1. บทนำ

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทรา ยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นต้นเหตุให้ผลิตภัณฑ์อาหารเกิดการเน่าเสีย นิยมใช้เป็นวัตถุกันเสียทางชีวภาพ (biopreservatives) และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Schwenninger และ Meile, 2004) นอกจากนี้มีการใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นส่วนผสมในยาควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจ สารให้กลิ่นรส (Himmi และคณะ, 2000) และใช้ในอุตสาหกรรมการทำพลาสติกในรูปของ cellulose propionate (Barbirato และคณะ, 1997) ปัจจุบันการใช้กรดโพรพิโอนิกในอาหารสัตว์มีความสำคัญมาก เนื่องจากมีข้อตกลงของสหภาพฯยุโรป ให้เพิกถอนการอนุญาตใช้สารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโตแม้ว่ายังไม่มีการออกเป็นข้อบังคับ แต่ในทางปฏิบัติการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อเร่งการเจริญเติบโต (antibiotic growth promoter ; AGPs) ก็มีปริมาณลดลง ผู้เลี้ยงสัตว์ที่ต้องการจำหน่ายผลิตผลจึงต้องค้นหาสารอื่นเพื่อทดแทนสารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ โดยมีความพยายามค้นหาสารประกอบที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ หนึ่งในสารที่ให้ผลดี คือกรดอินทรีย์ ทั้งในรูปกรดโดยตรงหรือเกลือของกรด กรดโพรพิโอนิกก็เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่อยู่ในความสนใจ เนื่องจากการทำงานของกรดซึ่งมีการแตกตัวภายในเซลล์ของผนังลำไส้ ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สารsecretin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นการหลั่งน้ำย่อยออกจากตับอ่อน จึงมีประโยชน์นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยมีผลต่อการย่อยที่ดีและส่งผลในทางบวกต่อสมรรถนะการแพร่ออกจากเซลล์ (Dibner, 2004)

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตทางการค้านิยมใช้กระบวนการทางเคมี แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือต้นทุนการผลิตสูงเนื่องจากขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์มีความยุ่งยากซับซ้อน และใช้สารเริ่มต้นในการผลิตที่เป็นอันตราย ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีการศึกษาเพื่อพัฒนาปรับปรุงการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งมีผลดีคือต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีความเป็นพิษ แต่มีข้อเสียคือ ใช้เวลาในการผลิตนาน (Ozadali และคณะ, 1995) ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการต่างๆ ซึ่งการตรึงเซลล์ การใช้เชื้อผสมและการปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสม เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มผลผลิต การทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อนำเวย์ ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็งมาใช้เป็นสับสเตรต เพื่อปรับปรุงสูตรอาหารที่เหมาะสมและเพิ่มผลผลิตกรดโพรพิโอนิกอีกโดยการตรึงเซลล์ของเชื้อผสมระหว่าง *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 และ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงกระบวนการผลิตทางชีวภาพให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 วัตถุดิบ

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

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

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

2.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

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

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

2.2.2 วิธีการตรึงเซลล์ (ประยุกต์จากสุรีย์ ทองวณิชนิยม, 2543)

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นจากข้อ2.2.1 โดยใช้ปริมาตรของเชื้อแต่ละชนิดในปริมาณร้อยละ5 นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 นำเซลล์ที่ปั่นแยกได้ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

ดูดสารละลายเจลผ่านสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.89 มิลลิเมตร (TYGON TUBING 2-STOP) ของบริษัท Cole-Parmer Instrument ที่ประกอบเข้ากับเครื่อง peristaltic pump โดยปลายด้านหนึ่งของสายยางจุ่มอยู่ในสารละลายเจล ส่วนปลายอีกด้านอยู่เหนือสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นระยะทาง 5 เซนติเมตร ปรับอัตราการไหลของสารละลายเจลให้เท่ากับ 7 มิลลิลิตรต่อนาที กดปุ่มเริ่มการทำงานของเครื่อง peristaltic pump เมื่อสารละลายเจลถูกปล่อยลงในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ เม็ดเจลของแคลเซียมอัลจิเนตจะเกิดขึ้นทันทีในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ จากนั้นนำเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมัก

2.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย (สุรนารถ อร่ามเรือง.2550)

สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัยมีดังนี้

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

2.4 ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อผสมของ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ที่เป็นเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

2.4.1 การผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อผสมที่แป็นเซลล์อิสระ

ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.4 ลิตร (ร้อยละ70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อที่เป็นเซลล์อิสระและทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชที่6.5 ไม่ต้องพ่นอากาศ (Quesada-Chantao. 1994 ;Paik และ Glatz.1994) มีการกวนในอัตรา 150 รอบต่อนาที เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะคงที่ โดยวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และกรดแลคติกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมภ์ Inertsil C8-3 มีโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (himmi และคณะ,2000 และGoswami 2000) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแลคโตสโดยวิธีของ Dobois, 1956

2.4.2 การผลิตกรดโพรพิโอนิกของเชื้อผสมที่แป็นเซลล์ตรึง

ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.4 ลิตร (ร้อยละ70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อที่เป็นเซลล์ตรึงลงในถังหมัก สำหรับสภาวะที่ใช้ในการหมัก และการวิเคราะห์ผลการทดลองทำเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1

2.5 ศึกษาศักยภาพของเชื้อผสมที่ถูกตรึงโดยการนำมาใช้ซ้ำ (cell recycle)เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก

ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.4 ลิตร (ร้อยละ70) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 0.1) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อที่เป็นเซลล์ตรึงลงในถังหมัก สภาวะที่ใช้ในการหมักทำเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1 เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะคงที่ จากนั้นทำการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในถังหมักออก และล้างเซลล์ตรึงด้วยน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง นำอาหารเลี้ยงเชื้อชุดใหม่ปริมาณ 1.4 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมลงในถังหมัก ทำการหมักในสภาวะเช่นเดิม เก็บน้ำหมักที่ได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกจะคงที่ ทำซ้ำเช่นนี้จนกระทั่งปริมาณกรดลดลง บันทึกจำนวนครั้งของการหมัก และวิเคราะห์ผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1

2.6 ศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ในการยับยั้งเชื้อรา และยีสต์เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายในทางการค้า

ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์ของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้โดยวิธี agar disc diffusion method โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ดังนี้

2.6.1 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

ทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ spread plate โดยทำสารละลายสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายสปอร์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วลนไฟเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วอาหาร ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้า (ในความเข้มข้นที่เท่ากัน) และน้ำกลั่น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนแผ่นกลมซึ่งเตรียมจากกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 5 มม. ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ปากคีบคีบแผ่นกลมไปวางบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่ทำการ spread เชื้อรา บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราวัดได้จากบริเวณการยับยั้ง(โซนใส) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกทั้ง 2 ชนิด