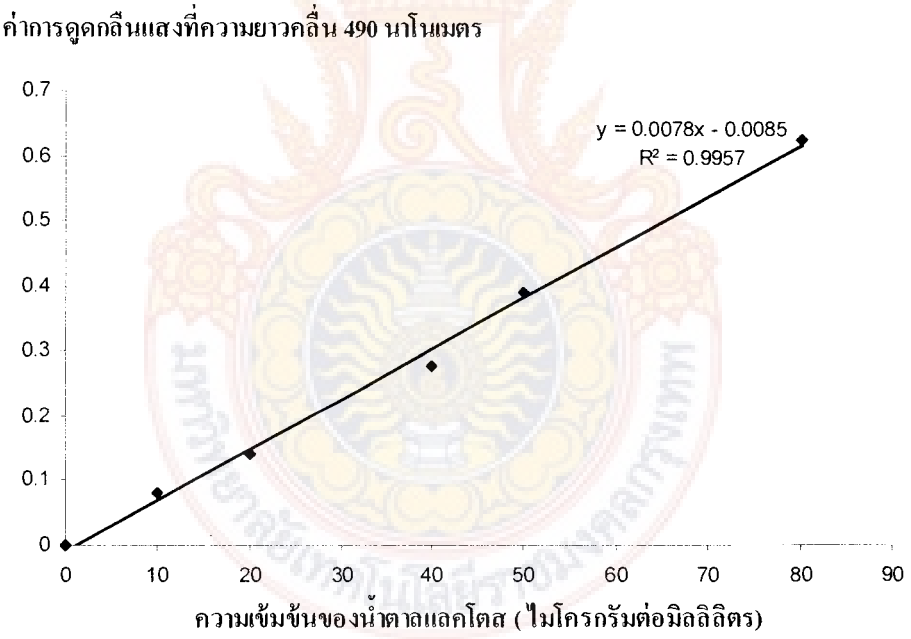
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆปล่อยลงที่ข้างหลอด

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

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของแลคโตสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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




ภาพที่ ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้น 0 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## 2. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกด้วย HPLC

### 2.1 สภาวะที่ใช้ในวิเคราะห์กรดโพรพิโอนิกด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะที่ใช้ในวิเคราะห์กรดโพรพิโอนิกด้วยเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

คอลัมน์ : Inertsil C8-3

เฟสเคลื่อนที่ : โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ : 20 ไมโครลิตร

เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง : 30 นาที

เครื่องตรวจสอบ : เครื่อง UV visible ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

การเตรียมตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ : ตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้มาจากส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงจากตัวอย่างที่เก็บเพื่อทำการวิเคราะห์ทุกชั่วโมง กรองส่วนใสผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อนการวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วย HPLC

**2.2 การขั้นตอนการใช้เครื่อง HPLC อย่างละเอียด**

**2.2.1 ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC**

1. เปิดเครื่องทุกยูนิตของ HPLC
2. ยก Sinker ใส่ในขวดของ เฟสเคลื่อนที่
3. เปิด Drain ของปั๊มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั๊ม
4. ให้สังเกตว่าในสายของ Sinker มีฟองอากาสอยู่รึเปล่า ถ้ายังมีอยู่ให้กด Purge ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
5. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจนปั๊มหยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ปั๊มหยุดทำงาน
6. ปิด Drain valve ที่ปั๊ม
7. ตั้งค่าอัตราการไหล, ค่าความดันสูงสุด และค่าความดันต่ำสุด ที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับปั๊ม (ค่าความดันสูงสุดคือความดันที่คอลัมภ์สามารถรับได้สูงที่สุด)
8. ตั้งพารามิเตอร์ให้กับเครื่องตรวจสอบ
9. สั่งให้ปั๊มทำงานตามสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

**2.2.2 ขั้นตอนการเปลี่ยน เฟสเคลื่อนที่**

1. ปิดปั๊ม HPLC
2. เทเฟสเคลื่อนที่ใหม่ลงในบีกเกอร์
3. เปิด Drain ของปั๊มแล้วกดปุ่ม Purge ที่ปั๊ม
4. ยก Sinker ออกจากเฟสเคลื่อนที่เก่า แล้วจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มีเฟสเคลื่อนที่ใหม่อยู่
5. รอจนปั๊มดูดเฟสเคลื่อนที่ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20 – 30 มิลลิลิตร
6. ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของ Sinker ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาด แล้วนำ Sinker จุ่มลงในขวดของ เฟสเคลื่อนที่ ใหม่

7. ในระหว่างขั้นตอนที่ 1- 6 ถ้าปั๊มหยุดทำงาน ให้กดปุ่ม Purge อีกครั้ง
8. ให้สังเกตว่าสายของ Sinker มีฟองอากาศอยู่หรือเปล่า ถ้ายังมีให้กด Purge ให้ ปั๊มทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
9. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจนปั๊มหยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ปั๊มหยุดทำงาน
10. ปิด Drain valve ที่ปั๊มแล้วสั่งให้ปั๊มทำงานตามสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

**หมายเหตุ** : การเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ต้องตำนึงถึงด้วยว่าเฟสเคลื่อนที่เก่าและใหม่เข้ากันหรือเปล่า ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันได้ต้องใช้สารชนิดอื่นเป็นตัวเชื่อมกลาง โดย run เฟสเคลื่อนที่ ตัวเชื่อมกลางอย่างน้อย 20 นาที

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

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

**2.2.3 ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง**

1. ตรวจดูสถานะของเครื่องแสดงผลให้อยู่ในสถานะ Ready
2. ตรวจดูให้แน่ใจว่าเครื่องตรวจสอบอยู่ในสถานะ Ready
3. รอจน Baseline ค่อนข้างนิ่ง
4. ถ้า Baseline นิ่งอยู่ที่ตำแหน่งสูงกว่าศูนย์เล็กน้อย สามารถสั่งศูนย์อัตโนมัติกด Z
5. ทำการฉีดตัวอย่าง

ตัวอย่าง การฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC

ล้างเข็มฉีดตัวอย่างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง

↓

ล้าง เข็มฉีดตัวอย่างด้วยตัวอย่างที่ต้องการจะฉีด 3 ครั้ง

↓

ดูดตัวอย่างโดยไม่ให้มีฟองอากาศในเข็มฉีดตัวอย่างแล้ว
ปรับปริมาตรให้ได้ตามที่จะฉีดเข้าระบบ HPLC

↓

แทงเข็มเข้าไปใน injector ให้สุด โดย injector ต้องอยู่ที่ตำแหน่ง **INJECT**

↓

ฉีด sample เข้าไปใน sample loop ของ injector

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

↓

เมื่อ HPLC system พร้อม ให้บิด injector มาตำแหน่ง **LOAD**

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

↓

รอประมาณ 5-10 วินาที แล้วดึง เข็มฉีดตัวอย่าง ออกจาก injector

↓

ล้าง injector ด้วยน้ำกลั่น 5-10 ml แล้วตามด้วยอากาศ 10-20 ml โดยใช้เข็มฉีดตัวอย่างพลาสติก

↓

เตรียมพร้อมฉีดตัวอย่างต่อไป

**2.2.4 ขั้นตอนการปิดเครื่อง**

1. หลังจาก ฉีดตัวอย่างสุดท้ายเสร็จแล้ว ให้ Run เฟสเคลื่อนที่ ต่ออีกประมาณ 30 นาที
2. สั่งปิดปั๊ม
3. ปิดเครื่อง HPLC แล้วยก Sinker ให้พ้นเฟสเคลื่อนที่

**หมายเหตุ** : กรณีที่จะหยุดใช้ เครื่องมากกว่า 2 วันต้องทำการล้างระบบก่อนปิดเครื่อง

**2.2.5 ขั้นตอนการล้างเครื่อง (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน)**

1. Run เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run เฟสเคลื่อนที่ใช้เก็บคอลัมภ์ 30 นาที
3. ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

**หมายเหตุ**

1. การเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้งานมาเป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้เก็บคอลัมภ์ ต้องระวังการผสมกันระหว่าง เฟสเคลื่อนที่ทั้ง 2 ว่าสามารถผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันได้ดีต้องมีเฟสเคลื่อนที่ขั้นกลางอย่างละ 30 นาที
2. การล้างใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที หรือน้อยกว่า ขึ้นกับชนิดของคอลัมภ์

ตัวอย่าง การล้างเครื่อง โดยมี เฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารละลายบัพเฟอร์ และเฟสเคลื่อนที่ที่เก็บคอลัมภ์เป็น 70% MeOH

สารละลายบัฟเฟอร์ 30 นาที

↓

น้ำกลั่น (เฟสเคลื่อนที่ขั้นกลาง) 30นาที

↓

70% MeOH 30 นาที

↓

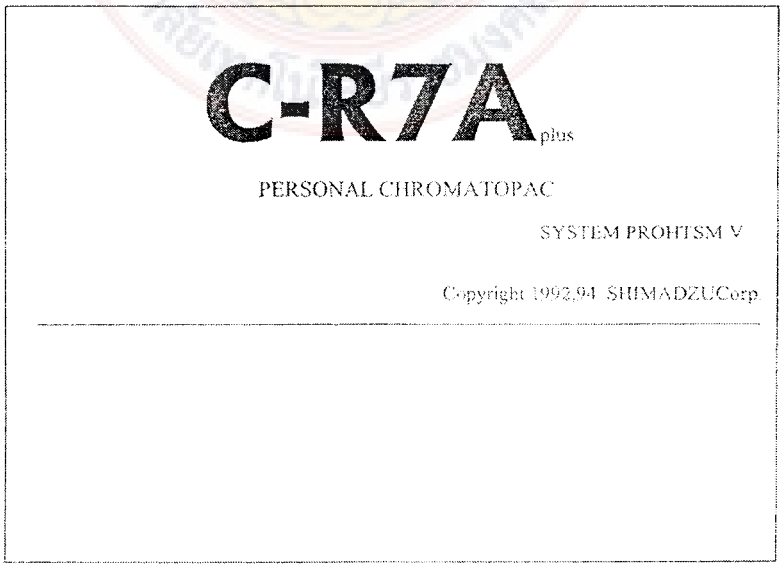
ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

**2.2.6 ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน)**

1. Run เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เก็บคอลัมภ์ 1 ชม.
3. หยุดปั๊มแล้วถอดคอลัมภ์ออกจากระบบ แล้วต่อ pipe เปล่าแทนที่และปิดคอลัมภ์ด้วย plug ให้แน่น
4. เปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็น 70% MeOH แล้ว run เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง
5. ปิดปั๊ม และปิดเครื่อง HPLC ทุกยูนิท
6. ยก sinker ออกจากขวด เฟสเคลื่อนที่ แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

**2.2.7 ขั้นตอนการใช้งาน C-R7A**

1. กดปุ่มเปิดเครื่อง C-R7A ในกรณีที่มี 2 Drive ให้ใส่แผ่น System disk ใน Drive 1 และแผ่นเก็บข้อมูลใน Drive 2 หน้าจอจะปรากฏ



2. กด WIN 1 จะปรากฏหน้าจอ Menu ของ WIN 1 เลือกข้อ 2 ตามด้วย **ENTER** จะปรากฏ เลือก L เพื่อเรียก Analysis File ในกรณีเคยสร้าง File เก็บไว้

E ในกรณีที่ต้องการสร้าง Analysis File ใหม่หรือแก้ไข File ที่ถูก Load ขึ้นมาใช้งาน

R ในกรณีที่ต้องการแก้ไขค่าบางค่าใน Analysis File ที่ Load ขึ้นมาใช้งานอยู่

A ในกรรีที่ต้องการให้มีการ Save อัตโนมัติ Analysis File กับทุกๆครั้งของการฉีด

**วิธีสร้าง Analysis File ใหม่**

- เลือก **E** จะปรากฏหน้าจอของ Analysis File
- แก้ไขพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ WIDTH 5
  DRIFT(uV/min) 0
  และ T.DBL(min) 1000
- กด **EXIT** เพื่อออกจากหน้าจอ จะปรากฏคำถาม | Save FILE? Y : yes N: no | กด **Y** จะปรากฏ

| |
|---|
| Part 1: |
| File Name 2: |

กำหนด Drive และชื่อ Analysis File ตามที่ต้องการตรงตำแหน่ง File Name ตามด้วย **ENTER** เช่น

| |
|---|
| Part 1: |
| File Name 2: ALCOHOL |

หลังจากการ save เครื่องจะกลับเข้าสู่หน้า Menu ของ WIN1

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

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

เลือก S เมื่อต้องการตั้งชื่อ File สำหรับ save จะปรากฏ

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

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

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

เลือก R เมื่อต้องการยกเลิกการตั้งชื่อข้างต้น

C ยกเลิกการ Save ของโครมาโตแกรมสุดท้าย

A เมื่อต้องการให้เครื่อง save อัตโนมัติในชื่อที่เครื่องกำหนด

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

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

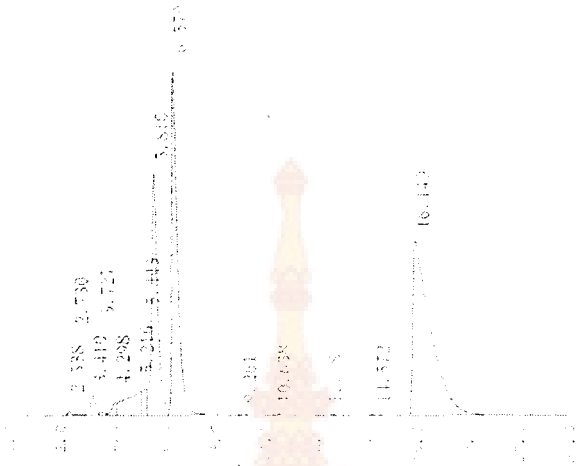
6. Menu ของ WIN1 เลือกข้อ 2 และเข้ามาแก้ไขใน Analysis file

7. เมื่อ Baseline นิ่งให้กด Z เพื่อ Zero สัญญาณ และให้ทำการฉีดสารพร้อมกด START

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

**2.2.8 ตัวอย่างโครมาโตแกรม**

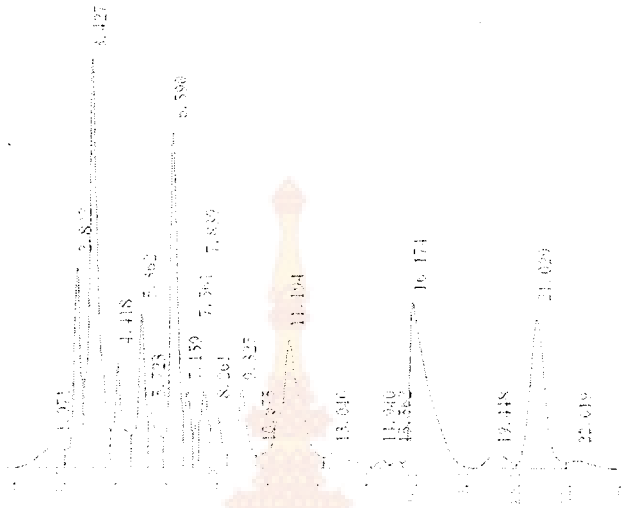
โครมาโตแกรมของสารมาตราฐานกรดแลคติก อะซิติก โพรพิโอนิก แสดงดังภาพ ข-2 แสดงให้เห็นค่า retention time ของกรดแต่ละชนิด โดย retention time ของกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 5.81, 6.57 และ 16.1 นาที ตามลำดับ



ภาพที่ ข-2 แสดงค่า Retention time ของกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก

โครมาโตแกรมของกรดโพรพิโอนิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย เวย์เติมยีสต์สกัด ปริมาณร้อยละ 1 เติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณร้อยละ 1 เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตรและแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร เติมหัวเชื้อกรดโพรพิโอนิกร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ที่ชั่วโมงเริ่มต้น และชั่วโมงที่ 566 แสดงดังภาพที่ ข-3 และ ข-4 ตามลำดับ

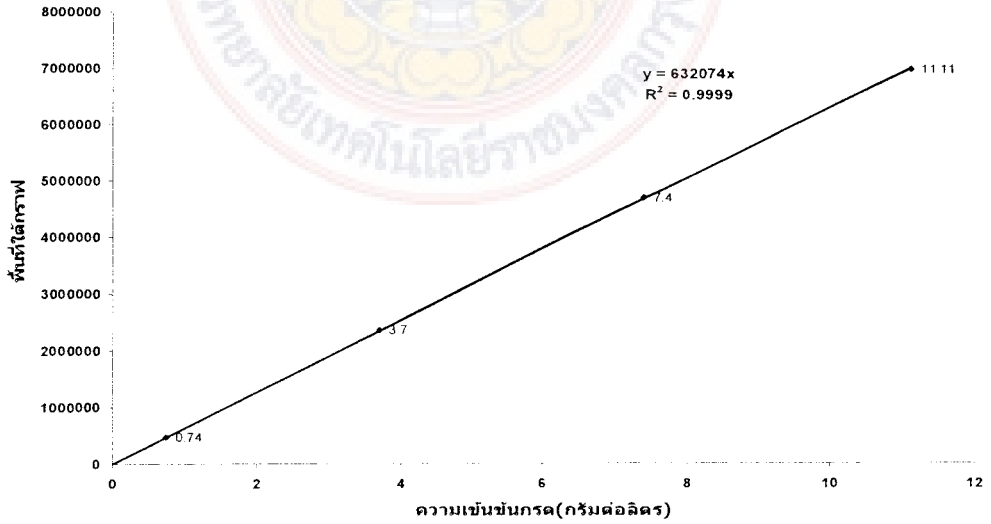
ภาพที่ ข-3 โครมาโตแกรมของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ชั่วโมงเริ่มต้น



ภาพที่ ข-4 โครมาโตแกรมของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตจากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ชั่วโมง 566

**2.2.9 การทำกราฟมาตรฐานกรดโพรพิโอนิก**

1. เตรียมสารละลายมาตราฐานของกรดโพรพิโอนิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
2. กรองผ่านผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
4. วิเคราะห์ด้วย HPLC เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง
5. เขียนกราฟมาตราฐานระหว่างความเข้มข้น(แกนX) กับพื้นที่ใต้กราฟ (แกนY)




ภาพที่ ข-5 กราฟมาตรฐานของกรดโพรพิโอนิกที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆ