สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.6.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อยีสต์

ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ spread plate โดยทำสารละลายเซลล์ปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายเซลล์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วลนไฟเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วอาหาร ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้า (ในความเข้มข้นที่เท่ากัน) และน้ำกลั่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนแผ่นกลม (paper disc) ซึ่งเตรียมจากกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 5 มม. ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ปากคีบคีบแผ่นกลมไปวางบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่ทำการ spread เชื้อยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อยีสต์วัดได้จากบริเวณการยับยั้ง(โซนใส) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อยีสต์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกทั้ง 2 ชนิด

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อผสมของ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ที่เป็นเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

การศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ที่เป็นเซลล์อิสระ พบว่าปริมาณกรดแลคติกมีปริมาณสูงสุด 4.93 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ และได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 17.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 หลังจากนั้นปริมาณกรดโพรพิโอนิกมีแนวโน้มที่จะคงที่ไปเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง เริ่มต้นมีปริมาณน้ำตาลแลคโตส 40 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งไม่เหลือน้ำตาลแลคโตสในน้ำหมัก สำหรับเซลล์ที่ถูกตรึง พบว่ามีปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 17.84 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 มีปริมาณกรดแลคติก 5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นมีปริมาณ 40 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลมีแนวโน้มลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง พบว่าไม่มีน้ำตาลแลคโตสเหลืออยู่ในน้ำหมัก ดังแสดงในรูปที่ 3.1

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกของเซลล์อิสระได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกน้อยกว่าการใช้เซลล์ตรึง อาจเนื่องมาจากการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงจะสามารถควบคุมกระบวนการได้ง่ายกว่าการใช้เซลล์อิสระ อีกทั้งมีความคงตัวมากกว่าเซลล์อิสระ (Jianlong , 2000)

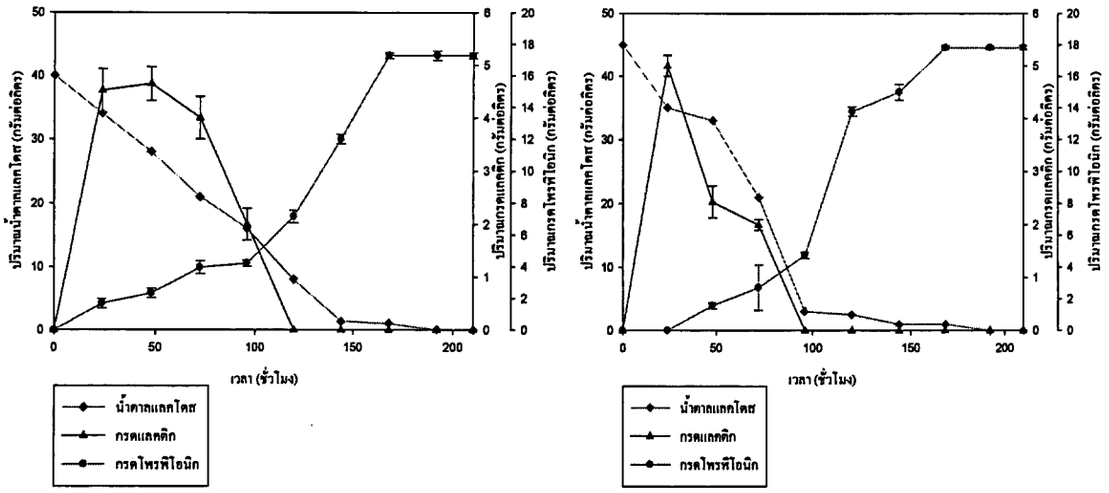
ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yang และคณะ (1994) ที่ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเวย์โดยใช้เซลล์ตรึงของ *Propionibacterium acidipropionici* ในสภาวะการหมักแบบกะ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเวย์ที่มีปริมาณแลคโตส 45 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 20 กรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการหมัก 55 ชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาณผลผลิตที่สูงกว่าและใช้เวลาในการหมักน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระ

Yang และ Huang (1995) ศึกษาการผลิตโพรพิโอเนตจากเวย์โดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4875 ร่วมกับ *L. lactis* ทำการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เชื้อ *L. lactis* สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสในเวย์เปลี่ยนไปเป็นแลคเตต เพื่อให้เชื้อ *P. acidipropionici* ใช้แลคเตตเป็นซับสเตรตในการผลิตโพรพิโอเนต จากการศึกษาพบว่าในการเปลี่ยนแลคเตตไปเป็นโพรพิโอเนตจะช้ากว่าการเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสไปเป็นแลคเตต และในการหมักจะได้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 10 ก.ย. 2553
เลขทะเบียน 229804
เลขเรียกหนังสือ

ผลผลิตคล้ายกับการหมักโดยใช้เชื้อเดี่ยวของ *Propionibacterium* ผลการศึกษาได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิก 17 กรัมต่อลิตร

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



(ก) (ข)

รูปที่ 3.1 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระ (ก) และเซลล์ตรึง (ข) ของเชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการใช้เชื้อผสมในการผลิตกรดโพรพิโอนิกเมื่อใช้เซลล์อิสระกับเซลล์ตรึงแสดงดังตารางที่3.1 คือปริมาณกรด ผลผลิตกรด และอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก ทั้งการผลิตโดยการใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นการใช้เซลล์ตรึงในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจึงดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ เพราะสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ในการหมักได้อีกครั้ง

ตารางที่ 3.1 แสดงค่า P-value ของการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณกรดโพรพิโอนิกจากการใช้เซลล์อิสระกับตรึงของการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อผสมเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ลักษณะเซลล์	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรชั่วโมง)
เซลล์อิสระ	17.27	0.443	0.103
เซลล์ตรึง	17.84	0.446	0.106
ค่า p-value	0.294 ^{ns}	0.695 ^{ns}	0.878 ^{ns}

หมายเหตุ

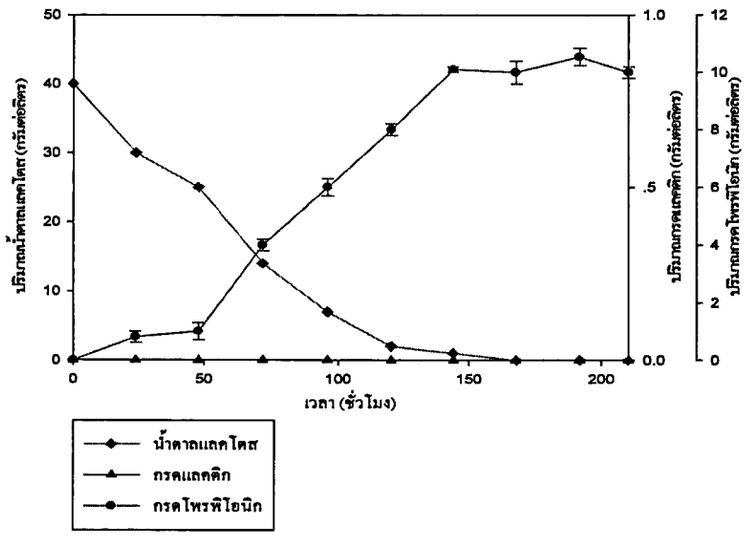
** ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

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

ns ค่า p-value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

3.2 ผลการศึกษาศักยภาพของเชื้อผสมที่ถูกตรึงโดยการนำมาใช้ซ้ำ (cell recycle) เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก

การศึกษาการใช้ประโยชน์จากเซลล์ตรึงในการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ในกระบวนการหมักใหม่ได้อีก 1 ครั้ง เนื่องจากในการหมักมีการควบคุมพีเอชโดยการใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จึงทำให้เจลที่นำมาห่อหุ้มเซลล์เปื่อยยุ่ย เซลล์ที่ถูกตรึงจึงมีประสิทธิภาพเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกเพียงแค่ครั้งเดียว รวมจำนวนรอบที่นำเซลล์ตรึงมาใช้ในการหมักคือ 2 รอบ ซึ่งในการหมักรอบที่ 2 ได้ปริมาณกรด โพรพิโอนิก 10.54 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 192 และไม่มีปริมาณกรดแลคติกในน้ำหมัก สำหรับปริมาณน้ำตาลแลคโตสเริ่มต้นมีปริมาณ 40 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักปริมาณน้ำตาลมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ดังแสดงในรูปที่ 3.2



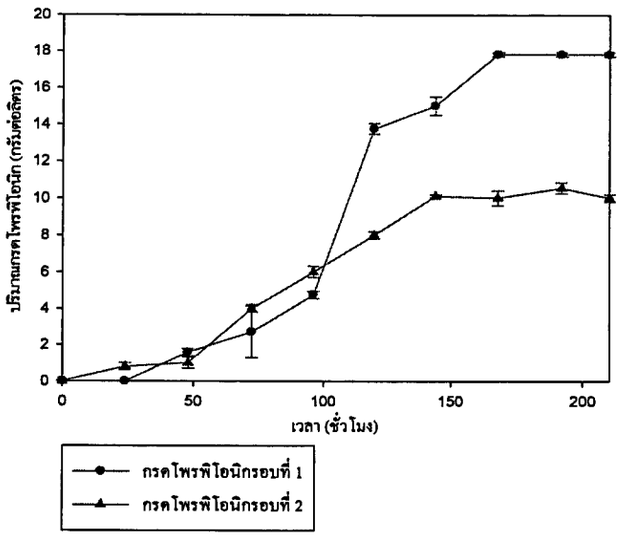
รูปที่ 3.2 แสดงปริมาณน้ำตาลแลคโตส กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้อัตราการ กวน 150 รอบต่อนาที เมื่อทำการหมักในรอบที่ 2

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการหมักในรอบที่1 และรอบที่2 พบว่าในการหมักรอบที่ 1 ได้ปริมาณกรดสูงกว่ารอบที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 3.3 อาจเนื่องมาจากการใช้เซลล์ตรึงนั้นตัวเซลล์จะถูกห่อหุ้มด้วยเจลจึงทำให้กรดที่ผลิตได้ไม่สามารถหลุดออกมาจากเม็ดเจลได้หมด จึงเกิดการสะสมของกรดภายในเม็ดเจล เมื่อปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่เชื้อผลิตมานั้นมีความเข้มข้นสูงจนเป็นเหตุให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (product inhibition) จึงส่งผลให้เชื้อผลิตกรดได้น้อยลงในการหมักรอบที่ 2 แต่ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงคือสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำได้

มีการทดลองของ Rickert และคณะ(1998) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium thoenii* P20 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้กลูโคสและแลคเตตเป็นซับสเตรต วิเคราะห์ผลที่รอบที่ 6 ของระยะการหมัก ซึ่ง 1 รอบการหมักใช้เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้กลูโคส ปริมาณ 75 กรัมต่อลิตร และแลคเตตปริมาณ 42 กรัมต่อลิตร จะได้ผลผลิตโพรพิโอเนต 34 กรัมต่อลิตร และ 22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Ates และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *Aspergillus niger* เปรียบเทียบระหว่างเซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยมีน้ำมันซิลิโคนช่วยในการเติมออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการใช้เซลล์ตรึงให้ผลผลิตกรดซิตริก 13 กรัมต่อลิตร มากกว่าการเลี้ยงเซลล์อิสระที่ให้ปริมาณผลผลิต 4

กรัมต่อลิตร และในการทดสอบประสิทธิภาพในการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ พบว่าเซลล์ตรึงของเชื้อ *Aspergillus niger* สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 4 รอบการหมัก แต่เมื่อปริมาณรอบการหมักเพิ่มขึ้น ผลผลิตที่ได้จะลดลง เนื่องจากมีการสะสมของกรดซิตริกในเม็ดเจล ทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ซิเตรทซินเทส (citrate syntase) ที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก



รูปที่ 3.3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดโพรพิโอนิกในผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อผสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในการหมักรอบที่1 และ 2

เมื่อนำปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากการหมักในรอบที่ 1 และรอบที่ 2 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรด ผลผลิตกรด และอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในการหมักรอบที่ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

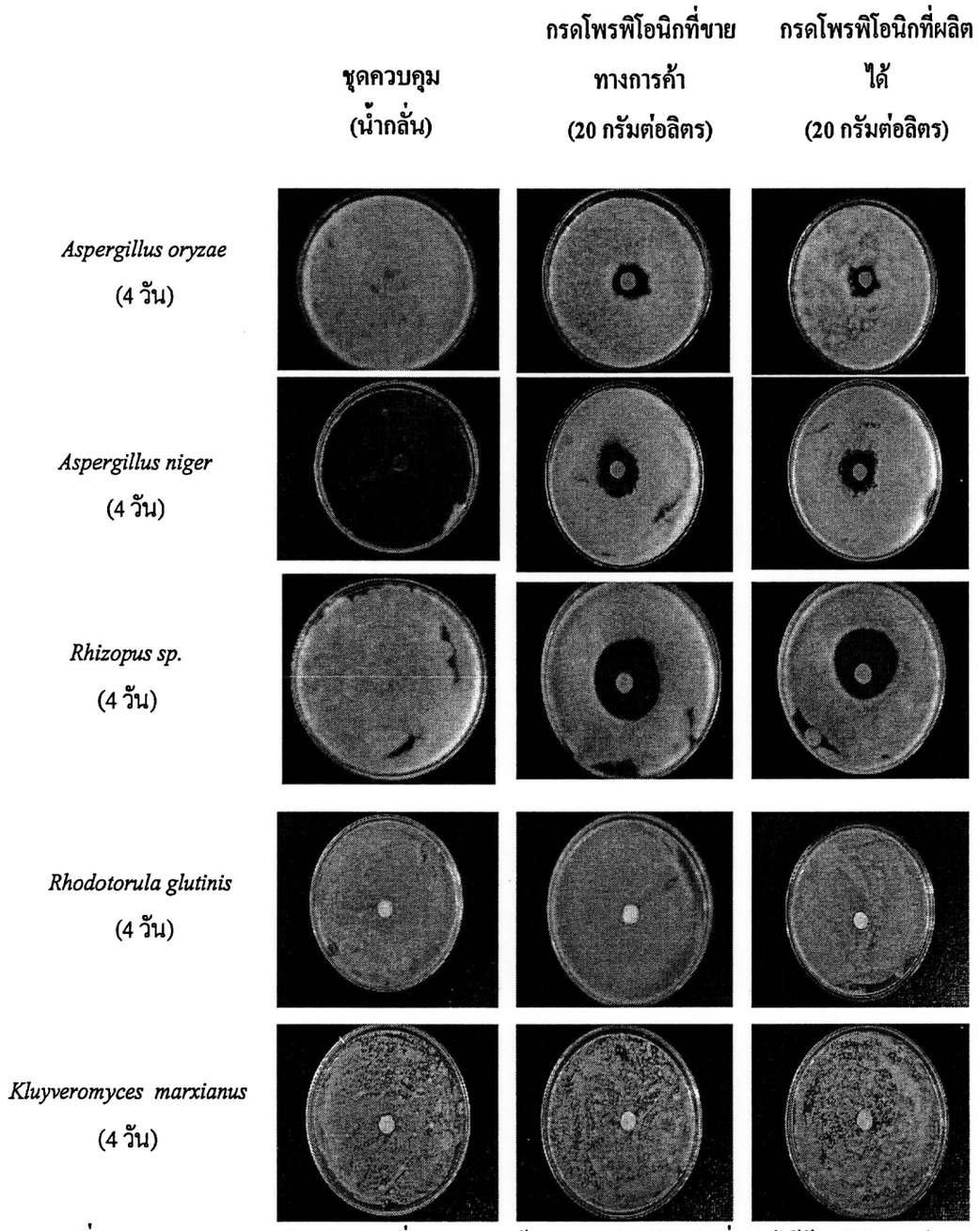
ตารางที่3.2 แสดงค่า P-value ของการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณกรดโพรพิโอนิกในชั่วโมงที่ 168 จากการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อผสมในการหมักรอบที่1 และรอบที่ 2

จำนวนรอบของการหมัก	ปริมาณกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก (กรัมต่อลิตรชั่วโมง)
1	17.84	0.446	0.106
2	10.54	0.234	0.063
ค่า p-value	0.002^{*}	0.067^{ns}	0.065^{ns}

3.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ในการยับยั้งเชื้อรา และยีสต์เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายในทางการค้า

เมื่อนำกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ทดสอบการยับยั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์เปรียบเทียบกับกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายด้วยวิธีทางเคมี ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.4 จากการศึกษาพบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพซึ่งมีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus*

niger และ *Rhizopus sp.* ได้บริเวณยับยั้ง 1.94, 2.46 และ 3.42 ตามลำดับ ส่วนกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้าที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรได้บริเวณยับยั้ง 1.97, 2.16 และ 3.58 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งของกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้าที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันพบว่าบริเวณยับยั้งมีขนาดใกล้เคียงกันซึ่งการศึกษาประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกที่มีต่อเชื้อราของ Helena Lind และคณะ, 2004 ได้ศึกษาผลของกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆในการยับยั้งเชื้อรา พบว่ากรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้จากวิธีทางชีวภาพมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา สำหรับเชื้อยีสต์ *Rhodotorula glutinis* และ *Kluyveromyces marxianus* จากการศึกษา พบว่าไม่มีบริเวณยับยั้งในชุดการทดลองที่มีกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพและกรด โพรพิโอนิกที่ผลิตขายทางการค้า แสดงว่ากรดโพรพิโอนิกไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อยีสต์ได้



รูปที่ 3.4 แสดงผลของกรดโพรพิโอนิกที่ขายทางการค้าและกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้ด้วยวิธีชีวภาพในการยับยั้งเชื้อรา และเชื้อยีสต์ ด้วยวิธี Agar diffusion method