



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสโดย *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273

Optimization of the Trehalose Production by *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273

นามผู้วิจัย นางสาวสุคนธ์ทิพย์ เสือเต่า

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจกสุสสถิตย์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สำโรจน์ ศิริคันสนียกุล, Dr.rer.nat.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงห์ มตาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสโดย
Propionibacterium acidipropionici DSM 20273

Optimization of the Trehalose Production by
Propionibacterium acidipropionici DSM 20273

โดย

นางสาวสุคนธ์ทิพย์ เสือเผ่า

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2557

สุคนธ์ทิพย์ เสือเผ่า 2557: การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสโดย
Propionibacterium acidipropionici DSM 20273 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจุกสุขสถิตย์, Ph.D. 150 หน้า

ทรีฮาโลสเป็นน้ำตาลไคแซ็กคาไรด์ที่ไม่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และเวชภัณฑ์ จุลินทรีย์จะผลิตทรีฮาโลสเพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอน และเพื่อปกป้องตนเองเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 โดยอาศัยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทะกุกิ โดยทำการศึกษา 4 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นแลกโทส พีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ และอัตราการเขย่า พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลส ประกอบด้วย ความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่สภาวะนี้จะได้ความเข้มข้นของทรีฮาโลสสูงสุดเท่ากับ 595 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 168 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตทรีฮาโลสมากที่สุด

เมื่อศึกษาผลของการปรับพีเอชต่อการผลิตทรีฮาโลสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DMS 20273 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ในอาหาร Complete medium ที่มีความเข้มข้นแลกโทสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 80 รอบต่อนาที ในสภาวะไร้อากาศ โดยทำการศึกษาผลของการปรับพีเอช 4 ครั้ง ได้แก่ ไม่มีการควบคุมพีเอช ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ครั้งที่ 1 ควบคุมพีเอชที่ 7 และควบคุมพีเอชที่ 5.5 ครั้งที่ 2 พบว่าการปรับพีเอชช่วยเพิ่มการสะสมทรีฮาโลส โดยอัตราการผลิตทรีฮาโลสเชิงปริมาณและผลได้ของทรีฮาโลส ต่อเซลล์มีค่าสูงสุดในช่วงควบคุมพีเอชที่ 7 (ช่วงเวลา 114.30 - 192 ชั่วโมง) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0098 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง และ 0.576 กรัมทรีฮาโลสต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อสามารถผลิตทรีฮาโลสได้ถึง 0.925 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพของการใช้แลกโทสมีค่าอยู่ที่ประมาณ 100 ± 10 เปอร์เซ็นต์

Sukontip Suethao 2014: Optimization of the Trehalose Production by
Propionibacterium acidipropionici DSM 20273. Master of Science (Biotechnology),
Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor:
Assistant Professor Pramuk Parakulsuksatid, Ph.D. 150 pages.

Trehalose is a non-reducing disaccharide, which is used widely in food, cosmetics and pharmaceutical industries. Microorganisms produce trehalose for use as a carbon source and to protect cells from stress conditions. In this study, the optimum conditions for trehalose production by *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 using Taguchi method were determined by four parameters: lactose concentration, initial pH, temperature and agitation rate. The trehalose production was optimum at lactose concentration 20 g/l, initial pH 7, temperature 30°C and agitation rate at 100 rpm. Under this condition, the highest yield of trehalose was produced at 595 mg/l at 168 h. Of the four parameters tested, the trehalose production was most affected by the temperature.

To investigate the effect of pH adjustment on trehalose production, the fermentation was performed in 3 L fermenter with complete medium under conditions: initial lactose concentration 20 g/l, initial pH 7, temperature 30°C, agitation rate at 80 rpm and anaerobic condition. The pH was adjusted to four times: non-control of pH, control of pH 5.5 part 1, control of pH 7 and control of pH 5.5 part 2. It was found that the pH adjustment increased the accumulation of trehalose. The highest volumetric productivity and yield of trehalose were found when controlling the pH at 7, during the period of 114.30 - 192 h (0.0098 g/l/h and 0.576 g trehalose/g cell, respectively). The concentration of trehalose reached 0.925 g/l at the end of the fermentation. Furthermore, the efficiency of the lactose consumption was around $100 \pm 10\%$.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประมุข ภาระกุลสุขสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. วิรัตน์ วาณิชศรีรัตนา ประธานการสอบ ที่กรุณาใช้เวลาอันมีค่าในการให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยสำหรับการศึกษาระดับปริญญาโท ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและมีความสมบูรณ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บัณฑิตวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2550 ขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว และพี่ชาย รวมถึงญาติพี่น้องทุกคนที่คอยให้กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้าตลอดมา ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สำหรับความช่วยเหลือ คำปรึกษา กำลังใจ และมิตรภาพที่ดีมาตลอด รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ธุรการที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัยเป็นอย่างดีตลอดมา

ประโยชน์และความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ คณาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอนและให้ความรู้จนถึงปัจจุบัน

สุคนธ์ทิพย์ เสือเต่า
มิถุนายน 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(11)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	28
อุปกรณ์	28
วิธีการ	30
ผลและวิจารณ์	36
สรุปและข้อเสนอแนะ	77
สรุป	77
ข้อเสนอแนะ	78
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	79
ภาคผนวก	90
ภาคผนวก ก ข้อมูลการทดลอง	91
ภาคผนวก ข การคำนวณ	114
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์	135
ภาคผนวก ง การประมาณค่าพารามิเตอร์ด้วยโปรแกรม Berkeley Madonna	145
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	150

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 คุณสมบัติของทรีฮาโลส	5
2 การใช้ประโยชน์ทรีฮาโลสในอุตสาหกรรมอาหาร	6
3 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง	31
4 สถานะการทดลองทั้ง 9 การทดลองจากการออกแบบโดยวิธีการทะกุกิ	31
5 ค่าพารามิเตอร์การเจริญเติบโตและการผลิตทรีฮาโลสของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 เมื่อใช้อาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่	49
6 ค่าอัตราส่วน S/N ของความเข้มข้นทรีฮาโลสจากการทดลองทั้ง 9 การทดลอง	51
7 การวิเคราะห์หัตถิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นทรีฮาโลสจากค่าอัตราส่วน S/N	52
8 ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นทรีฮาโลส (C_{Tre}) เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N	53
9 การวิเคราะห์หัตถิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นทรีฮาโลสจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง	54
10 ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นทรีฮาโลส (C_{Tre}) เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง	55
11 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความเข้มข้นทรีฮาโลสเมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N	56
12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความเข้มข้นทรีฮาโลสเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง	57
13 สถานะที่เหมาะสม และค่าคาดหวังของความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงสุดที่ประเมินได้	58
14 ค่าพารามิเตอร์การเจริญเติบโต, การผลิตทรีฮาโลส และกรดทั้งหมดของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสถานะที่มีการปรับพีเอช	66
15 ปริมาณคาร์บอน อัตราจำเพาะ และอัตราส่วนของการใช้คาร์บอน (R_C) ของสารอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในสถานะที่มีการปรับพีเอช	76

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที	92
ก2 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที	94
ก3 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที	96
ก4 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที	98
ก5 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที	100
ก6 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที	102
ก7 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที	104
ก8 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที	106
ก9 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที	108

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่

หน้า

ก10	ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนที่ 80 รอบต่อนาที ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีค่าเท่ากับ 7 โดยไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 2 (ค2) และควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 2 (ง)	110
ข1	สูตรทางเคมีและน้ำหนักโมเลกุลของสารที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในสภาวะที่มีการปรับพีเอช	132
ค1	การเตรียมสารละลายทรีฮาโลสมมาตรฐาน	139
ค2	การเตรียมสารละลายแลกโทสมมาตรฐาน	141
ค3	การเตรียมสารละลายกรดพรอพิโอนิกมาตรฐาน	142
ค4	การเตรียมสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน	143
ค5	การเตรียมสารละลายกรดซัคซินิกมาตรฐาน	144
ง1	ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1 และช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1	148

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	สูตรโครงสร้างทรีฮาโลส
2	ลักษณะรูปร่างของ <i>Propionibacterium acidipropionici</i>
3	กระบวนการเมแทบอลิซึมทรีฮาโลสของ <i>P. freudenreichii</i>
4	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 0 รอบต่อนาที
5	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที
6	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที
7	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที
8	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 0 รอบต่อนาที
9	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที
10	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที
11	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 0 รอบต่อนาที	47
13	ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นทรีฮาโลส (C_{Tre}) เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N	52
14	ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นทรีฮาโลส (C_{Tre}) เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง	54
15	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนที่ 80 รอบต่อนาที ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีค่าเท่ากับ 7 โดยไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 2 (ค2) และควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 2 (ง)	63
16	อัตราการผลิตเซลล์เชิงปริมาตร (Q_x) ของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ส่วนที่ 1 (ค1)	67
17	อัตราการใช้แลกโทสเชิงปริมาตร (Q_{Lac}) ของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ส่วนที่ 1 (ค)	68
18	อัตราการผลิตทรีฮาโลสเชิงปริมาตร (Q_{Tre}) ของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ส่วนที่ 1 (ค1)	69

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
19 อัตราการผลิตกรดทั้งหมดเชิงปริมาตร (Q_{Ta}) ของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ส่วนที่ 1 (ค1)	70
20 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ส่วนที่ 1 (ค1)	71
21 อัตราจำเพาะของการใช้แลคโทส (q_{Lac}) ของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ส่วนที่ 1 (ค1)	72
22 อัตราจำเพาะของการผลิตทรีฮาโลส (q_{Tre}) ของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ส่วนที่ 1 (ค1)	73
23 อัตราจำเพาะของการผลิตกรดทั้งหมด (q_{Ta}) ของเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ส่วนที่ 1 (ค1)	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ข1 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที	115
ข2 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที	116
ข3 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที	116
ข4 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที	117
ข5 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที	117
ข6 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที	118

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ข7 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้น แลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที	118
ข8 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้น แลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที	119
ข9 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้น แลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที	119
ข10 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในช่วงการเพาะเลี้ยง ที่ไม่ควบคุมพีเอช	120
ข11 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในช่วงการเพาะเลี้ยง ที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1	120
ข12 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในช่วงการเพาะเลี้ยง ที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1	121
ค1 กราฟน้ำหนักเซลล์แห้งมาตรฐาน	137
ค2 กราฟทริฮาโลสมาตรฐานที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC	139
ค3 กราฟแลกโทสมาตรฐานที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC	141
ค4 กราฟกรดพรวอพิโอนิกมาตรฐานที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC	142
ค5 กราฟกรดแอซีติกมาตรฐานที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC	143
ค6 กราฟกรดซักซินิกมาตรฐานที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC	144

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง1 การเขียนโปรแกรมในการทำ Curve fit ในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1	146
ง2 การเขียนโปรแกรมในการทำ Curve fit ในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1	147
ง3 การผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ <i>P. acidipropionici</i> DSM 20273 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1 (ช่วงการหมักที่เวลา 52 - 114 ชั่วโมง) และช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1 (ช่วงการหมักที่เวลา 114.5 - 192 ชั่วโมง): ความเข้มข้นทรีฮาโลส ($\diamond$) แลกโทส ($\circ$) และ Residual biomass (Δ) กับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (เส้น)	149

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ANOVA	=	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance)
C_X	=	ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร) (Concentration of cell)
C_R	=	ความเข้มข้น residual biomass (กรัมต่อลิตร) (Concentration of residual biomass)
C_{Tre}	=	ความเข้มข้นทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร) (Concentration of trehalose)
DOF	=	องศาความอิสระ (Degrees of freedom)
dB	=	หน่วยของ S/N ratio (เดซิเบล)
DOE	=	การออกแบบการทดลอง (Design of Experiment)
L	=	จำนวนระดับของปัจจัย
N	=	จำนวนการทดลอง (Number of results)
OA	=	ตารางแผนการทดลองของทฤษฎี (Orthogonal arrays)
Q_X	=	อัตราการผลิตเซลล์เชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง) (Volumetric production rate of cell)
Q_{Lac}	=	อัตราการใช้แลคโทสเชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง) (Volumetric consumption rate of lactose)
Q_{Tre}	=	อัตราการผลิตทรีฮาโลสเชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง) (Volumetric production rate of trehalose)
Q_{Ta}	=	อัตราการผลิตกรดทั้งหมดเชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง) (Volumetric production rate of total acids)
q_{Lac}	=	อัตราจำเพาะของการใช้แลคโทส (กรัมแลคโทสต่อกรัมเซลล์ ต่อชั่วโมง) (Specific rate of lactose consumption)
q_{Tre}	=	อัตราจำเพาะของการผลิตทรีฮาโลส (กรัมทรีฮาโลสต่อกรัมเซลล์ ต่อชั่วโมง) (Specific rate of trehalose production)
q_{Pro}	=	อัตราจำเพาะของการผลิตกรดพรอปิโอนิก (กรัมกรดพรอปิโอนิกต่อกรัมเซลล์ ต่อชั่วโมง) (Specific rate of propionic acid production)
q_{Ace}	=	อัตราจำเพาะของการกรดแอซิก (กรัมกรดแอซิกต่อกรัมเซลล์ ต่อชั่วโมง) (Specific rate of acetic acid production)
q_{Suc}	=	อัตราจำเพาะของการผลิตกรดซักซินิก (กรัมกรดซักซินิกต่อกรัมเซลล์ ต่อชั่วโมง) (Specific rate of succinic acid production)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

q_{Ta}	=	อัตราจำเพาะของการผลิตกรดทั้งหมด (กรัมกรดทั้งหมดต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง) (Specific rate of total acids production)
q_{CO_2}	=	อัตราจำเพาะของการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง) (Specific rate of carbon dioxide production)
r	=	จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง
S/N ratio	=	อัตราส่วนหรือค่าที่ได้จากการเปลี่ยนรูปของค่าตอบสนอง (Signal-to-noise ratio)
y	=	ผลการทดลอง (Result)
$Y_{X/Lac}$	=	ผลได้ของเซลล์ต่อแลกโทส (กรัมเซลล์ต่อกรัมแลกโทส) (Biomass yield from lactose)
$Y_{Tre/Lac}$	=	ผลได้ของทรีฮาโลสต่อแลกโทส (มิลลิกรัมทรีฮาโลสต่อกรัมแลกโทส) (Trehalose yield from lactose)
$Y_{Tre/X}$	=	ผลได้ของทรีฮาโลสต่อเซลล์ (มิลลิกรัมทรีฮาโลสต่อกรัมเซลล์) (Trehalose yield from biomass)
ตัวอักษรกรีก		
μ	=	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
μ_R	=	อัตราการเจริญจำเพาะของ Residual biomass (ต่อชั่วโมง)

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสโดย

Propionibacterium acidipropionici DSM 20273

Optimization of the Trehalose Production

by *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273

คำนำ

แบคทีเรียพรอพิโอนิกหลายสายพันธุ์มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เพราะแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนสารอาหารแหล่งคาร์บอน เช่น คาร์โบไฮเดรต และเกลือแลกเทตเป็นสารที่มีประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย เช่น กรดพรอพิโอนิก กรดแอซิดิก วิตามินบี 12 เป็นต้น กรดพรอพิโอนิกเป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหาร โดยมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียโดยเฉพาะในขนมปัง ส่วนบทบาทที่สำคัญของวิตามินบี 12 คือ การทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิกของจุลินทรีย์ และสัตว์หลายชนิด (Passmore *et al.*, 1974) นอกจากนี้ยังใช้ในการป้องกันและรักษาโรคโลหิตจางในทางการแพทย์ และเป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์และสัตว์อีกด้วย

การควบคุมน้ำหนักรูปร่างเป็นความตระหนักทางสุขภาพที่สำคัญมากในประเทศตะวันตก และต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในส่วนงบประมาณทางสาธารณสุขในการรักษาเกี่ยวกับโรคอ้วน ประมาณ 2 - 5 เปอร์เซ็นต์ (Hugenholtz and Smid, 2002) อาหารที่มีแคลอรีต่ำจึงเป็นอาหารที่มีการพัฒนาอย่างสูงในตลาด เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค ทรีฮาโลส (Trehalose) เป็นน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์แบบนอนรีดิวิซ์ ซึ่งสามารถย่อยได้เพียงบางส่วนในร่างกายมนุษย์ จึงจัดเป็นน้ำตาลไดเอต นอกจากนี้ทรีฮาโลสมีคุณสมบัติและหน้าที่ช่วยในการป้องกันสารชีวโมเลกุลทั้งหลายจากภาวะเครียด (Stress) ที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม ทำให้พืชและแมลงหลายชนิดสามารถเติบโตและรอดชีวิตได้ในภาวะแห้งแล้งและขาดน้ำ จึงเรียกทรีฮาโลสไว้ว่าแอนไฮโดรไบออนต์ (Anhydrobiont) คุณสมบัติทั่วไปของทรีฮาโลสมีความคงตัว ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และไม่เป็นน้ำตาลรีดิวิซ์ ทรีฮาโลสจึงถูกนำไปใช้เป็นสารคงตัว (Stabilizer) สำหรับเอนไซม์ โปรตีน มวลชีวภาพ การเตรียมเวชภัณฑ์ และการเก็บรักษาอวัยวะที่ใช้ในการปลูกถ่าย เป็นต้น ปัจจุบันทรีฮาโลสได้รับการยอมรับแล้วจากระบบข้อกำหนดของทางยุโรปและสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาว่าสามารถใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร (Food ingredient) ได้อย่างปลอดภัย (Insel *et al.*, 2010)

จากคุณสมบัติที่ดีเลิศของทรีฮาโลส จึงทำให้มีการประยุกต์ใช้ทรีฮาโลสได้อย่างกว้างขวาง ในอนาคต ซึ่งมีคุณประโยชน์มากในการเตรียมเวชภัณฑ์ สามารถช่วยป้องกันรักษาเนื้อเยื่อของ สิ่งมีชีวิต และใช้เป็นสารรักษาความชื้น (Moisturizer) ในเครื่องสำอาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน อุตสาหกรรมอาหารที่อาศัยกรรมวิธีการแปรรูปของการทำแห้งและการทำให้เข้มข้นนั้น จะยังคงมี แนวทางและแนวโน้มในการประยุกต์ใช้ทรีฮาโลสได้อย่างไม่มีขอบเขตจำกัด ปัจจุบันราคา จำหน่ายของทรีฮาโลสถูกลงอย่างมากเพียงกิโลกรัมละ 5 - 6 ดอลลาร์สหรัฐ เมื่อเปรียบเทียบกับ ราคาจำหน่ายเมื่อปี ค.ศ. 1990 ซึ่งอยู่ที่กิโลกรัมละ 700 ดอลลาร์สหรัฐ และในประเทศญี่ปุ่นมี โรงงานผลิตทรีฮาโลสที่มีกำลังการผลิตสูงถึง 5,000 ตันต่อปี ตัวเลขดังกล่าวแสดงถึงปริมาณการ ใช้ทรีฮาโลสในอุตสาหกรรมอาหารน่าจะยังมีเพิ่มมากขึ้นอยู่ตลอดเวลา

สิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีความสามารถในการผลิตทรีฮาโลส แต่สิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญใน การผลิตทรีฮาโลสมากที่สุด คือ จุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์จำพวกยีสต์และแบคทีเรีย แบคทีเรีย พรอฟิโอนิกบางสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสและสะสมไว้ในเซลล์ (Cardoso *et al.*, 2004) การสะสมทรีฮาโลสภายในเซลล์เกิดขึ้นภายใต้สภาวะเครียดหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ ต่ำ ความเข้มข้นของเกลือสูง และสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญอื่น ๆ (Hugenholtz and Smid, 2002) ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญและทนต่อสภาวะเครียดทั้งหลายได้ นอกจากนี้แบคทีเรีย พรอฟิโอนิกยังอาจผลิตกรดพรอฟิโอนิก หรือแบคทีริโอซิน (Bacteriocin) ขึ้นมาระหว่าง กระบวนการหมักทำให้เป็นการเพิ่มมูลค่าแก่ผลิตภัณฑ์ได้

Cardoso *et al.* (2004) พบว่า แลกโทสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ในขณะที่แลกเทตเป็น แหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับ Deborde *et al.* (1996) ที่ทำการศึกษาโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici*

ดังนั้นการศึกษาศักยภาพในการผลิตทรีฮาโลสของแบคทีเรียพรอฟิโอนิก โดยศึกษา หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตทรีฮาโลสในระดับขวดรูปชมพู่ ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วย อาหาร Complete medium เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตทรีฮาโลส และปรับเปลี่ยน ปัจจัยต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อผลิตทรีฮาโลสให้ได้ปริมาณ สูงสุดต่อไป

วัตถุประสงค์

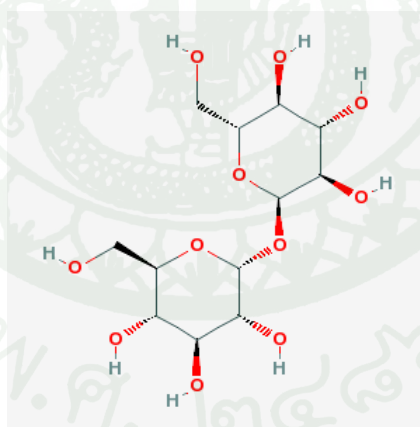
1. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสของ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 เมื่อใช้อาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสของ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 และจลนพลศาสตร์การหมักเมื่อใช้อาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
3. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตทรีฮาโลส

การตรวจเอกสาร

1. ทรีฮาโลส

ทรีฮาโลสเป็นน้ำตาลไคแซ็กคาไรด์ประกอบด้วย D-glucose สองโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\alpha, \alpha-1,1$ จึงไม่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ (Non-reducing sugar) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside มีคุณสมบัติเป็นไอโซเมอร์กับน้ำตาลมอลโทส ซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ และมีสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 1

ทรีฮาโลสพบอยู่ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ รา สัตว์เซลล์เดียว หนอน-ตัวกลม แมลง พืช ฯลฯ โดยจะถูกสะสมอยู่ในส่วนของไซโทซอล (Cytosol) (Hottiger *et al.*, 1987; Salminen and Streeter, 1986) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสะสม ช่วยในการปกป้องตัวเอง และรักษาสภาพเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ เช่น สภาวะที่มีสารอาหารจำกัด และสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อน เป็นต้น (Attfield *et al.*, 1992; Argüelles, 2000; Elbein *et al.*, 2003; Sharma and Anand, 2006)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทรีฮาโลส

ที่มา: National Center for Biotechnology Information (n.d.)

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของทรีฮาโลส ทรีฮาโลสมีความหวานเพียง 45 เปอร์เซ็นต์ของซูโครส สามารถละลายน้ำได้ดี โดยที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะมีความสามารถในการละลาย 68.9 กรัมต่อน้ำ 100 กรัม สามารถถูกย่อยและดูดซึมในส่วนของลำไส้เล็ก (นงลักษณ์, 2545;

Higashiyama, 2002) และเนื่องจากทรีฮาโลสเป็นน้ำตาลนอนรีดิวิซ์ ทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยาเคมีกับสารประกอบประเภทโปรตีนได้ จึงไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard's reaction) คุณสมบัตินี้ยังมีผลทำให้ทรีฮาโลสมีความคงตัวในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง และสามารถคงตัวอยู่ได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง (Food Standards Australia New Zealand, 2003; Higashiyama, 2002; George, 2010)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของทรีฮาโลส

Properties	Values
Melting point: dihydrate	97.0 °C
: anhydride	210.5 °C
Heat of fusion: dihydrate	57.8 kJ/mol
: anhydride	53.4 kJ/mol
Solubility	68.9 g/100 g H ₂ O at 20 °C
Relative sweetness	45% of sucrose
Digestibility	Digested and absorbed by the small intestine
pH stability of solution	>99% (pH 3.5 - 10, at 100 °C for 24 h)
Heat stability of solution	>99% (at 120 °C for 90 min)

ที่มา: Higashiyama (2002)

การใช้ประโยชน์ของทรีฮาโลส

ทรีฮาโลสสามารถนำมาใช้ในอาหาร เครื่องสำอาง ยา และอุตสาหกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ โดยนำมาใช้เป็นสารให้ความคงตัวแก่ วัคซีน เอนไซม์ แอนติบอดี สอร์โม่โน ใช้ในการเตรียมยา และการปลูกถ่ายอวัยวะ มีรายงานการนำทรีฮาโลสมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 2 เนื่องจากทรีฮาโลสมีคุณสมบัติที่มีรสหวานอ่อน ๆ ให้พลังงานต่ำ ละลายได้ดีในน้ำ สามารถคงตัวอยู่ได้ในสภาวะที่มีพีเอชต่ำ ช่วยลดการสูญเสีย น้ำ ความชื้นต่ำ และสามารถป้องกันการทำลายโปรตีน ไม่เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard's reaction) จึงมีความปลอดภัยในการนำมาบริโภค และยังเป็นน้ำตาลที่ได้รับการยอมรับจากระบบการควบคุมของยุโรป (European regulation system) (Richards *et al.*, 2002; Schiraldi *et al.*, 2002) นอกจากนี้ ยังมีการนำทรีฮาโลส

มาใช้ในการทำเบียร์ ซ็อกโกแลต ลูกกวาด เบเกอรี่ นมและผลิตภัณฑ์จากผลไม้ และยังเป็นสารไครโอโพรเทกแทนท์ (Cryoprotectant) ในซูริมิและอาหารแช่แข็งชนิดอื่น ๆ

ตารางที่ 2 การใช้ประโยชน์ทรีฮาโลสในอุตสาหกรรมอาหาร

ชนิดของอาหาร	ตัวอย่าง
อาหารแห้ง	ไข่, ผัก, ปลา, เนื้อ, ธัญพืช, ถั่ว, เคิร์ด, นมผง, ผลไม้, ซุป
อาหารแช่แข็ง	อาหารปรุงสุกทั่วไป
ลูกกวาด	ลูกอม, หมากฝรั่ง, ซ็อกโกแลต
ขนมหวาน	เค้ก, ขนมอบ, แยม, ครีม, และเค้กข้าว
เครื่องดื่ม	กาแฟ, ชา, น้ำผลไม้ และเครื่องดื่ม
อาหารหมัก	ขนมปัง และโยเกิร์ต
อาหารเข้มข้น (Concentrated)	น้ำผลไม้
อาหารอัดเม็ด	อาหารเม็ด และเวชภัณฑ์
อื่น ๆ	ไอศกรีม, ซอส, สารให้ความหวาน และเครื่องปรุงรส

เนื่องจากทรีฮาโลสมีความหวานอย่างอ่อน ๆ, ละลายได้ดี, ให้พลังงานต่ำ, ดูดซับความชื้นได้ดี และยังคงมีความคงตัวในระหว่างกระบวนการผลิตและเก็บรักษา จึงสามารถนำมาใช้ในการเตรียมอาหารได้หลากหลายชนิด

ที่มา: Schiraldi *et al.* (2002)

จากการศึกษาผลของทรีฮาโลสต่อการทนต่อการถูกแช่แข็งของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ D ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ทนต่อการถูกแช่แข็ง พบว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมทรีฮาโลส 3 - 5 เปอร์เซ็นต์ จะมีการสะสมทรีฮาโลสภายในเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า เมื่อทำการแช่แข็งเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมทรีฮาโลส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน พบว่ายีสต์จะมีการรอดชีวิตลดลงน้อยกว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมทรีฮาโลส (Miyamoto *et al.*, 1996)

ในการเก็บรักษาซูริมิในสภาพแช่แข็ง อาจทำให้ซูริมิสูญเสียคุณสมบัติบางอย่างไป เนื่องจากการเสียสภาพ และการรวมกลุ่มกันของเส้นใยกล้ามเนื้อ จึงต้องมีการใช้สารไครโอโพร-

เทกแทนท์ โดยปกติแล้วจะใช้สารผสมระหว่างซูโครสและซอร์บิทอลในอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ซึ่งมีผลทำให้ซูรีมีมีรสชาติหวานเกินไป และยังให้พลังงานที่สูงด้วย Aimei *et al.* (2006) จึงได้ทำการศึกษาเพื่อหาสารไครโอโพรเทกแทนท์ตัวใหม่ที่มีความเหมาะสมมากกว่ามาใช้ จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเติมทรีฮาโลสลงในซูรีมี 8 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 24 สัปดาห์ จะสามารถป้องกันการสูญเสียสภาพของโปรตีนได้ดีที่สุด และยังสามารถลดการเปลี่ยนรูปของซูรีมีได้ดีที่สุดอีกด้วย

เอนไซม์ที่ใช้ในการตัด DNA (Restriction enzyme) ปกติแล้วจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส Roser and Colaco (1993) พบว่าถ้าเติมทรีฮาโลสลงในเอนไซม์นี้แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เอนไซม์จะยังคงสามารถทำกิจกรรมของเอนไซม์ได้ และถึงแม้ว่าจะเก็บอยู่ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาถึง 35 วัน ก็ยังมีความสามารถในการตัดรหัสใน DNA ได้ถูกต้อง นอกจากนี้เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บได้นานถึง 9 เดือน แต่เมื่อเติมน้ำตาลรีดิซ เช่น มอลโทส และกาแลกโทส แทนทรีฮาโลส พบว่าไม่สามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วัน

Nguyen *et al.* (1997) ได้ศึกษาการใช้ทรีฮาโลสเพื่อเพิ่มความคงตัวให้กับเอนไซม์ที่ถูกตรึง (Immobilized enzyme) โดยเติมทรีฮาโลสลงในเอนไซม์แอซีทิล โคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยกระตุ้นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแอซีทิลโคลีนก่อนที่จะนำเอนไซม์ไปตรึงและทำแห้ง พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้นานกว่าเดิม และมีความทนทานต่อฟิเอชที่เป็นกรด จึงได้เอนไซม์ที่มีความคงตัวและใช้งานได้นานขึ้น

จากการศึกษาผลของน้ำตาลต่อการเสื่อมสภาพของกรดไขมันของ Higashiyama (2002) โดยทำการผสมทรีฮาโลสลงในกรดไขมันก่อนนำมาให้ความร้อนเปรียบเทียบกับกรใช้น้ำตาลชนิดอื่น ๆ เพื่อทดสอบการระเหยของสารจำพวกแอลดีไฮด์ พบว่าทรีฮาโลสสามารถลดการระเหยของสารจำพวกแอลดีไฮด์ได้มากกว่ากรดไขมันที่ไม่ได้ผสมน้ำตาลชนิดใดเลย 10 - 30 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเติมซูโครสและซอร์บิทอลไม่มีผลทำให้การระเหยของสารจำพวกแอลดีไฮด์ลดลง

กลิ่นในผลไม้หรืออาหารสดเกิดจาก Volatile aromatic ที่อยู่ในผลไม้ Roser and Colaco (1993) พบว่าถ้าเติมทรีฮาโลสก่อนนำผลไม้ไปอบแห้ง เมื่อมีการเติมน้ำลงไปในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการอบแห้งแล้ว กลิ่นของผลไม้สดจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น โดยการทดลองของสถาบันวิจัยอาหารของมหาวิทยาลัยรีดิง (University of Reading) พบว่าเมื่อเติมน้ำลงไปผลไม้ที่เติมทรีฮาโลส ใน

ระหว่างการทำแห้ง สารพวก Volatile aromatic ester จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น ขณะที่ Furfural และ α -humulene ลดลง สารทั้งสองชนิดหลังนี้เป็นสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยามอลลาร์ด (Maillard reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์กับโปรตีนที่เกิดในผลไม้หรืออาหารสดในระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นทรีฮาโลสที่เติมลงไปจะช่วยยับยั้งปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในน้ำผลไม้กับพวกโปรตีน เปปไทด์ หรือกรดอะมิโน ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นน้ำตาล

มีการใช้ทรีฮาโลสในการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนโพลิโอ ซึ่งประสิทธิภาพของวัคซีนชนิดนี้ขึ้นอยู่กับความมีชีวิตของไวรัส ดังนั้นจึงต้องเก็บวัคซีนในตู้เย็น ทำให้เกิดปัญหาเมื่อต้องนำวัคซีนไปใช้ในพื้นที่ที่ต้องการ จึงมีการเติมทรีฮาโลสลงในวัคซีนชนิดนี้ พบว่าสามารถเก็บวัคซีนได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส (Roser and Colaco, 1993)

Lui *et al.* (2005) พบว่าทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการรวมตัวของ β -amyloid 40 และ 42 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เซลล์สร้างขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ขนส่งโปรตีนเข้าสู่เซลล์ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ หากโปรตีนทั้งสองนี้รวมตัวกันจะเกิดเป็นฟังคัสสะสมอยู่ที่สมอง ทำให้สมองขาดอาหารและออกซิเจน และป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์ในที่สุด และที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ยังสามารถยับยั้งสารพิษที่เกิดจากการรวมตัวกันของ β -amyloid 40 ได้อีกด้วย

2. การผลิตทรีฮาโลสจากแบคทีเรีย

จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสได้ แต่กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่ามีศักยภาพในการผลิตทรีฮาโลสได้สูง คือ แบคทีเรีย (Schiraldi *et al.*, 2002) โดยทรีฮาโลสที่แบคทีเรียผลิตขึ้น มักจะทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสะสมเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ นอกจากนี้ ยังทำหน้าที่ปกป้องเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียได้เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตทรีฮาโลสจากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เผยแพร่ออกมามากขึ้น

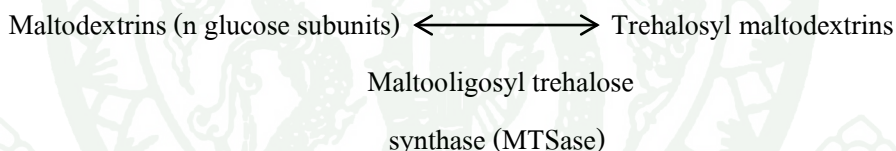
เมื่อศึกษาการผลิตทรีฮาโลสโดยแบคทีเรียจากงานวิจัยต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนซัคเคอไรด์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์นั้นให้กลายเป็นทรีฮาโลส โดยสามารถแบ่งการผลิตทรีฮาโลสจากแบคทีเรียได้เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้

2.1 การผลิตทรีฮาโลสโดยใช้เอนไซม์จากแบคทีเรียในการย่อยซับซ้อน

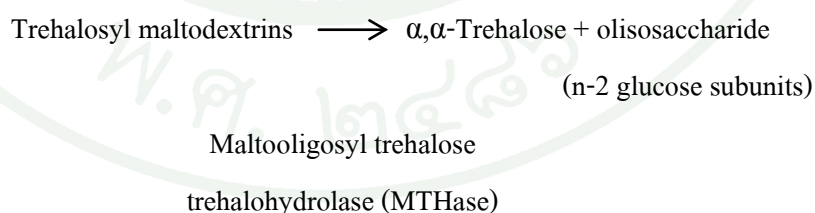
2.1.1 การผลิตทรีฮาโลสจากมอลโทเดกซ์ทริน (Maltodextrin)

ปี 1994 Hayashibara Biochemical Laboratories Inc. เปิดเผยรายงานสิทธิบัตรเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ในการผลิตทรีฮาโลสโดยใช้เอนไซม์ Maltooligosyltrehalose synthase หรือ MTSase (EC 5.4.99.15) และเอนไซม์ Maltooligosyl trehalose trehalohydrolase หรือ MTHase (EC 3.2.1.141) ซึ่งได้จากเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Rhizobium* sp. M-11 และ *Arthrobacter* sp. Q36 โดยเอนไซม์ชนิดแรกจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงพันธะปลายด้านรีดิวซ์ของมอลโท-เดกซ์ทรินที่มี Polymerization degree (DP) มากกว่า 3 จากพันธะ α -1,4 ให้กลายเป็นพันธะ α -1,1 จากนั้นเอนไซม์ MTHase ซึ่งมีความจำเพาะต่อพันธะ α -1,4 ที่อยู่ติดกันจะตัดพันธะดังกล่าวให้กลายเป็นโมเลกุลทรีฮาโลสและมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Maltooligosaccharide) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1



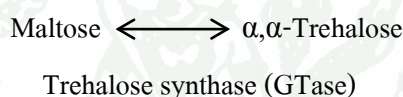
ขั้นตอนที่ 2



จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 2 นอกจากจะได้ทรีฮาโลสแล้วยังได้มอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วย ซึ่งต้องมีกระบวนการในการแยกสิ่งเจือปน (Impurity) เหล่านี้ออกไป

2.1.2 การผลิตทรีฮาโลสจากมอลโทส

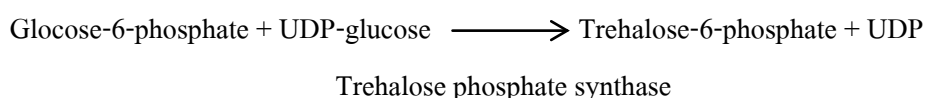
เนื่องจากมอลโทสเป็นไอโซเมอร์กับทรีฮาโลส ดังนั้นมอลโทสจึงสามารถเปลี่ยนเป็นทรีฮาโลสได้จากการทำงานของเอนไซม์ Trehalose synthase (EC 5.4.99) ซึ่งสกัดได้จากแบคทีเรีย *Pimelobacter* sp. R48 (Nishimoto *et al.*, 1995) โดยเอนไซม์นี้มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนมอลโทสเป็นทรีฮาโลสแบบผันกลับได้ในขั้นตอนเดียว ซึ่งทำงานได้ดีที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Nishimoto *et al.*, 1996a) ต่อมา Nishimoto *et al.* (1996b) ทำการสกัดเอนไซม์ดังกล่าวจากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ATCC 33923 โดยเอนไซม์ที่ได้มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง และสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรีย *Pimelobacter* sp. R48 และ *Pseudomonas putida* H262 โดยทำงานได้ดีที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนมอลโทสเป็นทรีฮาโลสเป็นดังนี้



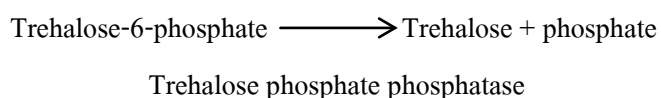
จากปฏิกิริยาดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดขึ้นในลักษณะที่ผันกลับได้ ทำให้ทรีฮาโลสเปลี่ยนกลับไปเป็นมอลโทสดังเดิมได้ ทำให้ควบคุมการผลิตทรีฮาโลสได้ยาก

2.2 การผลิตทรีฮาโลสโดยการสกัดจากเซลล์ของแบคทีเรีย

แบคทีเรียหลายชนิดมีกลไกในการสังเคราะห์ทรีฮาโลสภายในเซลล์เพื่อเก็บสะสมไว้ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร หรือเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น แร่งดันออสโมติกเพิ่มขึ้น และค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง เป็นต้น แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ทรีฮาโลสภายในเซลล์ ได้แก่ *E. coli* และ *Propionibacterium* sp. เป็นต้น ซึ่งขั้นตอนของการสังเคราะห์ทรีฮาโลสภายในเซลล์จะเริ่มจากสารตัวกลางที่ได้จากวิถีไกลโคไลซิส คือ glucose-6-phosphate (Kuenzi and Fiechter, 1972) และสารอื่น ๆ ที่สำคัญ คือ UDP-glucose โดยการทำงานของเอนไซม์ Trehalose phosphate synthase โดยมีปฏิกิริยาดังนี้



จากนั้นจะเป็นขั้นตอนของปฏิกิริยาการแยกหมู่ฟอสเฟตออกจาก Trehalose-6-phosphate โดยการทำงานของเอนไซม์ Trehalose phosphate phosphatase ซึ่งมีปฏิกิริยาดังนี้



จากปฏิกิริยาทั้งสองนี้จะเห็นได้ว่าเป็นปฏิกิริยาที่เป็นไปทิศทางเดียวไม่ผันกลับ ทำให้ง่ายต่อการควบคุมการผลิต และปฏิกิริยานี้ไม่ก่อให้เกิดสิ่งเจือปนจำพวกมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนในการแยกสิ่งเจือปนดังกล่าวออกไป แต่จำเป็นต้องมีขั้นตอนในการสกัดทรีฮาโลสภายในเซลล์ของแบคทีเรียออกมา ซึ่งอาจใช้กรดไตรคลอโรแอซีติก (Trichloroacetic acid) หรือ TCA เช่นเดียวกับการสกัดทรีฮาโลสจากเซลล์ยีสต์ (Mahmud *et al.*, 2009)

Panek (1963) รายงานว่าเอนไซม์ Trehalose phosphate synthase ที่มีบทบาทต่อการสังเคราะห์ทรีฮาโลส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีการสังเคราะห์ได้ตลอดเวลา ซึ่งเป็น Complex enzymes พบอยู่ทั้งในเซลล์ยีสต์ที่เจริญอยู่ในช่วงระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) และระยะคงที่ (Stationary phase) ลักษณะดังกล่าวขัดแย้งกับการสังเคราะห์ทรีฮาโลสในเซลล์ยีสต์ที่พบว่าถูกยับยั้งโดยผลของ Catabolite repression ที่มีอยู่ในอาหาร ทำให้คล้ายกับว่าเอนไซม์กลุ่มนี้น่าจะเป็น Inducible enzymes และถูกควบคุมด้วยระบบไฮโปโครมมากกว่า แต่ก็ยังไม่มีหลักฐานเพิ่มเติมที่สนับสนุนว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ เนื่องจากยังไม่พบ Inactive form ของเอนไซม์กลุ่มนี้

การที่พบเอนไซม์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ทรีฮาโลสทั้งในระยะการเจริญคงที่และระยะเอกซ์โพเนนเชียล แต่ไม่พบการสร้างทรีฮาโลสในเซลล์ที่อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล ไม่ใช่เนื่องจากไม่มีกระบวนการสังเคราะห์ทรีฮาโลสเกิดขึ้นในขณะนั้น แต่เนื่องจากเกิดการแก่งแย่งสมดุลในวิถีการเกิดกรดอะมิโนและทรีฮาโลส ซึ่งใช้สารตัวกลางร่วมกัน คือ glucose-6-phosphate โดยวิถีการเกิดกรดอะมิโนเกิดมากกว่า เนื่องจากเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์มากกว่า (Panek, 1963)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ทรีฮาโลส มีดังนี้

ผลของสารอาหาร

จากการศึกษาผลของกลูโคสต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ทรีฮาโลส พบว่า 3',5'-cyclic AMP (c-AMP) เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาการสร้าง Disaccharide c-AMP ซึ่งปกติทำหน้าที่ควบคุม (Modulator) ปฏิกิริยาการยับยั้งที่เกิดจากแหล่งคาร์บอนในแบคทีเรีย ทำให้ไม่เกิดการสร้างทรีฮาโลส โดย c-AMP จะมีผลยับยั้งการสร้างทรีฮาโลสในเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากกลูโคสมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ใน c-AMP ทำให้ c-AMP มีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้เอนไซม์ Trehalose phosphate synthase มีปริมาณลดลง นอกจากนี้ Panek (1963) ยังได้ทดลองเติม c-AMP ลงไปในเซลล์ยีสต์ พบว่ามีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ Trehalose phosphate synthase ลดลงได้เช่นกัน และถ้ามี c-AMP ปริมาณสูง จะเป็นตัวช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสในการทำลาย ทรีฮาโลส

เมื่อเซลล์ถูกนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ เซลล์จะนำทรีฮาโลสที่สะสมไว้มามีมาใช้อย่างรวดเร็ว ซึ่งการทำลายทรีฮาโลสจะเกิดขึ้นโดยไม่ขึ้นกับชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ในขณะนั้น โดยเฉพาะเมื่อเซลล์อยู่ในระยะพักตัว นอกจากนี้ยังพบว่าทรีฮาโลสสามารถเปลี่ยนไปเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นได้อีกด้วย (Panek, 1963)

กรณีที่ใช้กลูโคสเป็นคาร์บอนแหล่งเดียว การสะสมทรีฮาโลสจะเกิดขึ้นน้อยในขณะที่การเจริญอยู่ในช่วงเอกซ์โพเนนเชียล ต่างจากการใช้มอลโทสเป็นคาร์บอนแหล่งเดียว ซึ่งจะมีการสะสมทรีฮาโลสอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงเอกซ์โพเนนเชียล แต่อย่างไรก็ตาม การสะสมทรีฮาโลสจะเพิ่มขึ้นตรงช่วงปลายเอกซ์โพเนนเชียลเมื่อกลูโคสเริ่มหมด แสดงให้เห็นว่าการแบ่งเซลล์ไม่ใช่ตัวบ่งชี้การควบคุม (Regulation) ปริมาณการผลิตทรีฮาโลสในช่วงที่มีการเจริญแบบเอกซ์โพเนนเชียลเพียงอย่างเดียว หากแต่ชนิดคาร์บอนที่ใช้ก็เป็นกุญแจแบ่งชี้สารตัวกลาง (Key intermediate) เช่นกัน และเมื่อพิจารณาอัตราการเจริญระหว่างน้ำตาลทั้งสองชนิด พบว่าเซลล์สามารถเจริญในกลูโคสได้ดีกว่ามอลโทส

มีรายงานว่าเมื่อเปลี่ยนไปใช้กาแลกโทส ยีสต์เจริญได้ช้ากว่าในมอลโทส แต่มีการสะสมทรีฮาโลสได้มากกว่า และยังพบอีกว่าเซลล์ที่เลี้ยงโดยใช้กาแลกโทส จะมีพวกไซโทโครมมาก ซึ่งตรงข้ามกับกรณีที่เลี้ยงในกลูโคส โดยการทำงานของไซโทโครมจะถูกยับยั้ง (Repress) ไว้

โดยเฉพาะไซโทโครมบีและซี ไม่พบไซโทโครมเอ อย่างไรก็ตามปริมาณไซโทโครมของยีสต์ที่เลี้ยงในมอลโทสจะน้อยกว่าที่เลี้ยงในกาแลกโทสมาก แต่ก็มากกว่าในกลูโคส

Cardoso *et al.* (2004) พบว่าแลกโทสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ในขณะที่แลกเทตเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับ Deborde *et al.* (1996) ที่ทำการศึกษาโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici*

จากการศึกษาการเมแทบอลิซึมของยีสต์โดย Trevelyan and Harrison (1956) พบว่าในช่วงที่ยีสต์มีการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนและใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ทรีฮาโลส

Wang *et al.* (2008) ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *Brevibacterium* sp. SY361 พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ทรีฮาโลส โดยสารสกัดจากยีสต์ และ corn steep liquor ต่างสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์ทรีฮาโลสได้ โดยสามารถสังเคราะห์ทรีฮาโลสได้ 7.2 และ 7.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาถึงราคาวัตถุดิบ แหล่งไนโตรเจนจาก corn steep liquor จึงมีความเหมาะสมมากกว่า

เมื่อทดสอบหาความเข้มข้นกลูโคส และ Corn steep liquor ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ทรีฮาโลส พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และ Corn steep liquor 0.9 เปอร์เซ็นต์ จะให้ปริมาณทรีฮาโลสสูงที่สุด แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสขึ้นจะทำให้การสังเคราะห์ทรีฮาโลสลดลง ในส่วนของความเข้มข้น Corn steep liquor พบว่าถ้ามีลดความเข้มข้นลง จะมีผลทำให้ผลได้ของทรีฮาโลสมีค่าลดลง (Wang *et al.*, 2008)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณทรีฮาโลสสูงที่สุด แต่เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีฟอสเฟต อัตราการผลิตทรีฮาโลสจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าวิตามิน ได้แก่ Biotin, *p*-aminobenzoic acid (PABA), Thiamine hydrochloride และ Nicotinamide ต่างไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ทรีฮาโลส (Wang *et al.*, 2008)

ผลของตัวยับยั้ง

ไกลโคไลซิสเป็นวิถีที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ทรีฮาโลสโดยผ่านสารตัวกลางที่สำคัญคือ glucose-6-phosphate ซึ่งมีผู้ศึกษาถึงตัวยับยั้งในปฏิกิริยาที่มีผลต่อการสะสมของ glucose-6-phosphate ซึ่งพบว่าสาร Iodo acetamide จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เฮกโซสฟอสเฟตในวิถีไกลโคไลซิส ทำให้เกิดการสะสม glucose-6-phosphate ในวิถีการสังเคราะห์และการยับยั้งการใช้ทรีฮาโลสในเซลล์ยีสต์ ทำให้พบปริมาณทรีฮาโลสสูงขึ้น (Souza and Panek, 1968)

ผลของสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเชื้อ

Cardoso *et al.* (2004) รายงานว่าการผลิตทรีฮาโลสของ *P. freudenreichii* sub sp. *shermanii* NIZO B365 จะเพิ่มขึ้นโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ ฟิเชอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำ ๆ หรือการเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน 24 ไมโครโมลาร์ (ฟิเชอร์ 7.0) แต่ผลการทดลองดังกล่าวยังไม่สามารถอธิบายสาเหตุได้แน่ชัดจนกว่าจะมีรายงานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยีนและเอนไซม์ในการสังเคราะห์ทรีฮาโลสของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ แต่สามารถอธิบายได้เพียงว่าจุลินทรีย์จะเกิดการสะสมทรีฮาโลสเมื่อเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมดังกล่าว และทรีฮาโลสยังช่วยปกป้องเซลล์จากแรงดันออสโมติกที่มีค่าเพิ่มขึ้น รวมไปถึงการป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายเนื่องจากออกซิเจนเรดิคัล (Singer and Lindquist, 1998; Simola *et al.*, 2000; Benaroudj *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังอาจเป็นไปได้ว่าผลได้ของพลังงาน ATP ที่สูงกว่าประกอบกับการผลิตเอซีเทตของจุลินทรีย์ ทำให้การไหลของคาร์บอนเกิดในทิศทางที่ทำให้มีการสะสมทรีฮาโลส

จากการวิเคราะห์ปริมาณทรีฮาโลสที่เกิดขึ้นในสภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยความร้อนในขณะการเลี้ยงเชื้อ *Aureobasidium pullulans* พบว่าจะมีการสะสมทรีฮาโลสมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการเลี้ยงปกติ (Managbanag, 2002)

Wang *et al.* (2008) ทำการศึกษาผลของฟิเชอร์เริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *Brevibacterium* sp. SY361 พบว่าฟิเชอร์เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 มีความเหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลส ถ้าฟิเชอร์เริ่มต้นมีค่าต่ำกว่านี้จะมีผลทำให้การเจริญของเชื้อและผลได้ของทรีฮาโลสมีค่าลดลง และเมื่อศึกษาถึงอุณหภูมิในการหมัก พบว่าเชื้อจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่ผลิตทรีฮาโลสได้ปริมาณสูงที่สุด คือ 28 - 32 องศาเซลเซียส โดยเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า

15 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส จะไม่สามารถเจริญได้ และไม่พบการสะสมทริฮาโลส

3. แบคทีเรียพรอปิโอนิก

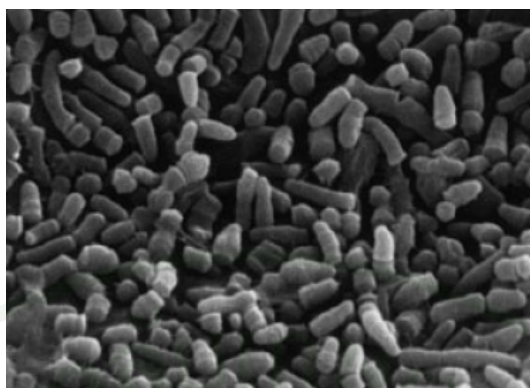
แบคทีเรียพรอปิโอนิกเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในเชิงอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด เช่น กรดพรอปิโอนิก วิตามินบี 12 รวมทั้งใช้ในการผลิตเนยแข็ง ซึ่งมีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดรูของเนยแข็ง (Hettinga and Reinbold, 1972; Langsrud and Reinbold, 1973) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ผลิตเบคเทอริโอซิน และใช้เป็นพรีไบโอติกที่มีประสิทธิภาพสูง (Jan *et al.*, 2002)

3.1 ลักษณะรูปร่างและคุณสมบัติของแบคทีเรียพรอปิโอนิก

แบคทีเรียพรอปิโอนิกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างแฟลกเจลลา สร้างเอนไซม์อะซิเตส มีรูปร่างได้หลายแบบ ได้แก่ รูปร่างกลม ท่อนยาว ท่อนไม่กระบอก การเรียงตัวของเซลล์อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ เป็นสายสั้น ๆ เป็นกลุ่ม บางครั้งเรียงตัวเป็นรูปตัว V, Y หรือคล้ายอักษรจีน มีขนาดกว้าง 0.5 - 0.8 ไมโครเมตร ยาว 1 - 5 ไมโครเมตร แสดงดังภาพที่ 2 เซลล์เจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน แต่สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจน เพราะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Facultative anaerobe เมื่อเลี้ยงบน Blood agar จะมีโคโลนีโค้งนูน ทึบ-แสง (Semiopaque) เป็นมันวาว มีสีครีมถึงสีน้ำตาลแดงจัดเป็นคีโมออร์กาโนโทรฟ (Chemoorganotroph) สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและสารประกอบคาร์โบไฮเดรตบางชนิดได้เป็นกรดพรอปิโอนิก กรดแอซิดิก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30 - 37 องศาเซลเซียส มักพบในผลิตภัณฑ์จากนม เนย และบนผิวหนังของมนุษย์ (Holt *et al.*, 1994)

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียพรอปิโอนิก

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *Propionibacterium* sp. มีหลายประการ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งเกลือแร่ แหล่งอาหารเสริม อุณหภูมิ พีเอช รวมทั้งสภาพการให้อากาศ ซึ่งได้รายงานการศึกษาการเจริญและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ไว้ดังนี้



ภาพที่ 2 ลักษณะรูปร่างของ *Propionibacterium acidipropionici*

ที่มา: Suwannakham and Yang (2005)

3.2.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียพรอปิโอนิกสามารถนำมาใช้ได้มีหลายชนิด คือ ประเภทที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น แล็กโทส ซูโครส มอลโทส กลูโคส แรฟฟิโนส อะราบีโนส ไซโลส ไกลโคเจน เดกซ์ทริน และแป้ง ส่วนประเภทที่เป็นสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น กรดแลคติก กรดทาร์ทาริก กรดควินิก กรดซิตริก กลีเซอรอล และแมนนิทอล รวมทั้งโปรตีนและอนุพันธ์ของโปรตีน (Prescott and Dunn, 1959) เป็นต้น

Barbirato *et al.* (1997) ศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ในกลูโคสและกรดแลคติกที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อจะมีการเจริญ 2 ช่วง โดยช่วงแรกจะมีการเจริญเพียงเล็กน้อย ในช่วงการเจริญที่สองเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีกลูโคสจะมีการเจริญที่เร็วกว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีกรดแลคติก

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์การหมักของเชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* โดยใช้กลีเซอรอลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* จะมีระยะพักตัวนานกว่าระยะพักตัวของเชื้อ *P. acidipropionici* มากกว่า 3 เท่า ซึ่งใช้เวลา 20 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ เชื้อ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* ยังใช้ระยะเวลาในการหมักนานกว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ประมาณ 2 เท่า (110 และ 54 ชั่วโมง ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญและปริมาณ

เซลล์ที่ได้ พบว่าเชื้อ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* จะมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่า (0.13 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง) และมีปริมาณเซลล์สูงกว่า (5.2 กรัมต่อลิตร) เชื้อ *P. acidipropionici* ซึ่งมีอัตราการเจริญ 0.1 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง และมีปริมาณเซลล์ 2.9 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อทำการศึกษาโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าระยะพักตัวของเชื้อ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* มีค่าเท่ากับ 3 ชั่วโมง ซึ่งสั้นกว่าระยะพักตัวของเชื้อ *P. acidipropionici* ประมาณ 3 เท่า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 10 ชั่วโมง นอกจากนี้ เชื้อ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* ยังมีปริมาณเซลล์ที่สูงกว่าเชื้อ *P. acidipropionici* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9 และ 2.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยเชื้อทั้งสองมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน (0.8 - 0.9 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง) (Himmi *et al.*, 2000)

Koussémon *et al.* (2003) ศึกษาภาวะจำกัดของกลูโคส (Limiting glucose condition) โดยเชื้อ *P. microaerophilum* โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 ในสภาวะไร้อากาศ พบว่าสภาวะจำกัดของกลูโคสคือ สภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของกลูโคสดำกว่า 18 มิลลิโมลาร์ โดยสภาวะดังกล่าวจะให้ผลได้ของเซลล์แห้ง 21.6 กรัมต่อโมลกลูโคส

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ กากน้ำตาลจากอ้อย กลีเซอรอล และแลกเทต ที่อุณหภูมิ 30 และ 36 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในระดับต่ำ และไม่มีการควบคุมค่าพีเอช พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลจากอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ปริมาณเซลล์สูงกว่าอาหารที่ใช้กลีเซอรอล และแลกเทต โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณเซลล์ 7.55 กรัมต่อลิตร และที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณเซลล์ 3.71 กรัมต่อลิตร (Coral *et al.*, 2008)

Neronova *et al.* (1967a) รายงานว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลแลกโทส อัตราการเจริญของ *P. shermanii* จะเพิ่มขึ้น เมื่อมีน้ำตาลแลกโทส 0.13 โมลาร์ จะได้อัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ 0.175 ต่อชั่วโมง แต่ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลแลกโทสมากกว่านี้ จะมีผลทำให้อัตราการเจริญจะลดลง

จากการศึกษาของ Osman *et al.* (1968) พบว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด เหมาะสมต่อการเจริญ และผลิตวิตามินบี 12 ของ *P. shermanii*

Lewis and Yang (1992) ศึกษาการเจริญของ *P. acidipropionici* โดยใช้แลกโทส กลูโคสและแลกเทตเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้แลกเทตเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อจะมีอัตราการเจริญจำเพาะ และผลได้ของเซลล์ต่ำกว่าเมื่อใช้แลกโทสเป็นแหล่งคาร์บอน

Antila (1954) พบว่าแบคทีเรียพรอพิโอนิกสามารถใช้กรดแลกติกที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำเนยแข็งเป็นซับสเตรดในการหมักได้ แต่อย่างไรก็ตาม Antila and Hietaranta (1953) พบว่าการใช้แลกเทตความเข้มข้นสูงเกินไปจะมีผลทำให้การเจริญและความสามารถในการหมักของแบคทีเรียพรอพิโอนิกลดลงได้

3.2.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนจะมีอิทธิพลต่ออัตราการหมักและอัตราส่วนของกรดพรอพิโอนิกและกรดแอซิดิกที่ผลิตได้ มักเป็นพวกกรดอะมิโนหรือโปรตีนจากถั่วเหลือง ข้าวโอ๊ต ข้าวโพด เนื้อสัตว์ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract), Trypticase digest of casein, Pancreatic digest of casein, สารสกัดจากเนื้อ (Meat extract), โปรตีนเลือดป่น (Blood meal protein) และเปปโตเน สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ โดยใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ (Prescott and Dunn, 1959)

พรพรรณ (2519) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงในน้ำทิ้งจากเต้าหู้ที่มีน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* sub sp. *shermanii* (ATCC 13673) พบว่าเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์จะมีน้ำหนักแห้งสูงสุด (3.954 กรัมต่อลิตร) รองลงมา คือ แอมโมเนียมซัลเฟต (3.0 กรัมต่อลิตร) และยังพบว่าสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเจริญของเชื้อมาก โดยใน Complete medium ที่ขาดสารสกัดจากยีสต์เชื้อเจริญได้น้อย ในขณะที่ขาด Pancreatic digest of casein หรือ Acid hydrolysate of casein เชื้อยังคงมีอัตราการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกับ Complete medium

Tatum *et al.* (1936) พบว่าแบคทีเรียพรอพิโอนิกสามารถใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวได้ เมื่อมีสารช่วยเร่งการเจริญที่เหมาะสมอยู่ด้วย และให้ความเห็นว่าสารสกัดจากยีสต์และแหล่งธาตุไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนอื่น ๆ มีผลทำให้แบคทีเรียพรอพิโอนิกเจริญได้ดี เนื่องจากสารเหล่านี้มีส่วนประกอบที่ไม่ใช่ไนโตรเจน ซึ่งมี

คุณสมบัติเป็นสารช่วยเร่งการเจริญรวมอยู่ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียพรอพิโอนิกยังสามารถใช้กรดแอสปาร์ติก และกรดกลูตามิกแทนแอมโมเนียมไนเตรดได้

Fromageot and Chaix (1937) พบว่ากรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบ จะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพรอพิโอนิก Wood *et al.* (1938) พบว่ากรดอะมิโนมีประโยชน์ช่วยให้แบคทีเรียพรอพิโอนิกเจริญได้ดี แต่ไม่ใช่สารที่จำเป็นต่อการเจริญ เนื่องจากแบคทีเรียพรอพิโอนิกบางชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มีกรดอะมิโน

3.2.3 แหล่งเกลือแร่

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของแบคทีเรียพรอพิโอนิก ได้แก่ เหล็ก โคบอลต์ แมกนีเซียม แมงกานีส โซเดียม และฟอสเฟต (Barker and Lipmann, 1949)

3.2.4 แหล่งอาหารเสริม

Wood *et al.* (1938) พบว่าไรโบฟลาวินช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียพรอพิโอนิกเช่นเดียวกัน แต่ไม่จำเป็นต้องเติมลงในอาหาร ขณะที่ Shitkkel *et al.* (1967) ค้นพบว่าเมื่อเติมกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ *P. shermanii* เพิ่มการเจริญและการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ภายใต้สภาวะการเจริญแบบมีอากาศ

Thomson (1943) รายงานว่า *Propionibacterium* sp. ต้องการกรดแพนโทธีนิก (Pantothenic acid) และไบโอตินในการเจริญ Delwiche (1949) รายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ต้องการกรดแพนโทธีนิกและไบโอตินในปริมาณสูงเพื่อผลิตวิตามินบี 12 และยังต้องการ *p*-aminobenzoic acid (PBA) หรือวิตามินบี 1 (ไทอะมิน) อีกด้วย

3.2.5 อุณหภูมิ

Coral *et al.* (2008) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ กากน้ำตาลจากอ้อย, กลีเซอรอล และแล็กเทต ที่อุณหภูมิ 30 และ 36 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในระดับต่ำ และไม่มีการ

ควบคุมค่าพีเอช พบว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณเซลล์สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ในทุกกรณีของการทดลอง ซึ่งจากการศึกษาของ Seshadri and Mukhopadhyay (1993) พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *P. acidipropionici* จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิระหว่าง 26 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส โดยมีค่าเท่ากับ 0.05 และ 0.115 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์วิตามินบี12 สำหรับ *Propionibacterium* sp. อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส (Holt *et al.*, 1994) พรพรรณ (2519) ทำการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (ATCC 13673) ใน complete medium ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 20, 25, อุณหภูมิห้อง (28 - 30) และ 37 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่าที่อุณหภูมิห้องเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อมากที่สุด ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด คิดเป็นน้ำหนักแห้งได้ 2.0 กรัมต่อลิตร

Seshadri and Mukhopadhyay (1993) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตกรดพรอพิโอนิกในถังหมักของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 26, 30, 34, 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อจะเพิ่มสูงขึ้นที่อุณหภูมิ 34 และ 37 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียสแล้ว ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะลดลงอย่างรวดเร็ว

Park *et al.* (1967) ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียพรอพิโอนิกที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 2.8 - 7.2 องศาเซลเซียส

3.2.6 พีเอชของอาหาร

เมื่อศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญของเชื้อ *P. microaerophilum* โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าค่าพีเอชในช่วง 6.5 - 7.5 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ โดยดูจากค่าผลได้ของเซลล์แห้ง (33.43, 32.10 และ 34.08 กรัมต่อโมลกลูโคส) และอัตราการเจริญของเชื้อ (0.061, 0.065 และ 0.063 ต่อชั่วโมง) (Koussémon *et al.*, 2003)

Hsu and Yang (1991) ศึกษาผลของพีเอชต่อการหมักแลกโทส เพื่อผลิตกรดพรอพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจะมีค่าอยู่ในช่วง 6.0 - 7.1 ซึ่งให้ค่าการเจริญจำเพาะของเชื้อเท่ากับ 0.23 ต่อชั่วโมง

Neronova *et al.* (1962) พบว่า *P. shermanii* เจริญได้ในช่วงพีเอชกว้างมาก คือ 5.5 - 7.5 ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 6.3 - 7.5 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 7.0 ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเติมแอมโมเนียมความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาระดับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ ได้ปริมาณเซลล์ 3.9 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงที่พีเอช 5.5 อัตราการเจริญจะลดลงหนึ่งในสามเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงที่พีเอช 7.0 Arkad'eva and Kalenik (1971) พบว่า *P. shermanii* ที่กลายพันธุ์เจริญในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ทุกสายพันธุ์ไม่เจริญที่พีเอช 4.5 และเจริญได้น้อยมากที่พีเอช 10.0

Ibragimova *et al.* (1969) ศึกษาผลของไฮโดรเจนและไฮดรอกซิลไอออนต่อการเจริญของ *P. shermanii* พบว่าพีเอชมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียที่อายุต่าง ๆ กัน โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญในช่วงต้นของระยะเอกซ์โพเนนเชียล คือ 6.8 - 7.1 ได้อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.14 ต่อชั่วโมง พีเอชที่เหมาะสมในช่วงระยะเอกซ์โพเนนเชียล คือ 6.4 - 6.9 และพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญในช่วงระยะถดถอย (Decreasing reproduction rate) อยู่ในช่วง 6.8 - 7.2

พรพรรณ (2519) พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *P. freudenreichii* sub sp. *shermanii* (ATCC 13673) คือ 6.6 และ 7.0 โดยมีการเจริญใกล้เคียงกัน คือ คิดเป็นน้ำหนักแห้งได้ 1.925 และ 1.975 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ Seshadri and Mukhopadhyay (1993) เลี้ยง *P. acidipropionici* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่พีเอช 4.0 แบคทีเรียนี้ไม่สามารถเจริญได้ แต่เจริญได้ดีที่พีเอช 6 - 7 โดยมีระยะพักตัวสั้นที่สุดประมาณ 6 ชั่วโมง และได้ปริมาณเซลล์ 3.5 กรัมต่อลิตร แต่ถ้าพีเอชสูงกว่านี้ การเจริญของเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วและมีระยะพักตัวที่นานกว่า ต่อมา Quesada-Chanto *et al.* (1994) รายงานว่าแบคทีเรียนี้สามารถสร้างเซลล์ได้มาก และผลิตกรดพรอพิโอนิก กรดแอซิดิก วิตามินบี 12 ได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 6.5 และ 7.0 ส่วน Rehberger and Glatz (1998) ทำการคัดเลือก *Propionibacterium* sp. 17 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 พบว่าไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถเจริญได้

3.2.7 การให้อากาศ

Neronova *et al.* (1962) เปรียบเทียบการเลี้ยง *P. shermanii* ในสภาพที่ไม่มีการเขย่าที่ให้อากาศ (Aerobic) และไร้อากาศ (Anaerobic) พบว่าในสภาพที่มีอากาศจะได้ปริมาณเซลล์ (4.8 กรัมต่อลิตร) มากกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ไร้อากาศ (3.9 กรัมต่อลิตร)

พรพรรณ (2519) ได้ทำการเปรียบเทียบการให้อากาศโดยวิธีการต่าง ๆ ต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของ *P. freudenreichii* sub sp. *shermanii* (ATCC 13673) ปรากฏว่าวิธีที่ไม่มีการเขย่า 7 วัน ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกับวิธีผสมระหว่างวิธีที่ไม่มีการเขย่า 4 วัน และใช้เขย่าพลาสติก 3 วัน คือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ 96 ชั่วโมง ทั้งสองวิธีให้ปริมาณเซลล์เท่ากัน คือ 2.5 กรัมต่อลิตร ส่วนวิธีการอื่นได้แก่ วิธีเขย่าพลาสติก 7 วัน วิธีผสมที่ไม่มีการเขย่า 2 วัน และเขย่าพลาสติก 5 วัน รวมทั้งวิธีผสมระหว่างที่ไม่มีการเขย่า 3 วัน และเขย่าพลาสติก 4 วัน ได้เซลล์สูงสุดปริมาณน้อยกว่า

3.2.8 ปริมาณกรดที่เกิดขึ้น

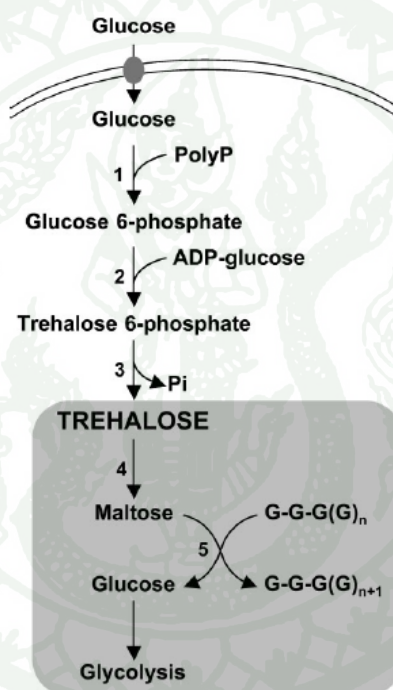
จากการศึกษาของ Neronova *et al.* (1967b) รายงานว่ากรดพรอพิโอนิกความเข้มข้น $13-14 \times 10^{-2}$ โมลต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. shermanii* ในขณะที่กรดแอซิติกมีผลต่อการเจริญของ *P. shermanii* เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Yang and Huang (1995) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* ที่ถูกตรึงในแผ่นใยสังเคราะห์ที่พันเป็นเกลียวในกระบวนการ Recycle แบบเบ็ดเสร็จ พบว่าถ้ามีความเข้มข้นของเกลือพรอพิโอเนตปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร Whey permeate มีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ลดลง

3.2.9 ความเข้มของแสง

Vorob'eva (1967) ศึกษาผลของความเข้มข้นของแสงต่อการเจริญของ *P. shermanii* โดยใช้แหล่งของแสงชนิดหลอดไส้และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่ความเข้มของแสงมากกว่า 60×10^3 erg.cm²/sec จะยับยั้งการเจริญแบคทีเรียพรอพิโอนิก นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ความสามารถในการออกซิไดซ์และการผลิตกรดพรอพิโอนิกลดลง

3.3 การผลิตทรีฮาโลสจากแบคทีเรียพร็อพิโอนิก

Hols (2003) รายงานว่ามีแบคทีเรียพร็อพิโอนิกหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ทรีฮาโลสสะสมไว้ภายในเซลล์ เช่น *P. freudenreichii* (spp. *shermanii*), *P. acidipropionici*, *P. thoenii* และ *P. jensenii* เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียพร็อพิโอนิกที่พบในนมจะสามารถเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ที่มีอยู่ เช่น แล็กเทต แล็กโทส กลูโคส และกาแล็กโทสให้เป็นสารตัวกลาง คือ glucose-6-phosphate และ ADP-glucose ซึ่งนำมาใช้ในการสังเคราะห์ทรีฮาโลส (Langsrud and Reinbold, 1973) แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กระบวนการเมแทบอลิซึมทรีฮาโลสของ *P. freudenreichii* โดยที่ 1 คือ เอนไซม์กลูโคไคเนส (Glucokinase), 2 คือ เอนไซม์ทรีฮาโลส-6-ฟอสเฟตซินเทส (Trehalose-6-phosphate synthase), 3 คือ เอนไซม์ทรีฮาโลส-6-ฟอสเฟตฟอสฟาเทส (Trehalose-6-phosphate phosphatase), 4 คือ เอนไซม์ทรีฮาโลสซินเทส (Trehalose synthase), 5 คือ เอนไซม์อะมิโลมอลเทส (Amylomaltase), PolyP คือ พอลิฟอสเฟต (Polyphosphate), G คือ กลูโคส

ที่มา: Cardoso *et al.* (2007)

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสของแบคทีเรียพรอปิโอนิกที่พบในนมภายใต้สภาวะต่าง ๆ ของ Cardoso *et al.* (2004) พบว่าแบคทีเรียในจีนัส *Propionibacterium* หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตทรีฮาโลส แต่เชื้อที่มีความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสได้สูงคือ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* NIZO B365 โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในแลกโทสจะสามารถผลิตทรีฮาโลสได้ปริมาณสูงสุด และหากทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำลงจาก 30 เป็น 20 องศาเซลเซียส จะไม่มีผลในการสังเคราะห์ทรีฮาโลส ในทางกลับกันหากลดค่าพีเอชของอาหารลงจาก 7.0 เป็น 4.7 หรือเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หรือทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศ ($24 \mu\text{M O}_2$) ที่พีเอช 7.0 จะสามารถเพิ่มการสะสมทรีฮาโลสจากประมาณ 200 เป็น 400 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์โปรตีน

จากการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีและยีนของวิธีการเมแทบอลิซึมของเชื้อ *P. freudenreichii* เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเครียด 3 สภาวะ ได้แก่ ออสโมติก (Osmotic stress) เป็นการเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ในอาหารจาก 0 เป็น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v), ออกซิเดทีฟ (Oxidative stress) เป็นการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นออกซิเจน 0.115 mM และกรด (Acid stress) เป็นการปรับค่าพีเอชของอาหารจากพีเอช 7 เป็นพีเอช 5 ของ Cardoso *et al.* (2007) พบว่า สภาวะเครียดที่ทำการศึกษาทั้ง 3 สภาวะ มีผลทำให้ปริมาณ OtsA เพิ่มขึ้น 2 เท่า จากชั่วโมงที่ 2 ถึง 10 ซึ่งตรงกันข้ามกับ TreS จะลดปริมาณลงจากเริ่มแรกประมาณเศษหนึ่งส่วนสี่เท่าจากชั่วโมงที่ 0 ถึง 5 ในสภาวะเครียดจากกรดและออกซิเดทีฟ แต่ไม่มีผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสภาวะเครียดจากออสโมติก โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะเครียดจากออกซิเดทีฟ และสภาวะเครียดจากออสโมติก จะมีปริมาณทรีฮาโลสเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 7 เท่า (จาก 30 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์โปรตีน เป็น 200 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์โปรตีน) เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะเครียดจากกรดจะมีปริมาณทรีฮาโลสเพิ่มสูงขึ้นเพียง 2.3 เท่า (ประมาณ 70 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์โปรตีน) เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ

4. การออกแบบการทดลองตามแบบทะกุจิ (Taguchi Design of experiment)

การออกแบบการทดลองตามแบบทะกุจิได้แนวคิดมาจาก Dr. Genichi Taguchi นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น ผู้ที่เสนอปรัชญาในการออกแบบทางวิศวกรรมคุณภาพที่ว่าผลิตภัณฑ์ควรจะออกแบบ เพื่อให้ได้ผลในการทำงานที่ดีและมีความแปรผันต่อผลการดำเนินงานน้อยที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลของผลิตภัณฑ์ควรถูกทำให้มีความเสถียรต่อความไม่คงที่ของกระบวนการผลิต ความแปรผันของผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม และต้ององค์ประกอบที่ทำให้คุณภาพลดลง (ชวศา,

2544) โดยวิธีการนี้มีการนำมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1940 เพื่อใช้ในการออกแบบการทดลองผลิตอุปกรณ์สื่อสาร ปัจจุบันได้มีการนำแนวคิดนี้มาประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงทางด้านคุณภาพในงานหลาย ๆ ด้าน

วิธีการทฤษฎีให้ความสำคัญกับการออกแบบที่ทำให้สภาวะของกระบวนการหรือผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุดภายใต้ความไว้น้อยที่สุดต่อสาเหตุที่ทำให้เกิดความแปรผันต่าง ๆ และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ต้องมีคุณภาพสูงด้วย เสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนาและการผลิตต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาปัจจัยหลาย ๆ ปัจจัยได้พร้อมกัน มีวิธีการคำนวณที่ไม่ยุ่งยาก และใช้หน่วยในการทดลองน้อยกว่าการออกแบบแผนการทดลองแบบอื่น ซึ่งวิธีการทฤษฎีนี้จะเป็นการศึกษาเพื่อหาผลกระทบของปัจจัยและกำหนดค่าในการทดลองว่าปัจจัยและระดับใดที่มีผลกระทบต่อการทดลองมากที่สุด โดยมีรากฐานมาจากเหตุผลที่สำคัญ 2 ประการ (ชลวศา, 2544) คือ

1. สิ่งกมจะเกิดความสูญเสียทุก ๆ ครั้งที่คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ไม่ตรงตามเป้าหมาย ดังนั้น Taguchi จึงให้เหตุผลว่าการเบี่ยงเบนออกไปจากเป้าหมายเป็นผลทำให้เกิดความสูญเสีย และให้คำจำกัดความของคุณภาพว่า เป็นความสูญเสียที่ผลิตภัณฑ์สร้างขึ้นแก่สังคม

2. การออกแบบผลิตภัณฑ์และกระบวนการผลิตต้องการระบบที่สามารถพัฒนาและมีความก้าวหน้าในทุกขั้นตอน ตั้งแต่การออกแบบระบบ การออกแบบพารามิเตอร์ และการออกแบบค่าเพื่อ

ขั้นตอนพื้นฐานของการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทฤษฎีมี 5 ขั้นตอน (Roy, 2001) ดังนี้

1. การวางแผน ขั้นตอนนี้จะเพื่อกำหนดวัตถุประสงค์และขอบเขตของการทดลอง รวมทั้งพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหรือผลิตภัณฑ์

2. การออกแบบ เป็นขั้นตอนการวางแผนการทดลอง โดยการกำหนดปัจจัยและระดับของปัจจัยที่จะทำการทดลอง และทำการเลือก Orthogonal array ที่เหมาะสม ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงจำนวนการทดลอง และสภาวะของแต่ละการทดลอง

3. การดำเนินการ เมื่อทำการออกแบบการทดลองแล้ว ก็สามารถดำเนินการตามการออกแบบที่กำหนดไว้และให้เป็นไปตามหลักทางสถิติ

4. การวิเคราะห์ ในขั้นตอนนี้ผลที่ได้จากการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ เพื่อพิจารณาผลของปัจจัย และระดับของปัจจัยที่มีความสำคัญกับกระบวนการหรือผลิตภัณฑ์ รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ผลตอบสนองของกระบวนการที่ดีที่สุด และประเมินผลคาดหวังที่จะได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว

การวัดค่าในวิธีการทางสถิติจะแสดงในรูปของอัตราส่วน Signal/Noise (อัตราส่วน S/N) ซึ่งถูกใช้เพื่อวัดอิทธิพลของ noise factor (ตัวแปรที่ไม่สามารถควบคุมได้ในกระบวนการ) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์หรือกระบวนการ โดยอาศัยการวัดลักษณะเชิงคุณภาพ (Quality characteristic, QC) ซึ่งสามารถแสดงถึงความต้องการการเปลี่ยนแปลงของผลการทดลองที่ต้องการต่างกันไป (Rao *et al.*, 2004) ประกอบด้วย 3 รูปแบบ (Roy, 2001) ดังนี้

4.1 มากกว่าดีกว่า (Bigger Is Better, QC = B) การวัดรูปแบบนี้ ค่าที่มีค่ามากกว่าค่าอื่นจะเป็นค่าที่ต้องการมากกว่า ในทางทฤษฎีจะไม่มีกำหนดค่าสูงสุด แต่ในทางปฏิบัติอาจต้องมีการกำหนดค่าสูงสุดเพื่อให้ได้ตัวเลขที่มีความถูกต้อง โดยสามารถพิจารณาค่าเป้าหมายได้จากค่าเฉลี่ย

4.2 น้อยกว่าดีกว่า (Smaller Is Better, QC = S) การวัดรูปแบบนี้ ค่าที่มีค่าน้อยกว่าค่าอื่นจะเป็นค่าที่ต้องการมากกว่า ในทางทฤษฎีเป้าหมายจะมีค่าเป็นศูนย์ ส่วนค่าจริงของค่าต่ำสุดที่เป็นไปได้สามารถกำหนดให้เป็นตัวเลขใด ๆ ก็ได้ตามความเหมาะสม

4.3 เป้าหมายดีที่สุด (Nominal Is Best, QC = N) การวัดรูปแบบนี้ จะมีการกำหนดค่าที่ต้องการไว้ ค่าที่ถูกกำหนดไว้จะถูกเรียกว่า ค่าเป้าหมาย (Target หรือ Nominal value) ในการเปรียบเทียบนั้น ผลที่มีการเบี่ยงเบนออกจากค่าเป้าหมายน้อยกว่าจะถือว่าเป็นค่าที่มีความน่าเชื่อถือ โดยทั่วไปแล้วการเบี่ยงเบนทั้งทางบวกหรือทางลบจะได้รับการพิจารณาเช่นเดียวกัน โดยจะพิจารณาแค่เพียงจำนวนของการเบี่ยงเบนเท่านั้น

5. การยืนยันผล โดยทั่วไปแล้วสภาวะที่ดีที่สุดที่ทำนายมาจากการวิเคราะห์ มักจะไม่ใช้สภาวะที่ทำการทดลองมาแล้ว ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงเป็นขั้นตอนที่ต้องทำการทดลองใน

สภาวะที่ถูกกำหนดขึ้นมาใหม่ เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าสภาวะดังกล่าวสามารถช่วยปรับปรุงผลได้จริงหรือไม่ หรือให้ผลใกล้เคียงกับความเป็นจริงหรือไม่



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ และเซลล์เพาะเลี้ยง GmbH ของสถาบันไลบ์นิซ ประเทศเยอรมันนี (The Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH) เก็บรักษาไว้ที่ศูนย์จุลินทรีย์ของ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึ่งเป็นแบคทีเรียพรอพิโอนิกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันได้สูงสุด (Cardoso *et al.*, 2004)

2. เครื่องมือ

2.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Fermentor; BioFlo 110, New Brunswick Scientific) ขนาด 3 ลิตร พร้อมระบบควบคุมการกวน การให้อากาศ อุณหภูมิ และพีเอช

2.2 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator; Vision Scientific Co., Ltd., Korea)

2.3 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC; Shimadzu, Japan)

2.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer; Thermo Spectronic)

2.5 เครื่องวัดพีเอช (pH meter; METTLER TOLEDO)

2.6 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave; TOMY model ES-315)

2.7 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge; Sigma 203, B. Braun Biotech International, Germany)

2.8 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius)

2.9 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius)

2.10 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

2.11 ตู้เป่าเชื้อ (Laminar flow)

2.12 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator; Memmert)

2.13 โถดูดความชื้น (Dessicator)

2.14 เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator; Crest)

2.15 เครื่องเขย่า (Vortex; Mixer Uzusio model VTX-3000L, Laboratory and Medical Supplies Co., Ltd.)

2.16 เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่น ๆ (ดังระบุในการทดลอง)

3. สารเคมี

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Complete medium ดัดแปลงจาก Suwannakham (2005)

HIMEDIA)	- เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน (Casein enzyme hydrolysate, type I;		
		5	กรัมต่อลิตร
	- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract; AES)	10	กรัมต่อลิตร
	- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4 ; UNIVAR)	0.25	กรัมต่อลิตร
	- แมงกานีสซัลเฟต (MnSO_4 ; UNIVAR)	0.05	กรัมต่อลิตร
	- แล็กโทส (Lactose; UNIVAR)	20	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชของอาหารให้มีความเท่ากับ 6.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl; J.T. Baker) ความเข้มข้น 2 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH; J.T. Baker) ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ก่อนนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2 สารสกัดทรีฮาโลส

- บัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟตความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0
- กรดไตรคลอโรแอซิดิก (Trichloroacetic acid; POCH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

3.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นทรีฮาโลสโดยวิธี HPLC

- น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
- แอซิโตนไนไทรล์ (Acetonitrile; RCI Labscan)
- คอลัมน์ Hypersil- NH_2 ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร (Thermo Electron Corporation)
- ทรีฮาโลส (Trehalose; Fluka)

3.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นแล็กโทส กรดพรอปิโอนิก กรดแอซีติก และ กรดซักซินิกโดยวิธี HPLC

- น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
- กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4 ; J.T. Baker)
- คอลัมน์ Aminex HPX-87H ขนาด 300×7.8 มิลลิเมตร (Bio-Rad)
- แล็กโทส (Lactose; UNIVAR)
- กรดพรอปิโอนิก (Propionic acid; SIGMA-ALDRICH)
- กรดแอซีติก (Acetic acid; SIGMA-ALDRICH)
- กรดซักซินิก (Succinic acid; SIGMA-ALDRICH)

วิธีการ

1. การศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสของ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 ในขวดรูปชมพู่

1.1 การออกแบบการทดลองโดยวิธีการทะกุจิ

การศึกษาศักยภาพในการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสของแบคทีเรียพรอปิโอนิกในระดับขวดรูปชมพู่ ทำโดยใช้วิธีการออกแบบการทดลองตามวิธีการทะกุจิ ซึ่งสามารถช่วยลดจำนวนการทดลองลงจาก 81 การทดลอง เหลือเพียง 9 การทดลอง โดยทำการศึกษาผลกระทบของปัจจัย 4 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นแล็กโทส พีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ และ อัตราการเขย่า ที่ปัจจัยละ 3 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 จากจำนวนของปัจจัยและระดับของปัจจัย ที่ต้องการศึกษาสอดคล้องกับแผนการออกแบบการทดลอง Orthogonal Array L9 (3^4) ตามแผนการทดลองมาตรฐานของวิธีการทะกุจิ ซึ่งสามารถแสดงแผนการทดลองทั้ง 9 การทดลองดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

ระดับ	ปัจจัย			
	ความเข้มข้นแลกโทส (กรัมต่อลิตร)	พีเอชเริ่มต้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)
1	10	5	30	0
2	20	6	35	100
3	30	7	40	150

ตารางที่ 4 สภาวะการทดลองทั้ง 9 การทดลองจากการออกแบบโดยวิธีการทะลุฉีก

การทดลอง	ปัจจัย			
	ความเข้มข้นแลกโทส (กรัมต่อลิตร)	พีเอช เริ่มต้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เขย่า (รอบต่อนาที)
1	10	5	30	0
2	10	6	35	100
3	10	7	40	150
4	20	5	35	150
5	20	6	40	0
6	20	7	30	100
7	30	5	40	100
8	30	6	30	150
9	30	7	35	0

ที่มา: คัดแปลงมาจาก Roy (2001)

1.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

ทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Complete medium ปริมาตร 3.6 มิลลิลิตร พีเอช 6.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Complete medium ปริมาตร 36

มิลลิลิตร พีเอช 6.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Complete medium ปริมาตร 360 มิลลิลิตร พีเอช 6.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

1.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่

นำกล้าเชื้อปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากข้อ 1.2 ถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Complete medium ปริมาตร 360 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการแปรผันความเข้มข้นของแลคโทส ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร อุณหภูมิในการหมัก และอัตราการเขย่า ตามแผนการทดลองที่ออกแบบโดยวิธารทะกฤติ (ตารางที่ 4) ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนครบเวลา 240 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นทริฮาโลส แลคโทส และน้ำหนักรีดิวซ์ และพีเอช

2. การศึกษาผลของการปรับพีเอชต่อความสามารถในการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตทริฮาโลสของ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Complete medium ปริมาตร 3.6 มิลลิลิตร พีเอช 6.5 จำนวน 5 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Complete medium ปริมาตร 180 มิลลิลิตร พีเอช 6.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทริฮาโลสโดยวิธีการทะกฤติในระดับขวดรูปชมพู่ โดยนำกล้าเชื้อปริมาตร 180 มิลลิลิตร จากข้อ 2.1 ถ่ายลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Complete medium ความเข้มข้นแลคโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอช 7.0 ปริมาตร 1,620 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา

เซลล์ชีส นาน 30 นาที ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการกวน 80 รอบต่อนาที เพื่อรักษาสภาพให้เชื้อมีชี้อาหารเกิดการผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (Cardoso *et al.*, 2004) โดยไม่มีการให้อากาศ การเพาะเลี้ยงในช่วงเริ่มต้นจะไม่มี การควบคุมค่าพีเอช จนกระทั่งค่าพีเอชของน้ำหมักเริ่มมีค่าคงที่จึงทำการปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง โดยการปรับค่าพีเอชของน้ำหมักเป็น 5.5 (ปรับค่าพีเอช โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์) และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อตามสภาวะดังกล่าวจนกระทั่งเหลือปริมาตรของน้ำหมักประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น จากนั้นทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มให้กลับมามีปริมาตร 1,800 มิลลิลิตร แล้วปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง โดยการปรับค่าพีเอชของน้ำหมักให้มีค่าเท่ากับ 7.0 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อตามสภาวะดังกล่าวจนกระทั่งเชื้อมีการใช้แลกโทสจนใกล้จะหมด (แลกโทสมีความเข้มข้นเหลือประมาณ 5 กรัมต่อลิตร) จึงปรับค่าพีเอชของน้ำหมักให้มีค่าเท่ากับ 5.5 และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อตามสภาวะดังกล่าวจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนครบเวลา 258 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นทรีฮาโลส แลกโทส กรดพอร์ฟิโอนิก กรดแอซิดิก กรดซักซินิก และปริมาณเซลล์แห้ง

3. การสกัดทรีฮาโลส

นำตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงแยกเซลล์ไว้สำหรับนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นแลกโทส กรดพอร์ฟิโอนิก กรดแอซิดิก และกรดซักซินิก นำส่วนเซลล์ที่ได้มาล้างด้วยบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟตความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 จำนวน 2 ครั้ง ทำการสกัดทรีฮาโลสตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Mahmud *et al.* (2009) โดยใช้กรดไทรคลอโรแอซิดิก (Trichloroacetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้และทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง นำสารละลายส่วนใสจากการสกัดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มารวมกันและนำไปทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นทรีฮาโลสต่อไป

4. การเลียนแบบกระบวนการหมัก

ทำการประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตทรีฮาโลสโดยวิธีการ Curve fit ด้วยโปรแกรม Berkeley Madonna

5. การวิเคราะห์

5.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แห้ง

วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง โดยการนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.1 - 1.0 ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นแล็กโทสและค่าพีเอชต่าง ๆ เป็น Blank นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำหนักรีดเซลล์แห้ง เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณเซลล์แห้งของตัวอย่างที่หาจากค่าการดูดกลืนแสงแทนการหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยตรง (ดัดแปลงมาจาก Coral *et al.*, 2008) (แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ข)

5.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นทรีฮาโลสด้วยวิธี HPLC

วิเคราะห์ความเข้มข้นทรีฮาโลส และแล็กโทสด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Hypersil-NH₂ ขนาด 250 × 4.6 มิลลิเมตร การวิเคราะห์นี้ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นแอซีโตไนโตรล์ 75 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำปราศจากไอออน ด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Zhu *et al.* (2008) นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ข)

5.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นแล็กโทส กรดพรอพิโอนิก กรดแอซีติก และกรดซัคซินิกด้วยวิธี HPLC

วิเคราะห์ความเข้มข้นของแล็กโทส กรดพรอพิโอนิก กรดแอซีติก และกรดซัคซินิก โดยใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87H ขนาด 350 × 7.8 มิลลิเมตร การวิเคราะห์นี้ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 45 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Zeidan and Niel (2010) นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ข)

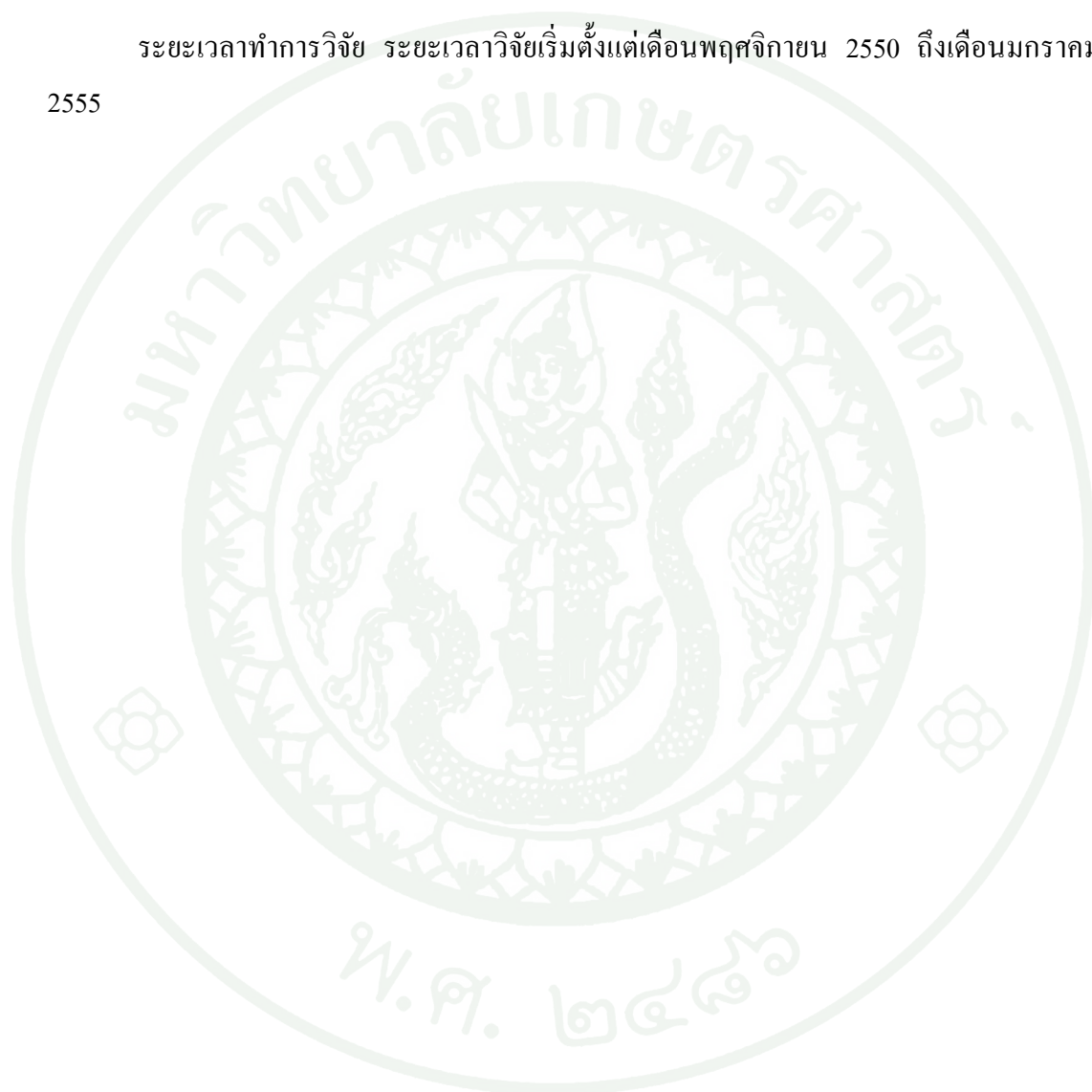
5.4 การคำนวณหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตทรีฮาโลส

ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตทรีฮาโลส โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Qualitek 4 (version 7.5.0 Nutek Inc., USA)

6. สถานที่และระยะเวลาการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ระยะเวลาทำการวิจัย ระยะเวลาวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงเดือนมกราคม 2555



ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสของ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 ในขบวนการหมัก

1.1 การทดลองตามแผนการทดลองที่ออกแบบด้วยวิธีการทะกุจิ

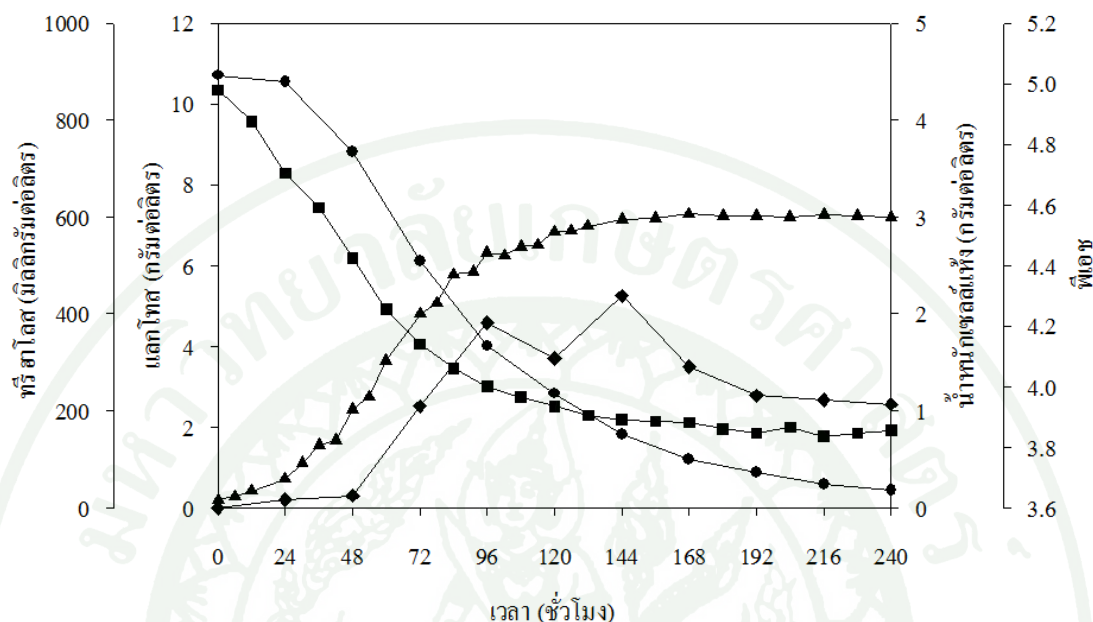
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 โดยใช้อาหาร Complete medium ในขบวนการหมักตามสภาวะที่ออกแบบโดยวิธีการทะกุจิ โดยอาศัย Orthogonal Array L9 ตามสภาวะดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณทรีฮาโลส ปริมาณแลกโทส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักได้ดังนี้

1.1.1 การทดลองที่ 1

การผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในขบวนการหมัก ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 0 รอบต่อนาที ความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณทรีฮาโลส ปริมาณแลกโทส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก แสดงดังภาพที่ 4 (แสดงข้อมูลการทดลองในตารางผนวกที่ ก1)

จากภาพที่ 4 พบว่า ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงแรก เชื้ออยู่ในระยะการปรับตัว (Lag phase) จึงมีการใช้แลกโทสเพียงเล็กน้อย หลังจากนั้นเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) แลกโทสจึงถูกใช้อย่างรวดเร็ว จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 84 การเจริญของเชื้อเริ่มลดลง และเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 126 ในที่สุด โดยในระยะนี้เชื้อมีการใช้แลกโทสค่อย ๆ ลดลง เมื่อพิจารณาถึงการสะสมทรีฮาโลส พบว่าการสะสมทรีฮาโลสเพียงเล็กน้อยในช่วง 48 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นมีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล และมีการสะสมลดลงเล็กน้อยในช่วงที่เชื้อเริ่มจะเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ โดยเชื้อมีการสะสมทรีฮาโลสสูงสุดในช่วงต้นของระยะการเจริญแบบคงที่ที่เวลา 144 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 438.00 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทรีฮาโลสมีการสะสมลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า การเจริญของเชื้อจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่าพีเอช โดยการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อ

ค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าประมาณ 3.9 และในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะคงที่ ค่าพีเอชก็มีค่าคงที่เช่นกัน



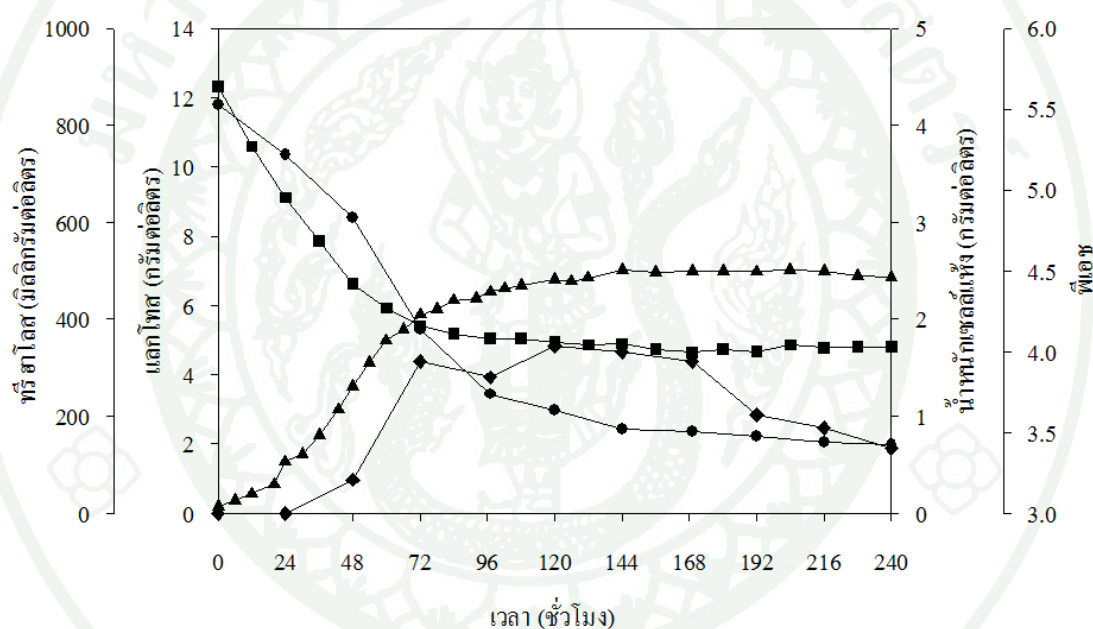
ภาพที่ 4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแกลโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 0 รอบต่อนาที (ความเข้มข้นแกลโทส, ●; ความเข้มข้นทรีฮาโลส, ◆; น้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ และพีเอช, ■)

1.1.2 การทดลองที่ 2

การผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นแกลโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณทรีฮาโลส ปริมาณแกลโทส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักแสดงดังภาพที่ 5 (แสดงข้อมูลการทดลองในตารางผนวกที่ ก2)

จากภาพที่ 5 พบว่าในช่วงเวลา 20 ชั่วโมงแรก เชื้ออยู่ในระยะการปรับตัว (Lag phase) หลังจากนั้นเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 60 การเจริญของเชื้อเริ่มลดลง และเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 102 ใน

ที่สุด โดยในสภาวะการทดลองนี้เชื้อมีการใช้แลกโทสอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มการเพาะเลี้ยง และจะมีการใช้แลกโทสลดลง เมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ เมื่อพิจารณาถึงการสะสมทรีฮาโลส พบว่าเริ่มมีการสะสมทรีฮาโลสหลังจากชั่วโมง 24 หลังจากนั้นมีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล และมีการสะสมลดลงเล็กน้อยในช่วงที่เชื้อเริ่มจะเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ โดยเชื้อมีการสะสมทรีฮาโลสสูงสุดในช่วงต้นของระยะการเจริญแบบคงที่ที่เวลา 120 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 341.80 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทรีฮาโลสมีการสะสมลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของเชื้อจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่าพีเอช โดยการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าประมาณ 4 และในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะคงที่ ค่าพีเอชก็มีค่าคงที่เช่นกัน



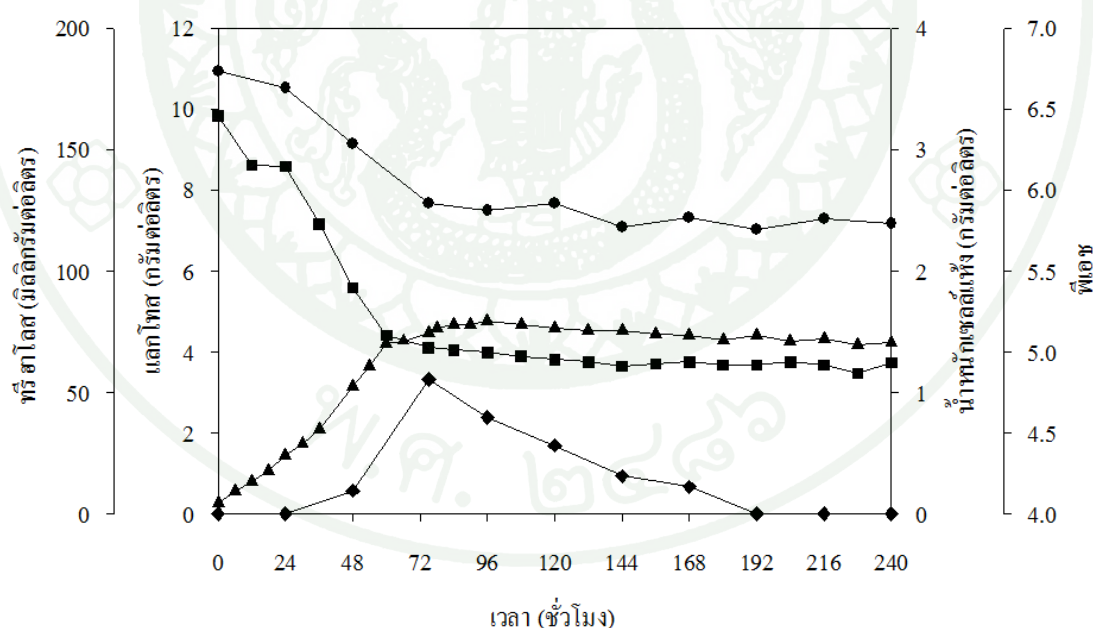
ภาพที่ 5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที (ความเข้มข้นแลกโทส, ●; ความเข้มข้นทรีฮาโลส, ◆; น้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ และพีเอช, ■)

1.1.3 การทดลองที่ 3

การผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิตร ภายใต้สภาวะที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอช

เริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณทรีฮาโลส ปริมาณแลกโทส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักแสดงดังภาพที่ 6 (แสดงข้อมูลการทดลองในตารางผนวกที่ ก3)

จากภาพที่ 6 พบว่า เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 60 การเจริญของเชื้อเริ่มลดลง และเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 96 ในที่สุด โดยในสภาวะการทดลองนี้เชื้อมีการใช้แลกโทสอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มการเพาะเลี้ยง และจะมีการใช้แลกโทสลดลง เมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ เมื่อพิจารณาถึงการสะสมทรีฮาโลส พบว่าเริ่มมีการสะสมทรีฮาโลสหลังจากชั่วโมง 24 หลังจากนั้นมีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล และมีการสะสมทรีฮาโลสสูงสุดก่อนช่วงที่เชื้อจะมีระยะการเจริญแบบคงที่ที่เวลา 75 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 55.20 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทรีฮาโลสมีการสะสมลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของเชื้อจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่าพีเอช โดยการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าประมาณ 5.1 และในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะคงที่ ค่าพีเอชก็มีค่าคงที่เช่นกัน

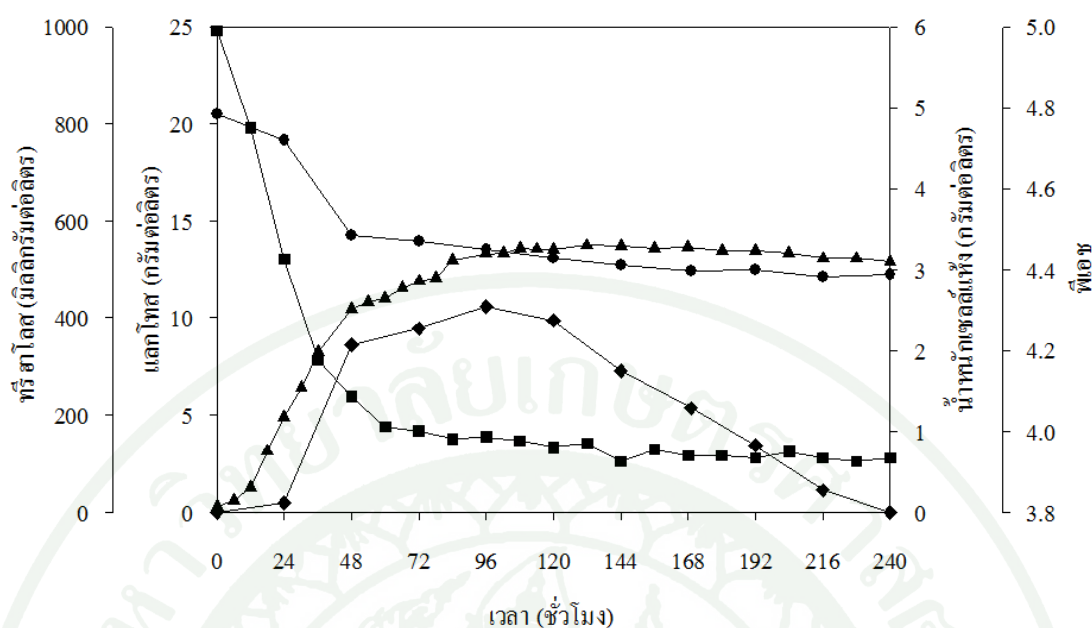


ภาพที่ 6 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที (ความเข้มข้นแลกโทส, ●; ความเข้มข้นทรีฮาโลส, ◆; น้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ และพีเอช, ■)

1.1.4 การทดลองที่ 4

การผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณทรีฮาโลส ปริมาณแลกโทส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก แสดงดังภาพที่ 7 (แสดงข้อมูลการทดลองในตารางผนวกที่ ก4)

จากภาพที่ 7 พบว่าในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงแรก เชื้ออยู่ในระยะการปรับตัว (Lag phase) หลังจากนั้นเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) จนกระทั่งถึง ชั่วโมงที่ 48 การเจริญของเชื้อเริ่มลดลง และเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 108 ในที่สุด โดยในสภาวะการทดลองนี้การใช้แลกโทสของเชื้อในช่วง 24 ชั่วโมงแรก จะมีการใช้ไม่มากนัก หลังจากนั้นมีการใช้อย่างต่อเนื่องจนกระทั่งชั่วโมงที่ 48 และมีการใช้แลกโทสลดลง เมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ เมื่อพิจารณาถึงการสะสมทรีฮาโลส พบว่ามีการสะสมทรีฮาโลส เพียงเล็กน้อยในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และมีการสะสมทรีฮาโลสสูงสุดในช่วงต้นของระยะการเจริญแบบคงที่ที่เวลา 96 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 423.60 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทรีฮาโลสมีการ สะสมลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า การเจริญของเชื้อจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่าพีเอช โดย การเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าประมาณ 4.09 และในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ใน ระยะคงที่ ค่าพีเอชก็มีค่าคงที่เช่นกัน



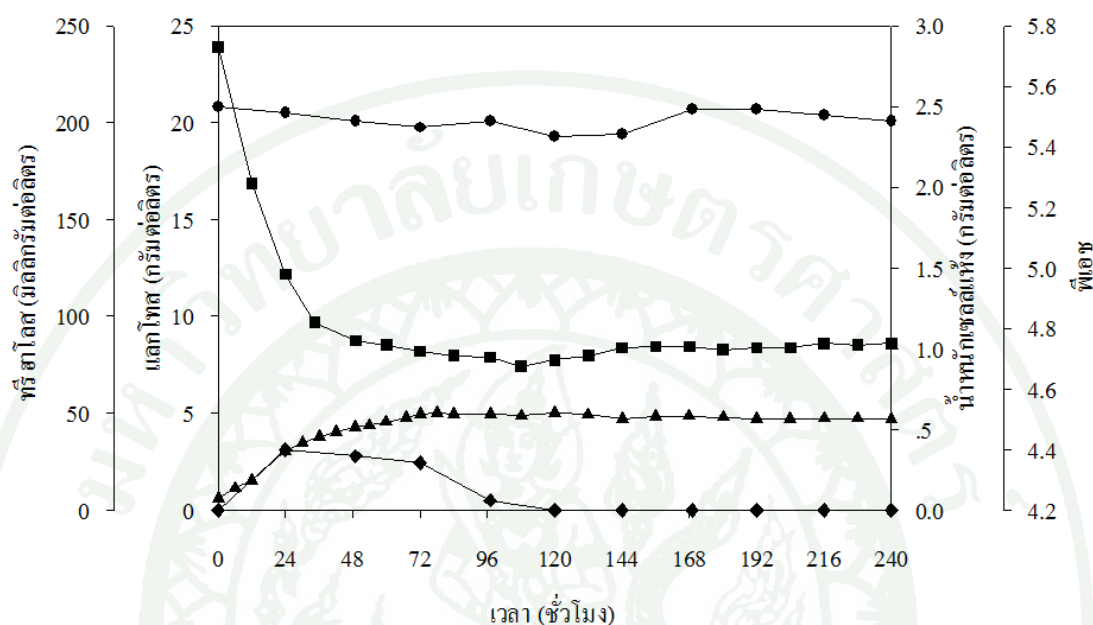
ภาพที่ 7 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแกลโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอสเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที (ความเข้มข้นแกลโทส, ●; ความเข้มข้นพีเอส, ◆; น้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ และพีเอส, ■)

1.1.5 การทดลองที่ 5

การผลิตพีเอสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นแกลโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอสเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 0 รอบต่อนาที ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณพีเอส ปริมาณแกลโทส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอส ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักแสดงดังภาพที่ 8 (แสดงข้อมูลการทดลองในตารางผนวกที่ ก5)

จากภาพที่ 8 พบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 24 การเจริญของเชื้อเริ่มลดลง และเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 72 ในที่สุด โดยที่สภาวะการทดลองนี้แทบจะไม่พบการใช้แกลโทสเลย เมื่อพิจารณาถึงการสะสมพีเอส พบว่ามีการสะสมพีเอสตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง โดยมีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล และมีการสะสมพีเอสสูงสุดก่อนช่วงที่เชื้อจะมีระยะการเจริญแบบคงที่ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 31.00

มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทริฮาโลสมีการสะสมลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า การเจริญของเชื้อจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่าพีเอช โดยการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าประมาณ 4.98 และในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะคงที่ ค่าพีเอชก็มีค่าคงที่เช่นกัน



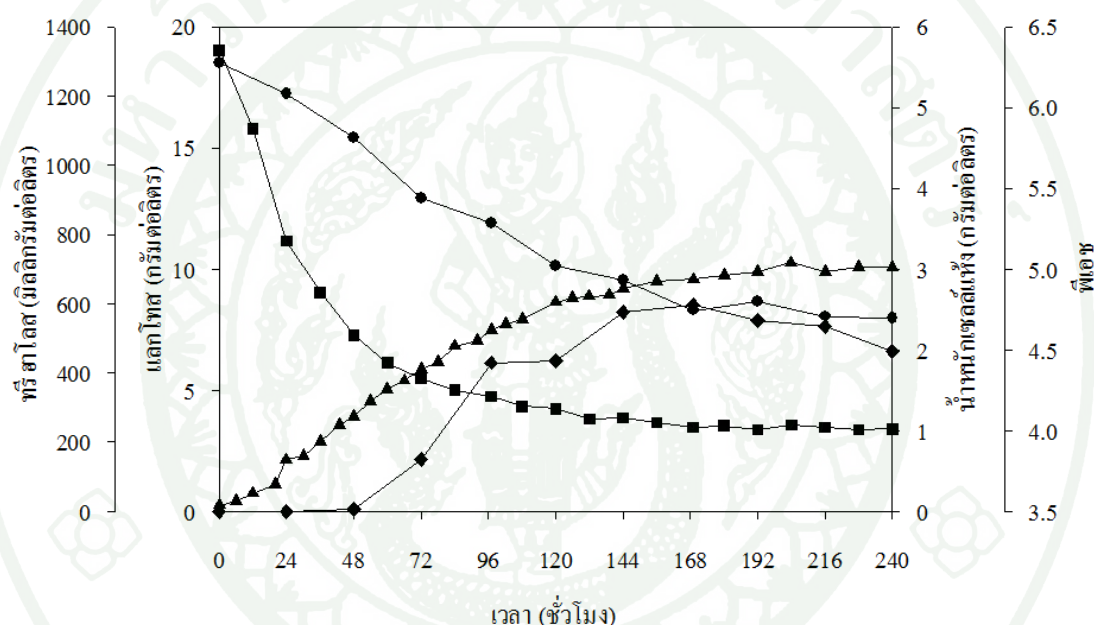
ภาพที่ 8 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 0 รอบต่อนาที (ความเข้มข้นแลกโทส, ●; ความเข้มข้นทริฮาโลส, ◆; น้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ และพีเอช, ■)

1.1.6 การทดลองที่ 6

การผลิตทริฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณทริฮาโลส ปริมาณแลกโทส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักแสดงดังภาพที่ 9 (แสดงข้อมูลการทดลองในตารางผนวกที่ 6)

จากภาพที่ 9 พบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 36 การเจริญของเชื้อเริ่มลดลง และเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary

phase) ที่ชั่วโมงที่ 156 ในที่สุด โดยในสภาวะการทดลองนี้เชื้อค่อย ๆ ใช้แลกโทสอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่เริ่มการเพาะเลี้ยงจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาถึงการสะสมทรีฮาโลส พบว่าเริ่มมีการสะสมทรีฮาโลสหลังจากชั่วโมง 24 โดยมีการสะสมเพียงเล็กน้อยจนกระทั่งชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นมีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล และมีการสะสมทรีฮาโลสสูงสุดในช่วงต้นของระยะการเจริญแบบคงที่ที่เวลา 168 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 595.00 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทรีฮาโลสมีการสะสมลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า การเจริญของเชื้อจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่าพีเอช โดยการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าประมาณ 4.86 และในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะคงที่ ค่าพีเอชก็มีค่าคงที่เช่นกัน



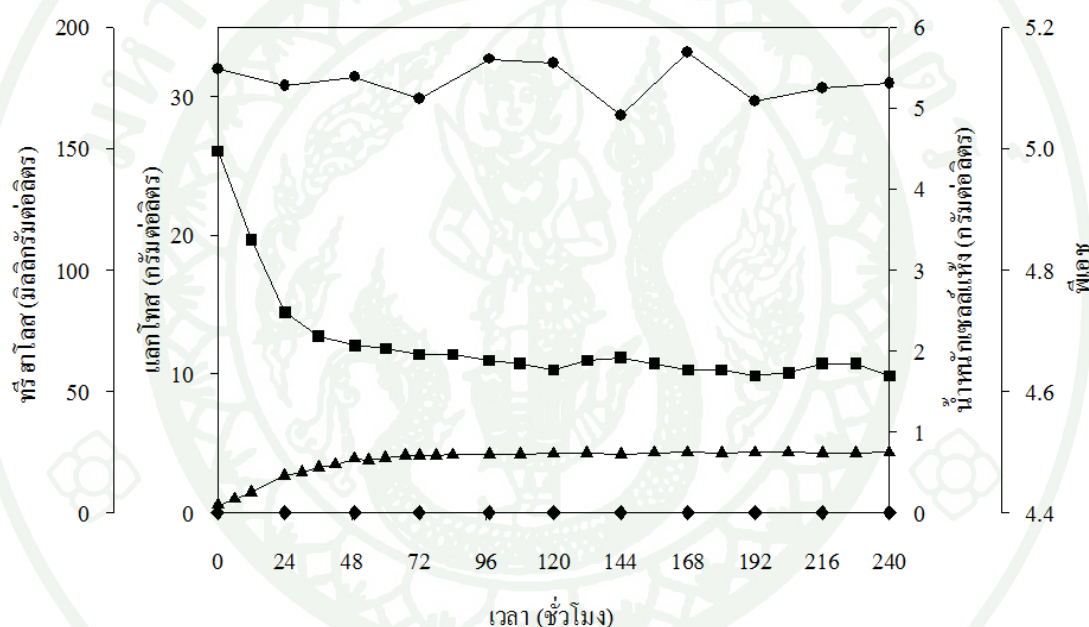
ภาพที่ 9 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที (ความเข้มข้นแลกโทส, ●; ความเข้มข้นทรีฮาโลส, ◆; น้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ และพีเอช, ■)

1.1.7 การทดลองที่ 7

การผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ความสัมพันธ์ระหว่าง

ปริมาณทริฮาโลส ปริมาณแลกโทส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก แสดงดังภาพที่ 10 (แสดงข้อมูลการทดลองในตารางผนวกที่ ก7)

จากภาพที่ 10 พบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 24 การเจริญของเชื้อเริ่มลดลง และเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 67 ในที่สุด โดยที่สภาวะการทดลองนี้แทบจะไม่พบการใช้แลกโทสเลย เมื่อพิจารณาถึงการสะสมทริฮาโลส พบว่า ที่สภาวะการทดลองนี้ไม่พบการสะสมทริฮาโลสเลย นอกจากนี้ยังพบว่า การเจริญของเชื้อจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่าพีเอช โดยการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าประมาณ 4.73 และในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะคงที่ ค่าพีเอชก็มีค่าคงที่เช่นกัน

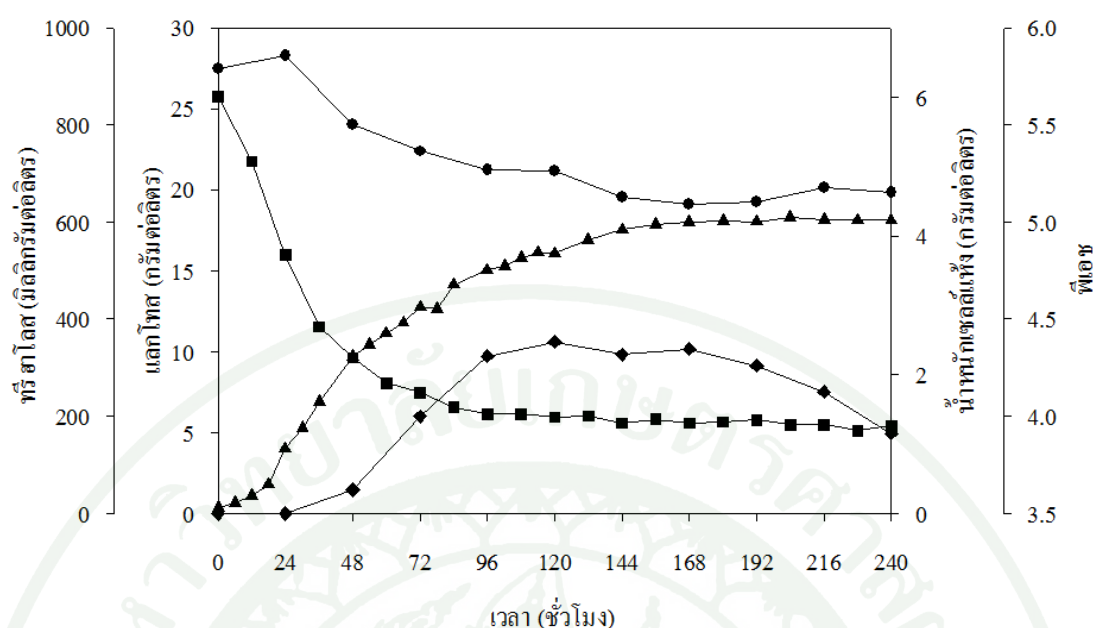


ภาพที่ 10 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที (ความเข้มข้นแลกโทส, ●; ความเข้มข้นทริฮาโลส, ◆; น้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ และพีเอช, ■)

1.1.8 การทดลองที่ 8

การผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณทรีฮาโลส ปริมาณแลกโทส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก แสดงดังภาพที่ 11 (แสดงข้อมูลการทดลองในตารางผนวกที่ ก8)

จากภาพที่ 11 พบว่าในช่วงเวลา 18 ชั่วโมงแรก เชื้ออยู่ในระยะการปรับตัว (Lag phase) หลังจากนั้นเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 84 การเจริญของเชื้อเริ่มลดลง และเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ที่ ชั่วโมงที่ 156 ในที่สุด โดยในสภาวะการทดลองนี้การใช้แลกโทสของเชื้อในช่วง 24 ชั่วโมงแรก จะมีการใช้ไม่มากนัก หลังจากนั้นมีการใช้อย่างต่อเนื่องจนกระทั่งชั่วโมงที่ 48 และมีการใช้แลกโทสลดลง เมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ เมื่อพิจารณาถึงการสะสมทรีฮาโลส พบว่าเริ่มมีการสะสมทรีฮาโลส หลังจากชั่วโมง 24 โดยค่อย ๆ มีการสะสมเพิ่มขึ้นจนกระทั่งชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นมีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล และมีการสะสมทรีฮาโลส สูงสุดก่อนช่วงที่เชื้อจะมีระยะการเจริญแบบคงที่ที่เวลา 120 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 353.11 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทรีฮาโลสมีการสะสมลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของเชื้อจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่าพีเอช โดยการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าประมาณ 4.05 และในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะคงที่ ค่าพีเอชก็มีค่าคงที่เช่นกัน



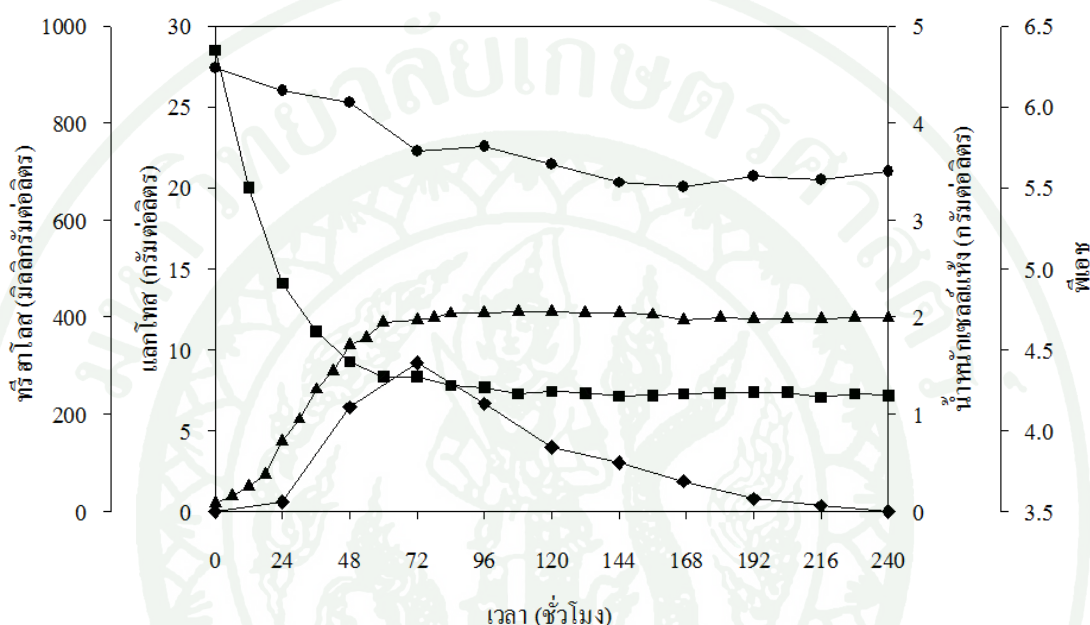
ภาพที่ 11 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที (ความเข้มข้นแลกโทส, ●; ความเข้มข้นทรีฮาโลส, ◆; น้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ และพีเอช, ■)

1.1.9 การทดลองที่ 9

การผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 0 รอบต่อนาที ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณทรีฮาโลส ปริมาณแลกโทส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักแสดงดังภาพที่ 12 (แสดงข้อมูลการทดลองในตารางผนวกที่ ก9)

จากภาพที่ 12 พบว่าในช่วงเวลา 18 ชั่วโมงแรก เชื้ออยู่ในระยะการปรับตัว (Lag phase) หลังจากนั้นเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 48 การเจริญของเชื้อเริ่มลดลง และเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 72 ในที่สุด โดยในสภาวะการทดลองนี้เชื้อจะใช้แลกโทสอย่างช้า ๆ และมีการใช้แลกโทสลดลง เมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ เมื่อพิจารณาถึงการสะสมทรีฮาโลส พบว่ามีการสะสมทรีฮาโลสเพียงเล็กน้อยในช่วง 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นมีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่าง

รวดเร็วในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล และมีการสะสมทรีฮาโลสสูงสุดในช่วงต้นของระยะการเจริญแบบคงที่ที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 306.00 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทรีฮาโลสมีการสะสมลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของเชื้อจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่าพีเอช โดยการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าประมาณ 4.43 และในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะคงที่ ค่าพีเอชก็มีค่าคงที่เช่นกัน



ภาพที่ 12 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ 0 รอบต่อนาที (ความเข้มข้นแลกโทส, ●; ความเข้มข้นทรีฮาโลส, ◆; น้ำหนักเซลล์แห้ง, ▲ และพีเอช, ■)

เมื่อนำผลที่ได้จากการทดลองทั้ง 9 การทดลอง มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าการทดลองที่ 4 และการทดลองที่ 8 มีค่าอัตราการผลิตเซลล์เชิงปริมาตร (Q_X) สูงใกล้เคียงกัน (0.033 และ 0.031 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง ตามลำดับ) รองลงมา คือ การทดลองที่ 9 โดยมีค่าเท่ากับ 0.026 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง และจะเห็นได้ว่าการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 6 ต่างมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 0.017 - 0.020 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าค่าอัตราการผลิตเซลล์เชิงปริมาตร (Q_X) ของการทดลองที่ 5 และ 7 มีค่าเท่ากัน (0.012 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง) เมื่อพิจารณาถึงอัตราการผลิตทรีฮาโลสเชิงปริมาตร (Q_{Tre}) พบว่าการทดลองที่ 4 มีค่าสูงที่สุด (4.412 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง) รองลงมา คือ การทดลองที่ 9, 6, 1, 8, 2, 5, 3 และ 7

ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ 4.250, 3.542, 3.042, 2.943, , 2.848, 1.292, 0.767 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) จะเห็นได้ว่าการทดลองที่ 4 มีค่าสูงที่สุด (0.120 ต่อชั่วโมง) รองลงมา คือ การทดลองที่ 8, 9, 6 และ 2 โดยมีค่าเท่ากับ 0.094, 0.076, 0.070 และ 0.066 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ รองลงมา คือ การทดลองที่ 5 และ 7 ซึ่งค่าเท่ากัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.065 ต่อชั่วโมง รองลงมา คือ การทดลองที่ 3 และ 1 โดยมีค่าเท่ากับ 0.055 และ 0.049 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

เมื่อพิจารณาถึงผลได้ของเซลล์ต่อแลกโทส ($Y_{X/Lac}$) จะเห็นได้ว่าการทดลองที่ 5 มีค่าสูงที่สุด (0.898 กรัมต่อกรัม) รองลงมา คือ การทดลองที่ 8, 4, 3, 9, 1, 6, 2 และ 7 โดยมีค่าเท่ากับ 0.579, 0.446, 0.429, 0.364, 0.326, 0.274, 0.265 และ 0.012 กรัมเซลล์ต่อกรัมแลกโทส ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงผลได้ของทรีฮาโลสต่อแลกโทส ($Y_{Tre/Lac}$) จะเห็นได้ว่าการทดลองที่ 5 มีค่าสูงที่สุด (94.225 มิลลิกรัมทรีฮาโลสต่อกรัมแลกโทส) รองลงมา คือ การทดลองที่ 4, 9, 6, 8, 1, 2, 3 และ 7 โดยมีค่าเท่ากับ 60.505, 59.085, 58.350, 55.739, 49.235, 38.691, 16.907 และ 0 มิลลิกรัมทรีฮาโลสต่อกรัมแลกโทส ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงผลได้ของทรีฮาโลสต่อเซลล์ ($Y_{Tre/X}$) จะเห็นได้ว่าการทดลองที่ 6 มีค่าสูงที่สุด (212.732 มิลลิกรัมทรีฮาโลสต่อกรัมเซลล์) รองลงมา คือ การทดลองที่ 9, 1, 2, 4, 5, 8, 3 และ 7 โดยมีค่าเท่ากับ 162.291, 151.211, 146.270, 135.756, 104.964, 96.314, 49.430 และ 0 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

จากตารางที่ 5 ยังแสดงให้เห็นว่าการทดลองที่ 6 ให้ความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 595.00 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ การทดลองที่ 1, 4, 8, 2, 9, 3, 5 และ 7 โดยมีค่าเท่ากับ 438.00, 423.60, 353.11, 341.80, 306.00, 55.20, 31.00 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์การเจริญเติบโตและการผลิตทรีฮาโลสของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อใช้อาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่

พารามิเตอร์ ¹	การทดลอง								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Q_X (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	0.020	0.019	0.019	0.033	0.012	0.017	0.012	0.031	0.026
Q_{Tre} (มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	3.042	2.848	0.767	4.412	1.292	3.542	0	2.943	4.250
μ^2 (ต่อชั่วโมง)	0.049	0.066	0.055	0.120	0.065	0.070	0.065	0.094	0.076
$Y_{X/Lac}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมแลคโทส)	0.326	0.265	0.429	0.446	0.898	0.274	0.012	0.579	0.364
$Y_{Tre/Lac}$ (มิลลิกรัมทรีฮาโลสต่อกรัมแลคโทส)	49.235	38.691	16.907	60.505	94.225	58.350	0	55.739	59.085
$Y_{Tre/X}$ (มิลลิกรัมทรีฮาโลสต่อกรัมเซลล์)	151.211	146.270	39.430	135.756	104.964	212.732	0	96.314	162.291
C_{Tre} ³ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	438.00	341.80	55.20	423.60	31.00	595.00	0	353.11	306.00

หมายเหตุ ¹ การคำนวณค่าพารามิเตอร์ของแต่ละการทดลองได้มาจากการใช้สมการดังแสดงในภาคผนวกที่ ข โดยคำนวณ ณ เวลาที่มีความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงสุด

² ได้มาจากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln$ น้ำหนักเซลล์แห้งกับเวลา (แสดงในภาคผนวกที่ ข และภาพผนวกที่ ข1 - 9)

³ ค่าความเข้มข้นของทรีฮาโลสสูงสุดของแต่ละการทดลอง โดยที่ การทดลองที่ 1 คำนวณ ณ ชั่วโมงที่ 144 การทดลองที่ 2 คำนวณ ณ ชั่วโมงที่ 120 การทดลองที่ 3 คำนวณ ณ ชั่วโมงที่ 72 การทดลองที่ 4 คำนวณ ณ ชั่วโมงที่ 96 การทดลองที่ 5 คำนวณ ณ ชั่วโมงที่ 24 การทดลองที่ 6 คำนวณ ณ ชั่วโมงที่ 168 การทดลองที่ 7 คำนวณ ณ ชั่วโมงที่ 72 การทดลองที่ 8 คำนวณ ณ ชั่วโมงที่ 120 และการทดลองที่ 9 คำนวณ ณ ชั่วโมงที่ 72

1.2 ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตทริฮาโลส

การวัดค่าโดยวิธีการทะลุกระจกจะแสดงอยู่ในรูปของอัตราส่วนสัญญาณต่อสิ่งรบกวน (Signal/Noise ratio; S/N ratio) โดยถูกนำมาใช้ในการวัดอิทธิพลของ Noise factor (ตัวแปรที่ไม่สามารถควบคุมได้ในกระบวนการ) ที่มีผลต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ หรือกระบวนการ โดยอาศัยการวัดลักษณะเชิงคุณภาพ (Quality characteristic, QC) ซึ่งสามารถแสดงถึงความต้องการการเปลี่ยนแปลงของผลการทดลองที่ต้องการต่างกันออกไป ประกอบด้วย 3 รูปแบบ คือ กรณีน้อยกว่าดีกว่า (Smaller is better) กรณีมากกว่าดีกว่า (Bigger is better, $QC = B$) และกรณีเป้าหมายดีที่สุด (Nominal is best) ในการทดลองนี้การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทริฮาโลสจะพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของทริฮาโลส (C_{Tre}) ดังนั้น กรณีนี้จึงจัดอยู่ในรูปแบบกรณีมากกว่าดีกว่า เนื่องจากต้องการให้ได้สภาวะที่มีการผลิตทริฮาโลสสูงสุด นอกจากนี้ การวัดค่าโดยวิธีการทะลุกระจกยังสามารถแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง ดังนั้นในการวิเคราะห์ผลจะทำการพิจารณาทั้งค่าอัตราส่วน S/N และค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง

1.2.1 ผลของปัจจัยเมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N

นำค่าความเข้มข้นทริฮาโลสที่ได้จากการทดลองทั้ง 9 การทดลองมาคำนวณหาอัตราส่วน S/N ดังแสดงในตารางที่ 6 จากนั้นนำค่าอัตราส่วน S/N ที่ได้มาใช้ในการคำนวณหา ค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของปัจจัยต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัย และหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสม จากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นอิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตทริฮาโลสให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดเมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N โดยพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตทริฮาโลสสูงที่สุด ซึ่งให้ค่าร้อยละอิทธิพลหลักเท่ากับ 32.31 นอกจากนี้ยังจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นแลกโทส พีเอชเริ่มต้น และอัตราการเขย่า ต่างก็มีอิทธิพลต่อการผลิตทริฮาโลสให้ได้สูงสุดใกล้เคียงกัน โดยให้ค่าร้อยละอิทธิพลหลักเท่ากับ 23.03, 22.53 และ 22.13 ตามลำดับ

ในการพิจารณาระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยจะพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน S/N ที่เกิดจากปัจจัยต่าง ๆ ที่ระดับของปัจจัยเดียวกัน ซึ่งในการทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อให้ได้ความเข้มข้นทริฮาโลสสูงที่สุด ดังนั้นระดับของปัจจัยที่มีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน S/N สูงที่สุดถือว่าเป็นระดับของปัจจัยที่มีความเหมาะสม จากภาพที่ 13 แสดงให้เห็นว่าที่ระดับใดของปัจจัยต่าง ๆ ที่ให้ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน S/N สูงที่สุด โดยที่ระดับนั้น ๆ ของปัจจัยจะถูกเลือกมาประกอบกันเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทริฮาโลสเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสูงที่สุด

จากภาพสามารถอธิบายความได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตทรีฮาโลสเมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N คือ สภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร (ปัจจัย A ระดับที่ 1) พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 (ปัจจัย B ระดับที่ 3) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ปัจจัย C ระดับที่ 1) และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที (ปัจจัย D ระดับที่ 3) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส (ปัจจัย C ระดับที่ 1) เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลสสูงที่สุด ในขณะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ปัจจัย C ระดับที่ 3) เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลสต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งสรุปสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสแสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 6 ค่าอัตราส่วน S/N ของความเข้มข้นทรีฮาโลสจากการทดลองทั้ง 9 การทดลอง

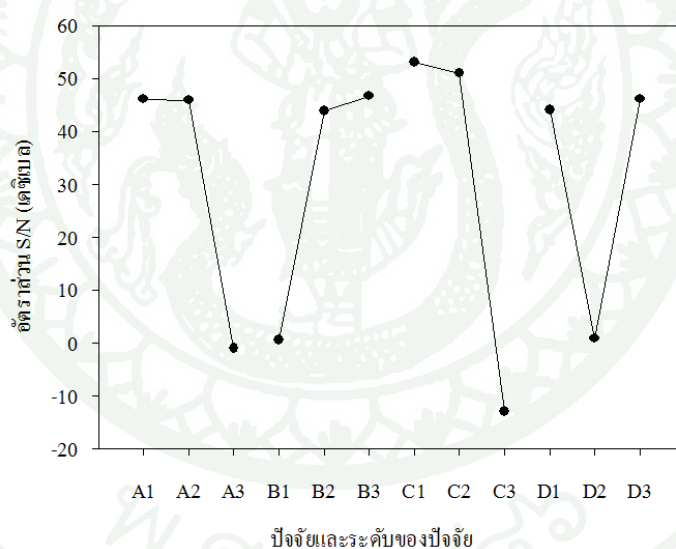
การทดลอง	ความเข้มข้นทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	อัตราส่วน S/N (เดซิเบล)
1	343.80	441.20	52.83
2	346.80	336.80	50.67
3	55.20	55.20	34.84
4	420.00	427.20	52.54
5	34.00	28.00	29.71
6	607.00	582.80	55.48
7	0	0	-103.81
8	359.00	347.21	50.95
9	316.00	296.00	49.70

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ห้ัทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นทรีฮาโลสจากค่าอัตราส่วน S/N

ปัจจัย	ระดับ			ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก ¹	ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก ²
	1	2	3		
แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	46.11	45.91	-1.05	47.16	23.03
พีเอชเริ่มต้น	0.52	43.78	46.67	46.15	22.53
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	53.09	50.97	-13.09	66.18	32.31
อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)	44.08	0.78	46.11	45.33	22.13

หมายเหตุ ¹ ผลต่างระหว่างค่าสูงสุดกับค่าต่ำสุด

² การคำนวณแสดงในภาคผนวก ข



ภาพที่ 13 ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นทรีฮาโลส (C_{Tre}) เมื่อ

พิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N โดยที่ A คือ ความเข้มข้นแลกโทส ตัวเลข 1, 2 และ 3 คือ ความเข้มข้นแลกโทสที่ 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ B คือ พีเอชเริ่มต้น ตัวเลข 1, 2 และ 3 คือ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ C คือ อุณหภูมิ ตัวเลข 1, 2 และ 3 คือ อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ D คือ อัตราการเขย่า ตัวเลข 1, 2 และ 3 คือ อัตราการเขย่าที่ 0, 100 และ 150 รอบต่อนาที ตามลำดับ

ตารางที่ 8 ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นทรีฮาโลส (C_{Tre}) เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N

ปัจจัย	ระดับที่เหมาะสม
ความเข้มข้นแลกโทส (กรัมต่อลิตร)	10
พีเอชเริ่มต้น	7
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30
อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)	150

1.2.2 ผลของปัจจัยเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง

นำค่าความเข้มข้นทรีฮาโลสที่ได้จากการทดลองทั้ง 9 การทดลองมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของปัจจัยต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัย และหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสม จากตารางที่ 9 แสดงให้เห็นอิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตทรีฮาโลสให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง โดยพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลสสูงที่สุด ซึ่งให้ค่าร้อยละอิทธิพลหลักเท่ากับ 62.42 ปัจจัยที่มีอิทธิพลรองลงมา คือ ความเข้มข้นแลกโทส พีเอชเริ่มต้น และอัตราการเขย่า ตามลำดับ โดยให้ค่าร้อยละอิทธิพลหลักเท่ากับ 18.75, 11.06 และ 7.77 ตามลำดับ

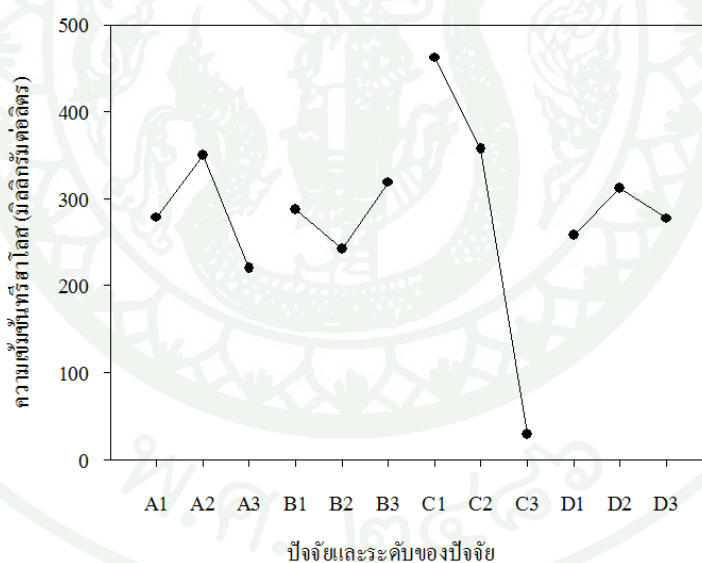
ในการพิจารณาระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยจะพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลองที่เกิดจากปัจจัยต่าง ๆ ที่ระดับของปัจจัยเดียวกัน ซึ่งจะดูจากระดับของปัจจัยที่มีค่าเฉลี่ยของผลการทดลองสูงที่สุด จากภาพที่ 14 แสดงให้เห็นว่าที่ระดับใดของปัจจัยต่าง ๆ ที่ให้ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองสูงที่สุด โดยที่ระดับนั้น ๆ ของปัจจัยจะถูกเลือกมาประกอบกันเป็นสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสูงสุด จากภาพสามารถอธิบายความได้ว่าสถานะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตทรีฮาโลส คือ สถานะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร (ปัจจัย A ระดับที่ 1) พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 (ปัจจัย B ระดับที่ 3) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ปัจจัย C ระดับที่ 1) และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที (ปัจจัย D ระดับที่ 2) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส (ปัจจัย C ระดับที่ 1) เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลสสูงที่สุด ในขณะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ปัจจัย C ระดับที่ 3) เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลสต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งสรุปสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสแสดงไว้ในตารางที่ 10

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นทริฮาโลสจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง

ปัจจัย	ระดับ			ค่าร้อยละ	
	1	2	3	ค่าอิทธิพลหลัก ¹	อิทธิพลหลัก ²
แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	278.33	349.87	219.70	130.17	18.75
พีเอชเริ่มต้น	287.20	241.97	318.73	76.76	11.06
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	462.04	357.13	28.73	433.31	62.42
อัตราการเขย่า					
(รอบต่อนาที)	258.33	312.27	277.30	53.94	7.77

หมายเหตุ ¹ ผลต่างระหว่างค่าสูงสุดกับค่าต่ำสุด

² การคำนวณแสดงในภาคผนวก ข



ภาพที่ 14 ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นทริฮาโลส (C_{Tre}) เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง โดยที่ A คือ ความเข้มข้นแลกโทส ตัวเลข 1, 2 และ 3 คือ ความเข้มข้นแลกโทสที่ 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ B คือ พีเอชเริ่มต้น ตัวเลข 1, 2 และ 3 คือ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ C คือ อุณหภูมิ ตัวเลข 1, 2 และ 3 คือ อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ D คือ อัตราการเขย่า ตัวเลข 1, 2 และ 3 คือ อัตราการเขย่าที่ 0, 100 และ 150 รอบต่อนาที ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นทรีฮาโลส (C_{Tre}) เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง

ปัจจัย	ระดับที่เหมาะสม
ความเข้มข้นแลกโทส (กรัมต่อลิตร)	20
พีเอชเริ่มต้น	7
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30
อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)	100

เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลสให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดเมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N และค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าลำดับของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลสจากสูงสุดไปจนถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่ำสุดเมื่อพิจารณาจากค่าทั้งสองต่างก็แสดงลำดับของปัจจัยเช่นเดียวกัน คือ อุณหภูมิ ความเข้มข้นแลกโทส พีเอชเริ่มต้น และอัตราการเขย่า ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าทั้งสองกรณีให้ผลที่สอดคล้องกัน แต่เมื่อพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากทั้งสองกรณี พบว่ามีความแตกต่างกันของระดับความเข้มข้นแลกโทสและอัตราการเขย่า โดยเมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N จะให้สภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ในขณะที่เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจะให้สภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที

1.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA

1.3.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N แสดงผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 11 พบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุดต่อการผลิตทรีฮาโลสเพื่อให้มีความเข้มข้นสูงสุด คือ อุณหภูมิ โดยมีค่าร้อยละอิทธิพลเท่ากับ 40.69 ปัจจัยที่มีอิทธิพลรองลงมา คือ ความเข้มข้นแลกโทส พีเอชเริ่มต้น และอัตราการเขย่า ตามลำดับ โดยให้ค่าร้อยละอิทธิพลเท่ากับ 21.24, 19.22 และ 18.85 ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่แสดงก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าองศาอิสระของแต่ละปัจจัยมีค่าเท่ากับ 2 และค่าองศาอิสระรวมมีค่าเท่ากับ 8 ทำให้ค่าองศาอิสระของความคลาดเคลื่อน

(DOF_{Error}) มีค่าเท่ากับศูนย์ จึงทำให้ไม่สามารถประมาณค่า F_{ratio} ได้ วิธีการแก้ไขสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการรวบปัจจัย (Pooling) ซึ่งจะทำให้การรวบปัจจัยที่มีค่า Sum of squares น้อยที่สุด โดยรวบปัจจัยที่มีค่า Sum of squares น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ของปัจจัยที่มีค่า Sum of squares มากที่สุด จนกระทั่งค่าองศาอิสระของความคลาดเคลื่อนเข้าใกล้ครึ่งหนึ่งของค่าองศาอิสระรวม อีกหนึ่งวิธีคือ ใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่พิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง (กชกร, 2554)

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)¹ ของความเข้มข้นทรีฮาโลสเมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N

Factor	DOF	SS	V	F	S'	Percent P
Lactose	2	4429.90	2214.95	-	4429.90	21.24
Initial pH	2	4010.01	2005.00	-	4010.01	19.22
Temperature	2	8487.57	4243.79	-	8487.57	40.69
Agitation rate	2	3933.24	1966.62	-	3933.24	18.85
Other error	0					
Total	8	20860.72				100.00

หมายเหตุ ¹ แสดงวิธีคำนวณในภาคผนวกที่ ข

1.3.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง แสดงผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 12 พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุดต่อการผลิตทรีฮาโลสเพื่อให้มีความเข้มข้นสูงสุด คือ อุณหภูมิ โดยมีค่าร้อยละอิทธิพลเท่ากับ 88.32 ปัจจัยที่มีอิทธิพลรองลงมา คือ ความเข้มข้นแลกโทส ฟือเออร์มันตัน และอัตราการเขย่า ตามลำดับ โดยให้ค่าร้อยละอิทธิพลเท่ากับ 7.27, 2.44 และ 1.26 ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่แสดงก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 9) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าทุกปัจจัยต่างมีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลสเพื่อให้มีความเข้มข้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยความเข้มข้น

แลกโทส พีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิ มีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลสเพื่อให้ความเข้มข้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.001$ ส่วนอัตราการใช้มีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลสเพื่อให้ความเข้มข้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)¹ ของความเข้มข้นทรีฮาโลสเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง

Factor	DOF	SS	ν	F	S'	Percent P
Lactose	2	50998.58	25499.29	89.18 ²	50426.74	7.27
Initial pH	2	17513.89	8756.94	30.63 ²	16942.05	2.44
Temperature	2	613211.90	306605.95	1072.34 ²	612640.06	88.32
Agitation rate	2	9326.47	4663.23	16.31 ³	8754.62	1.26
Other error	9	2573.29	285.92			0.70
Total	17	693624.13				100.00

หมายเหตุ ¹ แสดงวิธีคำนวณในภาคผนวก ข

² มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.001$

³ มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$

1.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในขวดรูปชมพู่

การประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลส สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมได้จากระดับของปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลสูงสุดของปัจจัยนั้น ๆ จากนั้นจึงจะสามารถประเมินค่าคาดหวังต่าง ๆ ได้ ในการทดลองนี้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดเมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N แสดงดังภาพที่ 13 และตารางที่ 8 และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง แสดงดัง

ภาพที่ 14 และตารางที่ 10 ซึ่งให้สภาวะที่เหมาะสมแตกต่างกัน เมื่อนำทั้งค่าอัตราส่วน S/N และค่าเฉลี่ยของผลการทดลองมาทำการประเมินค่าคาดหวังที่สภาวะที่เหมาะสมเมื่อพิจารณาจากค่าทั้งสอง โดยอาศัยสมการดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่าเมื่อประเมินค่าคาดหวังจากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N โดยใช้ค่าอัตราส่วน S/N ในการประเมิน จะได้ค่าความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงสุดเท่ากับ 101.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อประเมินค่าคาดหวังจากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N โดยใช้ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองในการประเมิน จะได้ค่าความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงสุดเท่ากับ 448.50 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อประเมินค่าคาดหวังจากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง โดยใช้ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองในการประเมิน จะได้ค่าความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงสุดเท่ากับ 595 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อประเมินค่าคาดหวังจากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลองโดยใช้ค่าอัตราส่วน S/N ในการประเมินจะได้ค่าความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงสุดเท่ากับ

ตารางที่ 13 สภาวะที่เหมาะสม และค่าคาดหวังของความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงสุดที่ประเมินได้

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม				ค่า คาดหวัง
	A	B	C	D	
พิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N					
ความเข้มข้นทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
$Y_{opt} = \overline{T1} + (\overline{A1} - \overline{T1}) + (\overline{B3} - \overline{T1}) + (\overline{C1} - \overline{T1}) + (\overline{D3} - \overline{T1})$	10	7	30	150	101.02
ความเข้มข้นทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
$Y_{opt} = \overline{T2} + (\overline{A2} - \overline{T2}) + (\overline{B3} - \overline{T2}) + (\overline{C1} - \overline{T2}) + (\overline{D2} - \overline{T2})$	20	7	30	100	448.50
พิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง					
ความเข้มข้นทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
$Y_{opt} = \overline{T2} + (\overline{A2} - \overline{T2}) + (\overline{B3} - \overline{T2}) + (\overline{C1} - \overline{T2}) + (\overline{D2} - \overline{T2})$	20	7	30	100	595
ความเข้มข้นทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
$Y_{opt} = \overline{T1} + (\overline{A1} - \overline{T1}) + (\overline{B3} - \overline{T1}) + (\overline{C1} - \overline{T1}) + (\overline{D3} - \overline{T1})$	10	7	30	150	55.48

หมายเหตุ Y_{opt} , $\overline{T1}$ และ $\overline{T2}$ คือ ค่าคาดหวังของความเข้มข้นทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร) ผลรวมทั้งหมดของค่าอัตราส่วน S/N เฉลี่ยที่ได้จากทุกการทดลอง (เดซิเบล) และผลรวมทั้งหมดของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นทรีฮาโลสที่ได้จากทุกการทดลอง ตามลำดับ

55.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าคาดหวังที่ได้จากทุก ๆ กรณีต่างก็ให้ค่าความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงสุดต่ำกว่าความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงสุดที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ ยกเว้นกรณีที่ประเมินค่าคาดหวังจากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง โดยใช้ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองในการประเมิน โดยให้ค่าความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงสุดเท่ากับ 595 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ได้จากการทดลองที่ทำก่อนหน้านี้ ดังนั้นจึงถือว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลองเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสให้ได้ความเข้มข้นสูงสุด

1.5 การยืนยันสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในขวดรูปชมพู่

เมื่อวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสด้วยวิธีการทะกุกิ โดยทำการหาระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ตรงกับสภาวะหนึ่งในเก้าสภาวะที่ออกแบบโดยวิธีทะกุกิ (การทดลองที่ 6)

จากภาพที่ 9 เป็นการทดสอบความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสในอาหาร complete medium โดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 โดยทำการศึกษาโดยใช้แล็กโทสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมมากที่สุด เพื่อใช้ในการผลิตทรีฮาโลส (Cardoso *et al.*, 2004) เมื่อทำการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลส พบว่าความเข้มข้นของแล็กโทสที่มีความเหมาะสม คือ มีค่าเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cardoso *et al.* (2004) ที่พบว่าปริมาณทรีฮาโลสที่สะสมภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *P.*

freudenreichii จะมีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารมีค่าลดลงจาก 30 กรัมต่อลิตร เหลือ 20 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารมีค่าเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร จะส่งผลทำให้ปริมาณทรีฮาโลสที่ได้มีค่าลดลง เนื่องจากเมื่อแหล่งคาร์บอนถูกใช้หมดไป จุลินทรีย์จะใช้ทรีฮาโลสที่สะสมไว้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน (Cho *et al.*, 2006) สภาวะที่มีความเข้มข้นของแล็กโทส 20 กรัมต่อลิตร จึงมีความเหมาะสมมากที่สุด เพื่อป้องกันการที่ทรีฮาโลสจะถูกนำมาใช้ในสภาวะที่แหล่งคาร์บอนที่มีอยู่หมดไป รวมทั้งลดความเสี่ยงจากการมีอยู่ของแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป

เมื่อพิจารณาถึงค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารและอุณหภูมิในการหมัก พบว่าสถานะของปัจจัยทั้งสองที่เป็นค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสนั้น ต่างเป็นสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium* sp. ซึ่งสอดคล้องกับ พรพรรณ (2519) ที่พบว่าเชื้อ *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* จะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิห้อง (28 - 30 องศาเซลเซียส) ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 ซึ่งขัดแย้งกับ Hugenholtz *et al.* (2002) ที่กล่าวว่าการสะสมทรีฮาโลสภายในเซลล์เกิดขึ้นภายใต้สภาวะเครียดหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิต่ำ ความเข้มข้นของเกลือสูง และสถานะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญอื่น ๆ อาจเนื่องมาจากช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเชื้อจะต้องให้เชื้อเพิ่มจำนวนขึ้นมาก่อน โดยเมื่อเชื้อมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ก็ส่งผลทำให้มีการผลิตกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ขึ้นมามากเช่นกัน ซึ่งสภาวะที่อาหารมีความเป็นกรดสูงขึ้นนี้ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื่อดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cardoso *et al.* (2004) ที่พบว่าผลได้ของชีวมวลของเชื้อ *P. freudenreichii* จะมีค่าลดลง 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าพีเอช 4.7 เมื่อเปรียบเทียบกับเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอช 5.5 นอกจากนี้ยังมีผลทำให้สามารถผลิตทรีฮาโลสได้ปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2 เท่า ซึ่งเมื่อพิจารณาภาพที่ 9 จะเห็นได้ว่าทรีฮาโลสมีการผลิตสูงสุดอยู่ในช่วงปลายของระยะการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเชียล ช่วงดังกล่าวค่าพีเอชของอาหารมีค่าประมาณ 4.0 ซึ่งอยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะที่มีการเติบโตเข้าสู่สภาพคงที่ (Stationary phase) ทรีฮาโลสมีปริมาณลดลง อาจเนื่องมาจากช่วงเวลาดังกล่าวแล็กโทสมีปริมาณลดลงอย่างมาก ประกอบกับเชื้อสามารถใช้ทรีฮาโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ง่ายกว่า จึงหันมาใช้ทรีฮาโลสแทนการใช้แล็กโทส ทำให้การตรวจหาปริมาณทรีฮาโลสที่สะสมอยู่ภายในเซลล์พบจำนวนน้อยลงไปด้วย

เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเขย่า เป็นที่ทราบว่า การเขย่าช่วยให้เกิดการผสมกันของสารอาหารกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังมีผลทำให้เชื้อได้รับอากาศเพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศ (Facultative anaerobic bacteria) ดังนั้นการใช้อัตราการเขย่าในระดับต่ำ (100 รอบต่อนาที) เชื้อจะสามารถใช้อาหารได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีการเขย่า และสามารถเจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่ใช้อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที จึงส่งผลทำให้มีการผลิตทรีฮาโลสได้ปริมาณที่สูงกว่า

2. การศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสของ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ในการทดลองส่วนนี้จะเป็นการศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 จากผลของการปรับพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสที่ได้จากการทดลองในระดับขวดรูปชมพู่ส่วนหนึ่งจะถูกนำมาใช้เป็นสภาวะในการเพาะเลี้ยง ซึ่งสามารถแสดงผลการทดลองได้ดังนี้

2.1 ผลของการปรับพีเอชต่อการเจริญเติบโต การผลิตทรีฮาโลส และการผลิตกรดของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273

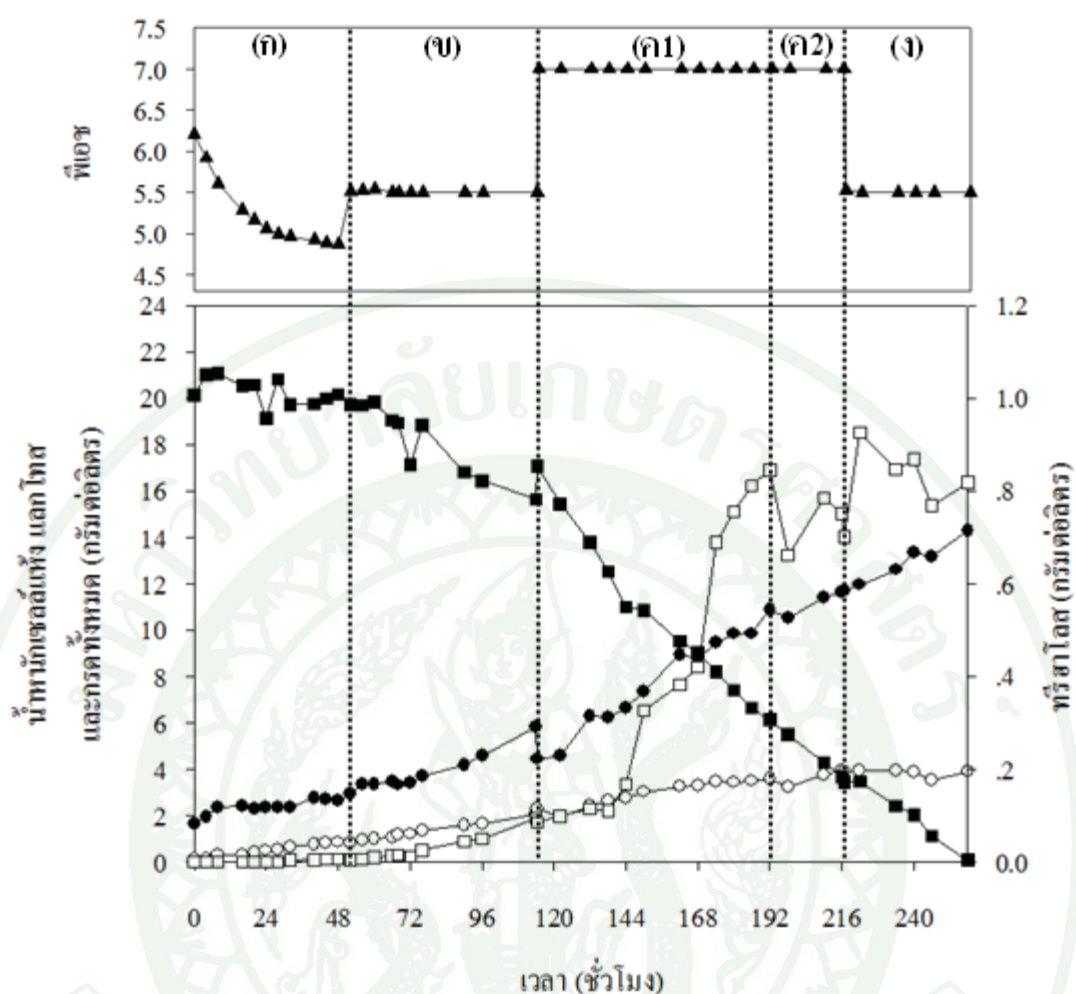
ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 โดยใช้อาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ตามสภาวะที่อาหารมีความเข้มข้นแล็กโทส 20 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนที่ 80 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ การเพาะเลี้ยงในช่วงแรกจะไม่มี การควบคุมค่าพีเอชจนกระทั่งค่าพีเอชของอาหารเริ่มมีค่าคงที่จึงทำการปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง โดยการปรับค่าพีเอชของน้ำหมักเป็น 5.5 และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อตามสภาวะดังกล่าวจนกระทั่งเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 114 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มให้กลับมามีปริมาตร 1,800 มิลลิลิตร แล้วปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง โดยการปรับค่าพีเอชของน้ำหมักให้มีค่าเท่ากับ 7 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อตามสภาวะดังกล่าวจนกระทั่งเชื้อมีการใช้แล็กโทสจนใกล้จะหมด (แล็กโทสมีความเข้มข้นเหลือประมาณ 5 กรัมต่อลิตร) จึงปรับค่าพีเอชของน้ำหมักให้มีค่าเท่ากับ 5.5 อีกครั้ง โดยสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นทรีฮาโลส ความเข้มข้นแล็กโทส น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักดังภาพที่ 15

จากภาพที่ 15 จะเห็นได้ว่าช่วงการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ภาพที่ 15(ก)) เชื้อมีการเจริญขึ้นอย่างช้า ๆ พร้อมกับค่อย ๆ มีการใช้แล็กโทสเพียงเล็กน้อย เมื่อพิจารณาการสะสมทรีฮาโลส พบว่าในช่วงแรกเชื้อยังไม่มี การสะสมทรีฮาโลส แต่เริ่มมีการสะสมทรีฮาโลสในชั่วโมงที่ 32 นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าเชื้อมีการผลิตกรดตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย การเพาะเลี้ยงในช่วงนี้สิ้นสุดลงเมื่อค่าพีเอชเริ่มมีค่าคงที่ โดยมีค่าประมาณ 4.9 เมื่อปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงโดยการควบคุมค่าพีเอชของน้ำหมักให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 (ภาพที่ 15(ข)) พบว่าเชื้อยังคงมีการเจริญขึ้นอย่างช้า ๆ ต่อเนื่องจากช่วงแรก แต่มีการใช้แล็กโทสเพิ่มสูงขึ้น และจะเห็นได้ว่าเชื้อมีการสะสมทรีฮาโลสเพิ่มสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากเชื้อตกอยู่

ในสถานะเครียดจากการถูกเปลี่ยนสถานะการเจริญอย่างรวดเร็ว ประกอบกับตกอยู่ในสถานะการเพาะเลี้ยงที่เป็นกรด เชื้อจึงสร้างทรีฮาโลสขึ้นมาเพื่อให้สามารถทนต่อสถานะเครียดนั้นได้ (Hugenholtz *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อมีการผลิตกรดเพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย

หลังจากทำการเติมอาหารและปรับสถานะการเพาะเลี้ยง โดยการควบคุมค่าพีเอชของน้ำหมักให้มีค่าคงที่เท่ากับ 7 (ภาพที่ 15(ค1)) พบว่าเชื้อยังมีการเจริญอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 192 หลังจากนั้นเริ่มมีแนวโน้มลดลง การใช้แลคโทสในช่วงการเพาะเลี้ยงนี้พบว่าเชื้อสามารถใช้แลคโทสได้ดีขึ้น จะเห็นได้จากการที่ปริมาณแลคโทสลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อพิจารณาจากการสะสมทรีฮาโลส พบว่าในช่วงแรกการสะสมทรีฮาโลสมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย หลังจากชั่วโมงที่ 138 จนกระทั่งชั่วโมงที่ 192 เชื้อมีการสะสมทรีฮาโลสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว อาจเนื่องมาจากในช่วงดังกล่าวเชื้อมีการผลิตกรดออกมาเพิ่มสูงขึ้นมาก มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับ Yang and Huang (1995) ที่พบว่าถ้ามีความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร whey permeate มีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ลดลง ทำให้เชื้อต้องมีการสะสมทรีฮาโลสเพิ่มขึ้น เพื่อปกป้องตัวเองจากสถานะเครียดดังกล่าว หลังจากชั่วโมงที่ 192 ถึงชั่วโมงที่ 216 (ภาพที่ 15(ค2)) พบว่าเชื้อมีแนวโน้มของการเจริญลดลง โดยเชื้ออยู่ในช่วงปลายของระยะการเจริญแบบเอกซ์โพเนนเชียล นอกจากนี้ยังพบว่าทรีฮาโลสมีปริมาณลดลง อาจเนื่องมาจากปริมาณกรดที่เกิดขึ้นมาก ทำให้เชื้อมีการเจริญที่ลดลง ประกอบกับแลคโทสในอาหารใกล้จะหมด เชื้อจึงใช้ทรีฮาโลสเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน ซึ่งสอดคล้องกับ Cho *et al.* (2006) ที่พบว่าเมื่อแหล่งคาร์บอนถูกใช้หมดไป จุลินทรีย์จะใช้ทรีฮาโลสที่สะสมไว้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน

เมื่อแลคโทสใกล้จะหมดจึงทำการปรับสถานะการเพาะเลี้ยงโดยการควบคุมค่าพีเอชของน้ำหมักให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 (ภาพที่ 15(ง)) พบว่าเชื้ออยู่ในช่วงการเจริญคงที่ แต่ยังมีการใช้แลคโทสอย่างต่อเนื่อง เมื่อพิจารณาถึงการสะสมทรีฮาโลส จะเห็นได้ว่าหลังจากทำการปรับค่าพีเอชลงใน 6 ชั่วโมงแรก เชื้อมีการผลิตทรีฮาโลสเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้ง แต่หลังจากนั้นทรีฮาโลสกลับค่อย ๆ มีปริมาณลดลง อาจเนื่องมาจากการปรับเปลี่ยนสถานะอย่างรวดเร็ว ประกอบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในสถานะที่เป็นกรด ทำให้เชื้ออยู่ตกในสถานะเครียด จึงมีผลกระตุ้นการผลิตทรีฮาโลสขึ้นอีกครั้ง แต่เนื่องจากปริมาณกรดที่มีอยู่มาก และมีแลคโทสเหลืออยู่น้อย ทำให้เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ จึงส่งผลต่อการผลิตทรีฮาโลส ทำให้ไม่สามารถผลิตทรีฮาโลสเพิ่มขึ้นอีกได้ จากการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้จะเห็นได้ว่าเชื้อสามารถผลิตทรีฮาโลสได้สูงที่สุดในช่วงการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีการควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 2 โดยมีปริมาณทรีฮาโลสเท่ากับ 0.925 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 222 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สถานะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนที่ 80 รอบต่อนาที ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีค่าเท่ากับ 7 โดยไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 2 (ค2) และควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 2 (ง) (ความเข้มข้นแลกโทส, ■; ความเข้มข้นทริสาโลส, □; ความเข้มข้นกรดทั้งหมด ได้แก่ กรดพรอพิโอนิก กรดแอซิติก และกรดซักซินิก, ●; น้ำหนักเซลล์แห้ง, ○ และพีเอช, ▲)

2.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เพื่อผลิตทรีฮาโลสจากค่าพารามิเตอร์

จากผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สามารถนำมาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์การเจริญเติบโต การผลิตทรีฮาโลส และกรดทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 14 และสามารถเขียนกราฟเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากอิทธิพลของการปรับพีเอช ดังแสดงในภาพที่ 16 - 23

จากตารางที่ 14 พบว่าอัตราการผลิตเซลล์เชิงปริมาตร (Q_x) ของการเพาะเลี้ยงในช่วงที่ไม่ควบคุมพีเอช ควบคุมพีเอชให้คงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 และควบคุมพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (การเพาะเลี้ยงช่วง ก - ค1) มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 0.015 - 0.020 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณาค่าอัตราการผลิตทรีฮาโลสเชิงปริมาตร และอัตราการผลิตกรดทั้งหมดเชิงปริมาตร พบว่าค่าพารามิเตอร์ทั้งสองมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน โดยเมื่อมีการปรับพีเอชของน้ำหมักค่าพารามิเตอร์ทั้งสองมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมีค่าสูงสุดในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1 (การเพาะเลี้ยงช่วง ค1) โดยมีค่าเท่ากับ 0.0098 กรัมทรีฮาโลสต่อลิตร ต่อชั่วโมง และ 0.083 กรัมกรดทั้งหมดต่อลิตร ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญจำเพาะ และอัตราจำเพาะของการผลิตกรดทั้งหมด พบว่าค่าพารามิเตอร์ทั้งสองมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน โดยเมื่อมีการปรับพีเอชของน้ำหมักค่าพารามิเตอร์ทั้งสองมีแนวโน้มลดลง ซึ่งให้ผลแตกต่างจากค่าอัตราจำเพาะของการผลิตทรีฮาโลส ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการปรับพีเอช โดยมีค่าสูงสุดในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1 (การเพาะเลี้ยงช่วง ค1) มีค่าเท่ากับ 0.0034 กรัมทรีฮาโลสต่อกรัมเซลล์ ต่อชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าช่วงการเพาะเลี้ยงดังกล่าวปริมาณของแลกโทสเริ่มเหลือน้อย และเมื่อรวมกับผลจากการปรับพีเอชของน้ำหมัก จึงมีผลทำให้การเจริญของเชื้อลดลง และส่งผลให้มีการใช้แลกโทสลดลงด้วย โดยการใช้แลกโทสของเชื้อจะถูกใช้เพื่อการผลิตทรีฮาโลสเพิ่มขึ้น และลดการผลิตกรดทั้งหมดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลได้ของทรีฮาโลสต่อแลกโทส และผลได้ของทรีฮาโลสต่อเซลล์ โดยค่าผลได้ของทรีฮาโลสต่อแลกโทส และผลได้ของทรีฮาโลสต่อเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยมีค่าสูงสุดในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1 (การเพาะเลี้ยงช่วง ค1) มีค่าเท่ากับ 0.070 กรัมทรีฮาโลสต่อกรัมแลกโทส และ 0.576 กรัมทรีฮาโลสต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

โดยเมื่อศึกษาแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงของค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ตามเวลาของ แต่ละช่วงการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ไม่ควบคุมพีเอชเชื้อจะมีแนวโน้มการใช้ แลกโทสตามเวลาเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 17(ก) และภาพที่ 21(ก)) แต่จะเห็นได้ว่าการเจริญของเชื้อมี แนวโน้มลดลงตามเวลา (ภาพที่ 16(ก) และภาพที่ 20(ก)) ซึ่งในช่วงการเพาะเลี้ยงนี้การผลิตกรด ทั้งหมดของเชื้อมีแนวโน้มลดลงตามเวลาเช่นกัน (ภาพที่ 19(ก) และภาพที่ 23(ก)) โดยที่การสะสม ทรียาโลสมีแนวโน้มคงที่ตามเวลา (ภาพที่ 18(ก) และภาพที่ 22(ก)) เมื่อทำการควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1 จะเห็นได้ว่าเชื้อมีการเจริญดีขึ้น เห็นได้จากการที่เส้นแนวโน้มตามเวลามีความลาดเอียง น้อยลง (ภาพที่ 16(ข) และภาพที่ 20(ข)) โดยเชื้อมีแนวโน้มการใช้แลกโทสค่อนข้างคงที่ (ภาพที่ 17(ข) และภาพที่ 21(ข)) เพื่อใช้ในการผลิตกรดทั้งหมด (ภาพที่ 19(ข) และภาพที่ 23(ข)) และเริ่ม สะสมทรียาโลส (ภาพที่ 18(ข) และภาพที่ 22(ข)) เมื่อทำการควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1 จะเห็นได้ ว่าเชื้อมีแนวโน้มการเจริญตามเวลาลดลง (ภาพที่ 16(ค) และภาพที่ 20(ค)) และมีแนวโน้มการใช้ แลกโทสตามเวลาลดลงด้วยเช่นกัน ซึ่งเป็นผลมาจากการปรับพีเอชของน้ำหมัก และปริมาณ แลกโทสที่ลดลงตามเวลา นอกจากนี้ยังมีผลมาจากการที่มีการผลิตกรดทั้งหมดปริมาณมาก จึงไปมี ผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ส่งผลให้เชื้อมีการผลิตทรียาโลสตามเวลาสูงขึ้น (ภาพที่ 18(ค) และภาพที่ 22(ค)) และผลิตกรดทั้งหมดลดลง (ภาพที่ 19(ค) และภาพที่ 23(ค))

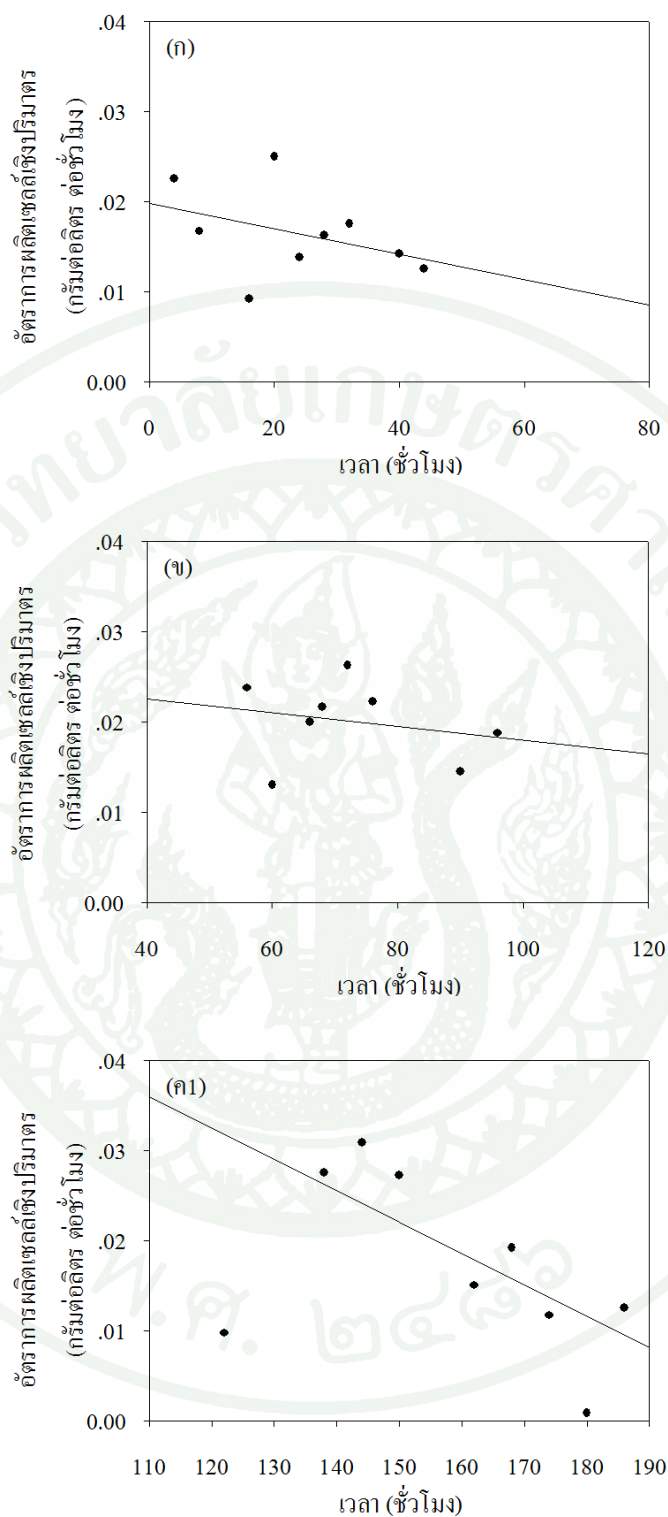
ตารางที่ 14 ค่าพารามิเตอร์การเจริญเติบโต, การผลิตทรีฮาโลส และกรดทั้งหมดของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช

พารามิเตอร์ ¹	ก	ข	ค		ง
			1	2	
C_X^2 (กรัมต่อลิตร)	0.830	2.030	3.570	3.910	3.890
C_{Tre}^3 (กรัมต่อลิตร)	0.005	0.093	0.845	0.784	0.925
Q_X (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	0.015	0.020	0.017	ND	ND
Q_{Tre} (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	0.0001	0.0014	0.0098	ND	0.0028
Q_{Ta} (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	0.025	0.047	0.083	ND	0.063
μ (ต่อชั่วโมง)	0.069	0.020	0.009	ND	ND
q_{Tre} (กรัมแลกโทสต่อกรัมเซลล์ ต่อชั่วโมง)	0.0002	0.0010	0.0034	ND	0.0007
q_{Ta} (กรัมกรดทั้งหมดต่อกรัมเซลล์ ต่อชั่วโมง)	0.052	0.033	0.029	ND	0.016
$Y_{Tre/Lac}$ (กรัมทรีฮาโลสต่อกรัมแลกโทส)	0.028	0.022	0.070	ND	0.035
$Y_{Tre/X}$ (กรัมทรีฮาโลสต่อกรัมเซลล์)	0.007	0.071	0.576	ND	ND

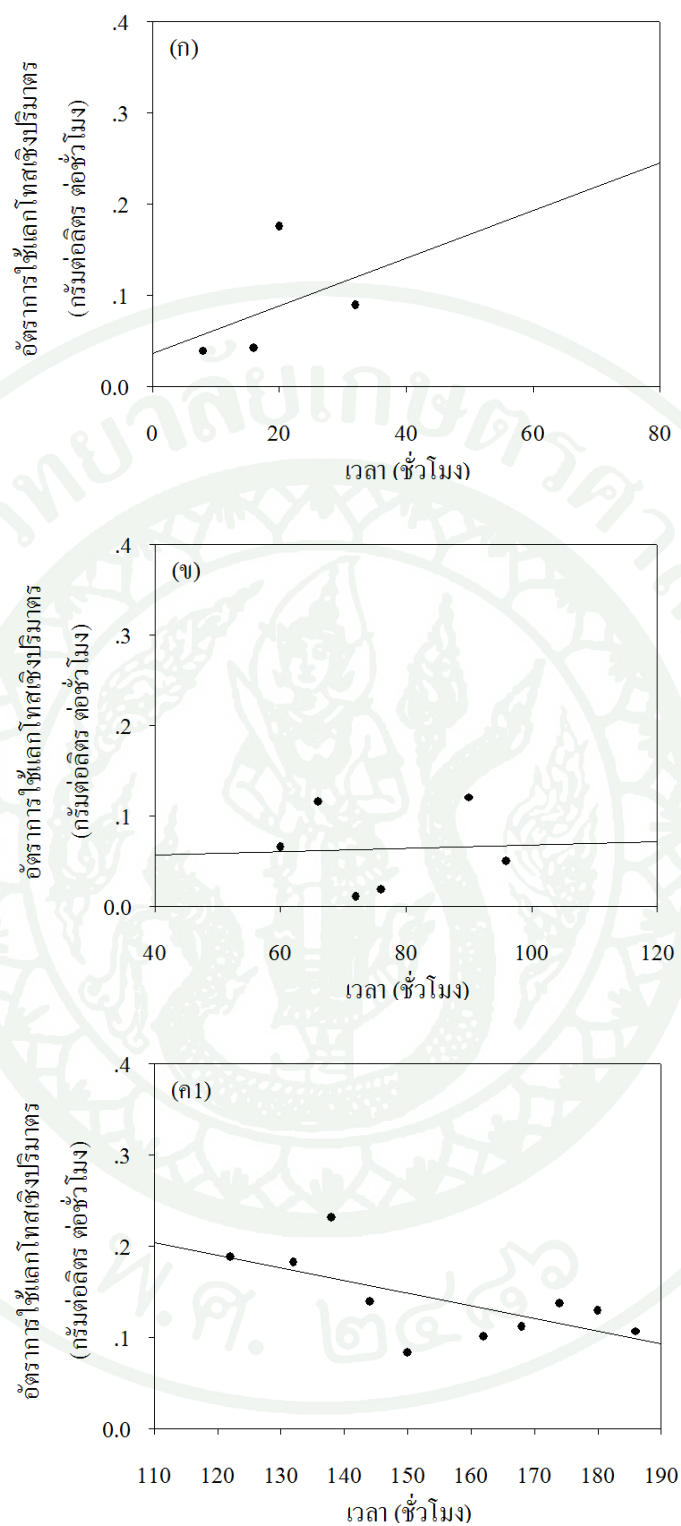
หมายเหตุ ¹ การคำนวณค่าพารามิเตอร์ของแต่ละช่วงการเพาะเลี้ยงมาจากการใช้สมการดังแสดงในภาคผนวกที่ ข

² ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละช่วงการเพาะเลี้ยง

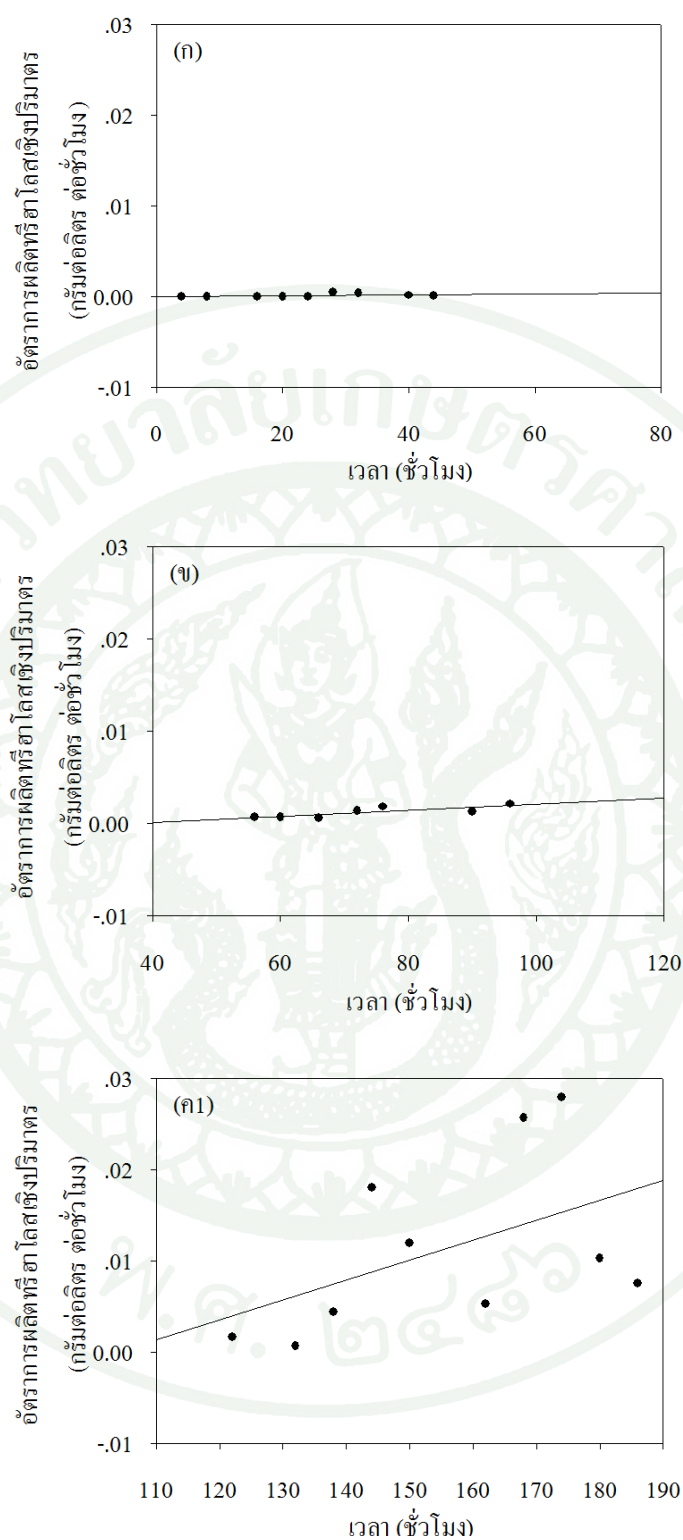
³ ค่าความเข้มข้นสูงสุดของแต่ละช่วงการเพาะเลี้ยง



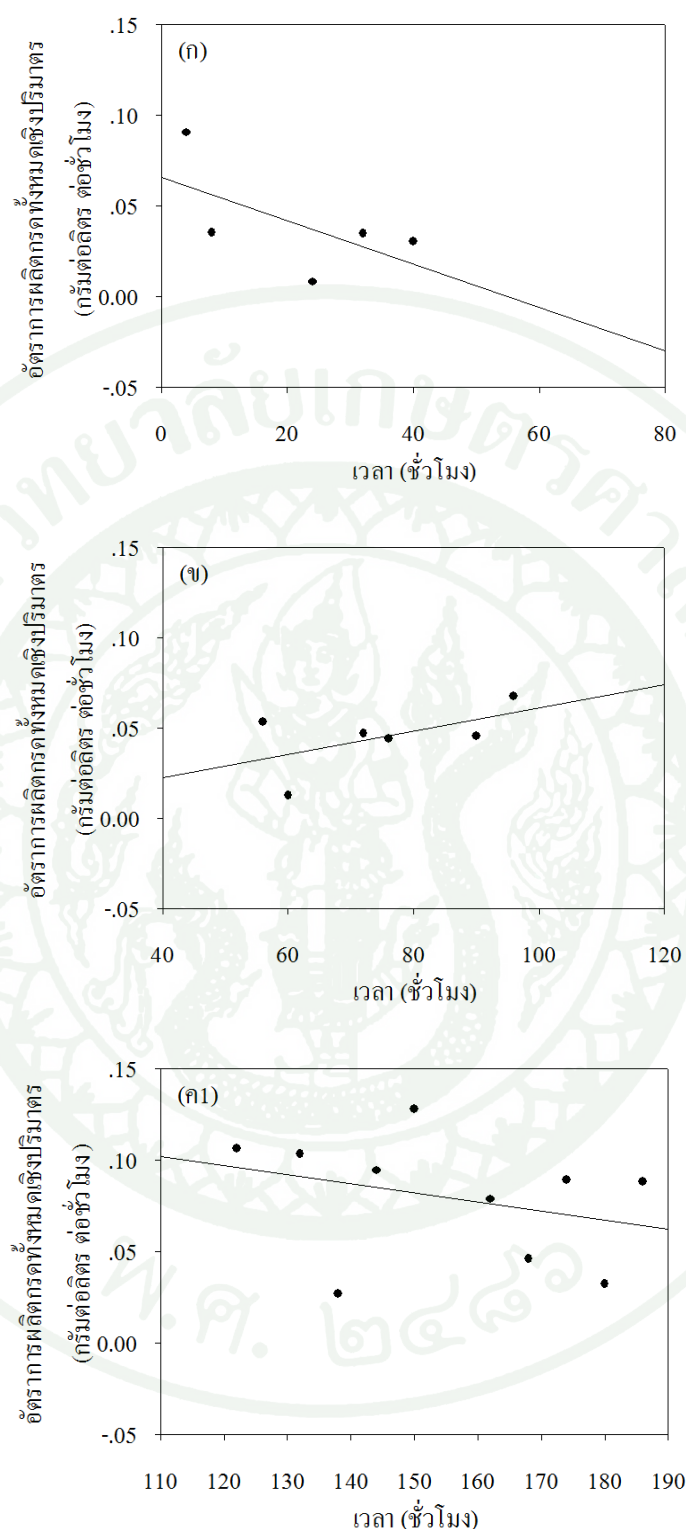
ภาพที่ 16 อัตราการผลิตเซลล์เชิงปริมาตร (Q_X) ของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสถานะที่มีการปรับพีเอช โดยสถานะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) (ค่าที่ใช้ในการหาเส้นแนวโน้มใช้เฉพาะค่าที่เป็นบวก)



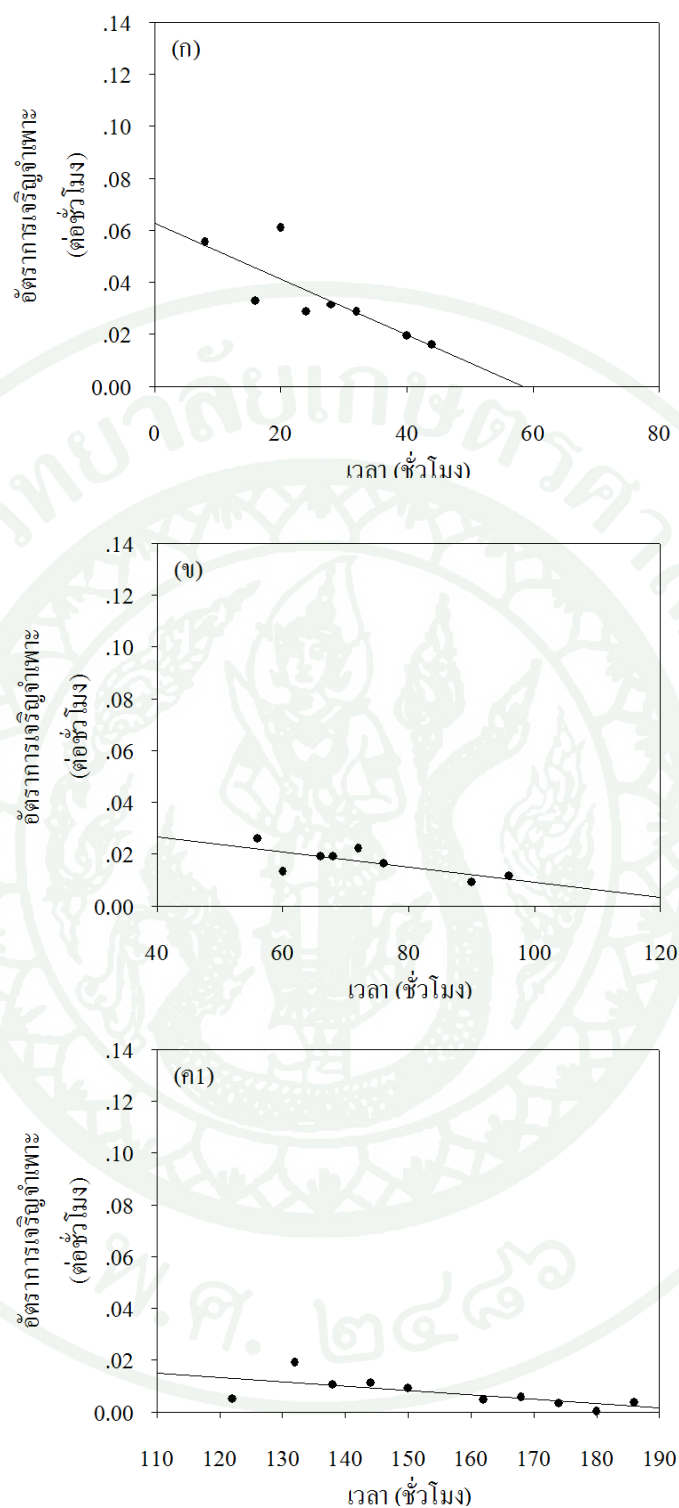
ภาพที่ 17 อัตราการใช้แลกโทสเชิงปริมาตร (Q_{Lac}) ของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) (ค่าที่ใช้ในการหาเส้นแนวโน้มใช้เฉพาะค่าที่เป็นบวก)



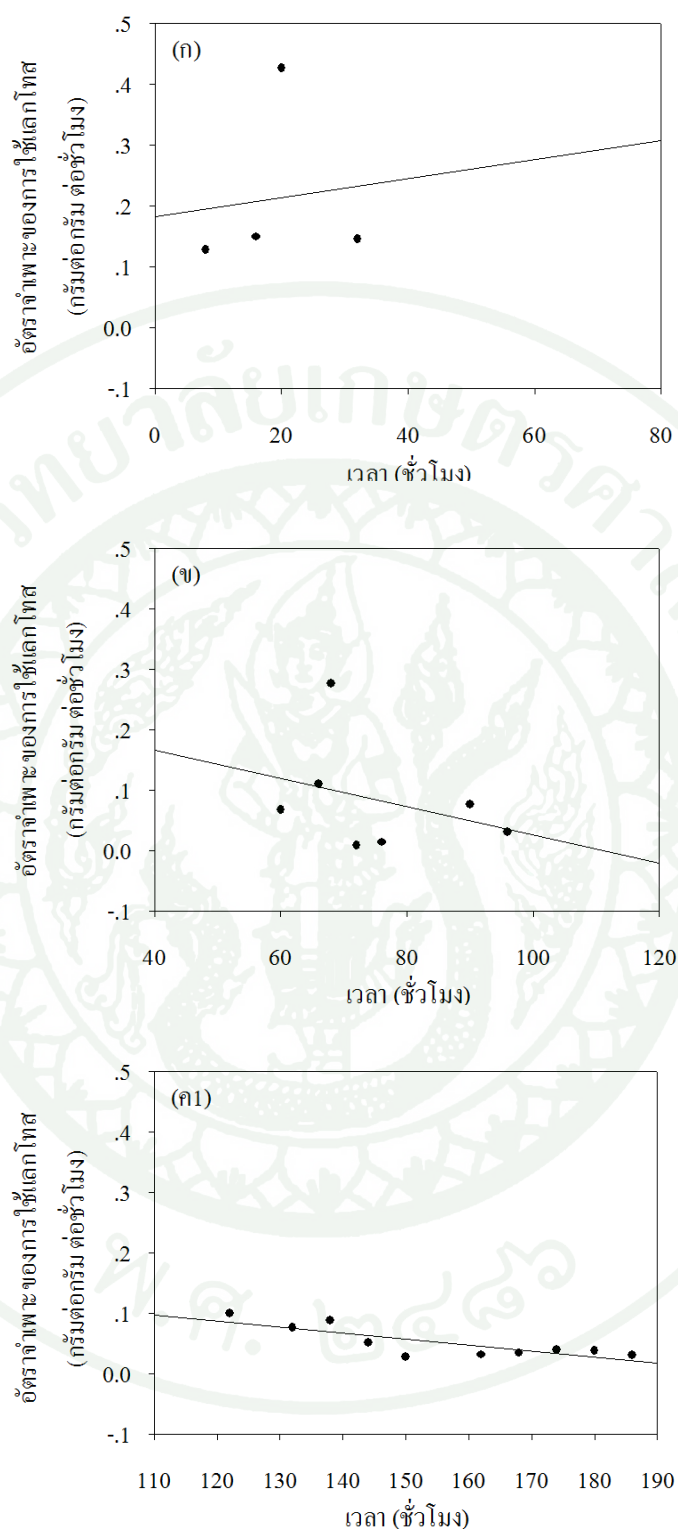
ภาพที่ 18 อัตราการผลิตทรีฮาโลสเชิงปริมาตร (Q_{Tre}) ของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) (ค่าที่ใช้ในการหาเส้นแนวโน้มใช้เฉพาะค่าที่เป็นบวก)



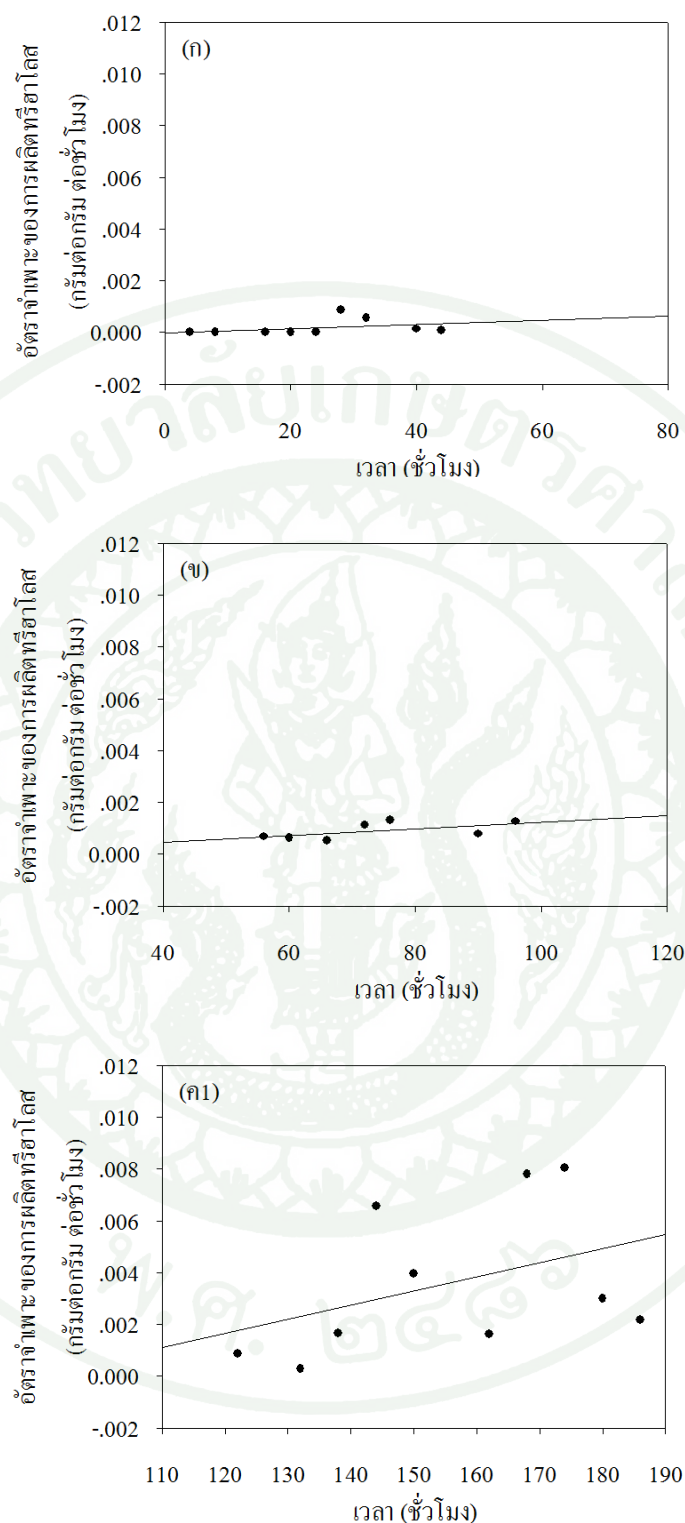
ภาพที่ 19 อัตราการผลิตกรดทั้งหมดเชิงปริมาตร (Q_{Ta}) ของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) (ค่าที่ใช้ในการหาเส้นแนวโน้มใช้เฉพาะค่าที่เป็นบวก)



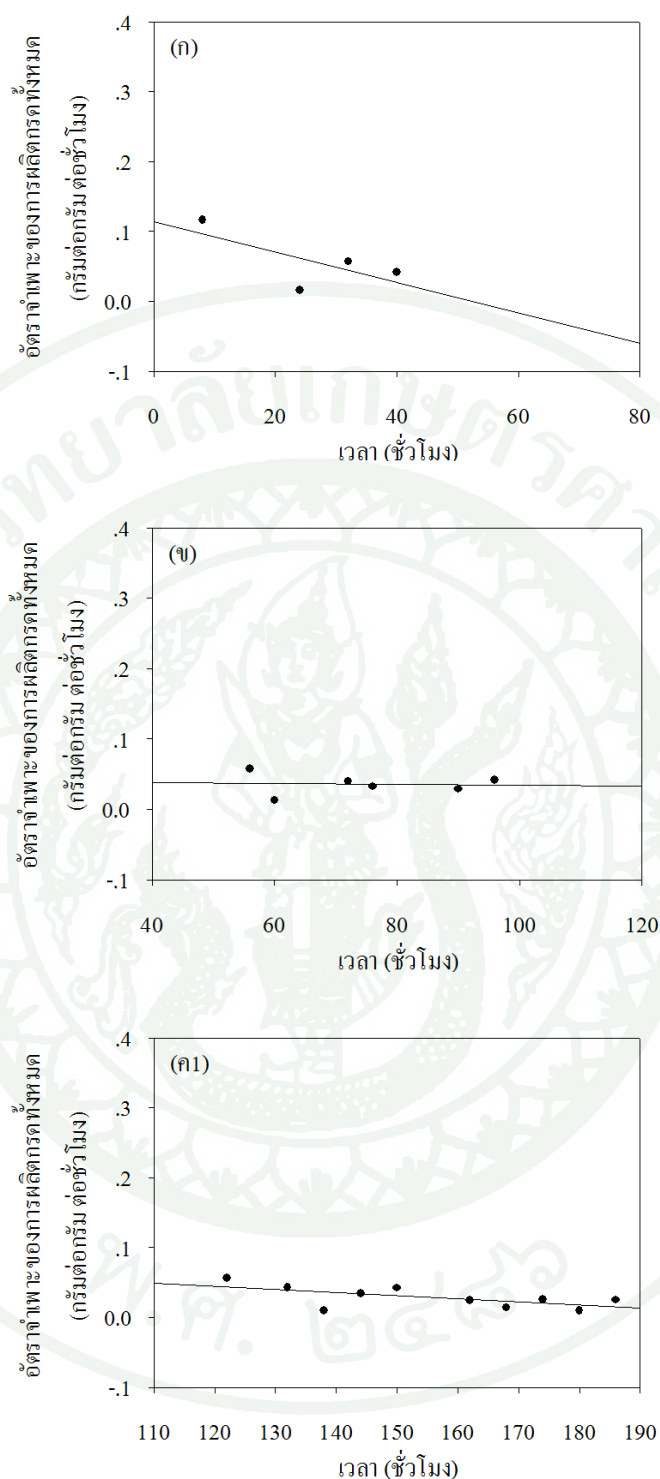
ภาพที่ 20 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีความคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) (ค่าที่ใช้ในการหาเส้นแนวโน้มใช้เฉพาะค่าที่เป็นบวก)



ภาพที่ 21 อัตราจำเพาะของการใช้แลกโทส (q_{Lac}) ของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) (ค่าที่ใช้ในการหาเส้นแนวโน้มใช้เฉพาะค่าที่เป็นบวก)



ภาพที่ 22 อัตราจำเพาะของการผลิตทรีฮาโลส (q_{Tre}) ของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) (ค่าที่ใช้ในการหาเส้นแนวโน้มใช้เฉพาะค่าที่เป็นบวก)



ภาพที่ 23 อัตราจำเพาะของการผลิตกรดทั้งหมด (q_{Ta}) ของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับพีเอช โดยสภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) (ค่าที่ใช้ในการหาเส้นแนวโน้มใช้เฉพาะค่าที่เป็นบวก)

2.3 อัตราส่วนของการใช้คาร์บอน (R_C) จากดุลของคาร์บอนระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในสถานะที่มีการปรับพีเอช

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เพื่อผลิตทรีฮาโลส เมื่อเลี้ยงในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในสถานะที่มีการปรับพีเอช สามารถแสดงสารที่มีความเกี่ยวข้องดังแสดงในตารางที่ 15 โดยในการคำนวณเพื่อหาอัตราส่วนของการใช้คาร์บอน (R_C) ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เพื่อผลิตทรีฮาโลส เนื่องจากทรีฮาโลสเป็น สารที่เชื้อผลิตขึ้นแล้วสะสมไว้ในเซลล์ ดังนั้นจึงต้องคำนวณหาปริมาณคาร์บอนส่วนของเซลล์แยกเป็นสองส่วน คือ ส่วน Residual biomass และส่วนที่เป็นทรีฮาโลส ซึ่งปริมาณ Residual biomass จะมีค่าเท่ากับผลต่างของความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์หักกับความเข้มข้นของทรีฮาโลส

การคำนวณหาอัตราส่วนของการใช้คาร์บอน (R_C) จะคำนวณมาจากอัตราส่วนของผลรวมของผลคูณปริมาณคาร์บอนกับอัตราจำเพาะของสารแต่ละตัวที่ถูกผลิตขึ้นกับผลคูณปริมาณคาร์บอนกับอัตราจำเพาะของการใช้แลกโทส (แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ข)

จากตารางที่ 15 พบว่าอัตราส่วนของการใช้คาร์บอน (R_C) ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพของแต่ละช่วงการเพาะเลี้ยงมีค่าเข้าใกล้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยจะเห็นได้ว่าค่าอัตราส่วนของการใช้คาร์บอนของการเพาะเลี้ยงเชื้อในช่วงที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1 และในช่วงที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 2 มีค่าเท่ากับ 93.65 และ 97.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการที่ผลิตผลหลักของการหมักด้วยแบคทีเรียพรอพิโอนิก คือ กรดพรอพิโอนิก กรดแอซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ (Moat *et al.*, 2002) ซึ่งในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อเพื่อผลิตสารดังกล่าวมีสารตัวกลางที่เกิดขึ้นหลายตัวโดยเฉพาะ ไพรูเวท ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญก่อนที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแอซิติก และกรดพรอพิโอนิก ปริมาณคาร์บอนที่หายไปอาจจะอยู่ในรูปของสารไพรูเวท ซึ่งสอดคล้องกับการหาอัตราส่วนของการใช้คาร์บอนของ Crow (1988) เมื่อเลี้ยงเชื้อพรอพิโอนิกในอาหารเวย์ (Whey medium) โดยได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารไพรูเวทด้วย ซึ่งพบว่าสามารถตรวจพบสารไพรูเวทในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียพรอพิโอนิกบางสายพันธุ์ หรืออาจจะอยู่ในรูปของสารตัวกลางที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดซักซินิก อย่างเช่น มาเลท และฟumarat เป็นต้น

ตารางที่ 15 ปริมาณคาร์บอน อัตราจำเพาะ และอัตราส่วนของการใช้คาร์บอน (R_C) ของสารอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในสภาวะที่มีการปรับพีเอช

	ปริมาณคาร์บอน ¹ (μ กรัมต่อกรัม)	อัตราจำเพาะ ² (กรัมต่อกรัม ต่อชั่วโมง)				
		ก	ข	ค1	ค2	ง
แลกโทส	0.42	0.212	0.084	0.057	ND	0.030
Residual biomass	0.49	0.043	0.014	0.004	ND	ND
ทรีฮาโลส	0.42	0.0002	0.0009	0.0042	ND	ND
กรดพรอพิโอนิก	0.49	0.138	0.031	0.021	ND	0.011
กรดแอซิดิก	0.40	0.012	0.014	0.015	ND	0.009
กรดซักซินิก	0.41	ND	0.003	0.001	ND	0.002
คาร์บอนไดออกไซด์ ³	0.27	0.012	0.014	0.015	ND	0.009
R_C (เปอร์เซ็นต์)		108.73	93.65	102.23	-	97.14

หมายเหตุ ¹ แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ข

² การคำนวณใช้เฉพาะค่าที่เป็นบวก (แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ข)

³ ได้มาจากการคำนวณ (แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ข)

ก : การเพาะเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 48 (ไม่ควบคุมพีเอช)

ข : การเพาะเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 52 ถึง 114 (ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1)

ค1 : การเพาะเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 114.50 ถึง 192 (ควบคุมพีเอชที่ 7 ส่วนที่ 1)

ค2 : การเพาะเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 192 ถึง 216 (ควบคุมพีเอชที่ 7 ส่วนที่ 2)

ง : การเพาะเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 216.45 ถึง 258 (ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 2)

ND : ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสโดย *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ โดยใช้วิธีการทะกัจพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลโดยค่าเฉลี่ย คือ ความเข้มข้นแลคโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที โดยให้ความเข้มข้นทรีฮาโลสสูงสุดเท่ากับ 595 มิลลิกรัมต่อลิตร และยังพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตทรีฮาโลสสูงสุด

2. ศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เมื่อมีการปรับพีเอช

ผลจากการศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เมื่อมีการปรับพีเอช พบว่าการปรับพีเอชน้ำหมักมีผลกระตุ้นการสะสมทรีฮาโลสให้เพิ่มขึ้น โดยการปรับพีเอชที่ช่วยกระตุ้นการสะสมทรีฮาโลสสูงสุด คือ ช่วงการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.5 และปรับพีเอชเป็น 7.0 ซึ่งทำให้ผลได้ของทรีฮาโลสต่อเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 0.071 กรัมทรีฮาโลสต่อกรัมเซลล์ เป็น 0.576 กรัมทรีฮาโลสต่อกรัมเซลล์ และให้อัตราการผลิตทรีฮาโลสสูงขึ้นจาก 0.0014 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง เป็น 0.0098 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่

ถึงแม้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการออกแบบด้วยวิธีการทะกุกิจจะเหมือนกับการทดลองที่อยู่ในแผนการทดลองที่ออกแบบโดยวิธีการทะกุกิจ ก็ควรที่จะต้องทำการทดลองเพื่อยืนยันค่าคาดหวังที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการทะกุกิจ เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการทะกุกิจเมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N และค่าเฉลี่ยที่สภาวะที่แตกต่างกัน

2. ศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เมื่อมีการปรับพีเอช

2.1 ควรทำการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจริงในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อที่จะได้ทราบค่าคาร์บอนไดออกไซด์ที่แน่นอน จะได้นำไปใช้ในการประเมินค่าอัตราส่วนของการใช้คาร์บอนที่แท้จริงของระบบได้

2.2 เนื่องจากผลการทดลองในขวดรูปชมพู่ให้ผลว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตทรีฮาโลสสูงสุด จึงควรทำการศึกษาผลของการปรับอุณหภูมิต่อการผลิตทรีฮาโลส

2.3 ในการทำการเลียนแบบกระบวนการหมักควรให้มีสมการแทนการผลิตรคของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ถึงแม้ว่าผลผลิตที่สนใจทำการศึกษาจะเป็นแค่ทรีฮาโลส แต่เนื่องจากทรีฮาโลสเป็นสารที่ผลิตแล้วถูกสะสมไว้ภายในเซลล์ ทำให้สมการที่นำมาใช้ในการเลียนแบบจึงเป็นแค่การอธิบายในส่วนของการผลิตเซลล์ ไม่มีส่วนของผลผลิตที่เกิดขึ้น จึงมีผลทำให้การเลียนแบบกระบวนการหมักยังไม่สมบูรณ์ ค่าพารามิเตอร์ที่ประเมินได้จึงยังไม่สามารถนำมาใช้ในการทำนายกระบวนการหมักได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กชกร ปรางค์วิเศษ. 2554. การหาสถานะที่เหมาะสมของการผลิตฟรุกโทสและอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์จากเยลรูชาเล็มอาร์ทีโซคด้วยเอนไซม์อินูลินสฟสม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชลวศา หาญวิวัฒน์วงศ์. 2544. การวิเคราะห์การออกแบบการทดลองโดยการรวมวิธีการทางสถิติและวิธีอีโวลูชันนารีโอเพอเรชันเพื่อปรับปรุงการกำหนดค่าปัจจัยที่ดีที่สุดของกระบวนการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ สิทธิเจริญชัย. 2545. ทรีฮาโลสหรือน้ำตาลเห็ด. เอกสารวิชาการ. กองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.

พรพรรณ อภิรักษ์ติวงศ์. 2519. ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (ATCC13673) โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากกากกล้วยเป็นวัตถุดิบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วรสิทธิ์ โตจำปา และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2544. วิสวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

Aimei, Z., S. Benjakul, P. Ke, G. Jie and L. Xin. 2006. Cryoprotective effects of trehalose and sodium lactate on tilapia (*Sarotherodon nilotica*) surimi during frozen storage. **Food Chem.** 96 (1): 96-103.

Antila, M. 1954. Uber die Propionsaurebakterien im Emmemtaler Kase. Meijerit. Aikakausk. 16: 1-132. In Hettinga, D.H. and G.W. Reinbold. 1972. The propionic acid bacteria-a review. **Milk Food Technol.** 35: 295-447.

- _____ and M. Hietaranta. 1953. The inhibitory effect of lactate on growth and fermentation of propionic acid bacteria. *Meijerit. Aikakausk.* 15: 11-19. *In* Hettinga, D.H. and G.W. Reinbold. 1972. The propionic acid bacteria-a review. **Milk Food Technol.** 35: 295-447.
- Argüelles, J.C. 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. **Arch. Microbiol.** 174: 217-224.
- Arkad'eva, Z.A. and N.M. Kalenik. 1971. Physiological and biochemical characteristics of some mutants of *Propionibacterium shermanii*. **Mikrobiol.** 40 (5) : 880-885.
- Attfield, P.V., A. Raman and C.J. Northcott. 1992. Construction of *Saccharomyes cerevisiae* strains that accumulate relatively low concentrations of trehalose, and their application in testing the contribution of the disaccharide to stress tolerance. **FEMS Microbiol. Lett.** 94: 271-276.
- Baker, H.A. and Lipmann. 1949. The role of phosphate in the metabolism of *Propionibacterium pentosaceum*. **Biol. Chem.** 179: 247-257.
- Barbirato, F., D. Chedaille and A. Bories. 1997. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47: 441-446.
- Bernaroudj, N., D.O. Lee and A.L. Goldberg. 2001. Trehalose accumulating during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. **Biol. Chem.** 276: 24261-24167.
- Cardoso, F.S., P. Gaspar, L. Hugenholtz, A. Ramos and H. Santos. 2004. Enhancement of trehalose production in dairy propionibacteria through manipulation of environmental conditions. **Int. Food Microbiol.** 91: 195-204.

- _____, R.F. Castro, N. Borges and H. Santos. 2007. Biochemical and genetic characterization of the pathways for trehalose metabolism in *Propionibacterium freudenreichii*, and their role in stress response. **Microbiol.** 153: 270-280.
- Cho, Y.J., O.J. Park and H.J. Shin. 2006. Immobilization of thermostable trehalose synthase for the production of trehalose. **Enzyme Microb. Tech.** 39 (1): 108-113.
- Coral, J., S.G. Karp, L.P. de S. Vandenberghe, J.L. Parada, A. Pandey and C.R. Soccol. 2008. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 151: 333-341.
- Crow, V.L. 1988. Polysaccharide production by propionibacteria during lactose fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** 54 (7): 1982-1985.
- Delwiche, E.A. 1949. Vitamin requirements of the genus *Propionibacterium*. **Bacteriol.** 58: 395-398.
- Deborde, C., C. Corre, D.B. Rolin, L. Nadal, J.D. Certaines and P. Boyaval. 1996. Trehalose biosynthesis in dairy *Propionibacterium*. **Magnet. Res. Ann.** 2: 297-304.
- Elbein, A.D., Y.T. Pan, I. Pastuszak and D. Carroll. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiol.** 13 (4): 17R-27R.
- Food Standards Australia New Zealand. 2003. **Final Assessment Report Application A453 Trehalose as a Novel Food.**
- Fromageot, C. and P. Chaix. 1937. Respiration et Fermentation chez *Propionibacterium pentosaceum*. *Enzymologia.* 3: 288. In Hettinga, D.H. and G.W. Reinbold. 1972. The propionic acid bacteria-a review. **Milk Food Technol.** 35: 295-447.

- George, H. 2010. **What is Trehalose?** Available Source: <http://www.wisegeek.com/what-is-trehalose.htm>, October 28, 2010.
- Hettinga, D.H. and G.W. Reinbold. 1972. The propionic acid bacteria review. II. Metabolism. **Milk Food Technol.** 35: 358-372.
- Higashiyama, T. 2002. Novel function and application of trehalose. **Pure Appl. Chem.** 74 (7): 1263-1269.
- Himmi, E.H., A. Bories, A. Boussaid and L. Hassani. 2000. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53: 435-440.
- Hols, P. 2003. Universite catholique de Louvain Life Science Institute Belgium. **Production of low calorie sugars by food bacteria.**
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore. 787.
- Hottiger, T., P. Schmutz and A. Wiemken. 1987. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** 169 (12): 5518-5522.
- Hsu, S.T. and S.T. Yang. 1991. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: effects of pH. **Biotechnol. Bioeng.** 38 (6): 571-578.
- Hugenholtz, J. and E. J. Smid. 2002. Nutraceutical Production with Food-grade Microorganisms. **Curr. Opinion in Biotechnol.** 13 (5): 497-507.
- Ibragimova, S.I., N.M. Neronova and I.L. Rabotnova. 1969. Kinetics of growth inhibition in *Propionibacterium shermanii* by hydrogen and hydroxyl ions. **Mikrobiol.** 38 (6): 933-937.

- Insel, P., D. Ross, K. McMahon and M. Bernstein. 2010. **Nutrition**. 4th ed. Jones and Bartlett Publishers, United States of America.
- Jan, G., A.S. Belzacq, D. Haouzi, A. Rouault, D. Metivier, G. Kroemer and C. Brenner. 2002. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. **Cell Death Differ.** 9:179-188
- Koussémon, M., Y. Combet-Blanc and B. Ollivier. 2003. Glucose fermentation by *Propionibacterium microaerophilum*: Effect of pH on metabolism and bioenergetic. **Curr. Microbiol.** 46: 141-145.
- Kuenzi, M.T. and A. Fiechter. 1972. Regulation of carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Microbiol.** 84: 254-265.
- Langsrud, T. and G.W. Reinbold. 1973. Flavour development and microbiology of Swiss cheese. A review. III. Ripening and flavour production. **Milk Food Technol.** 36: 593-609.
- Lewis, V.P. and S. T. Yang. 1992. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*: effect of growth substrate. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 37: 437-442.
- Lui, R., H. Barkhordarian, S. Emadi, C.B. Park and M.R. Sierks. 2005. Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. **Neurobiol. Dis.** (in press).
- Mahmud, S.A., K. Nagahisa, T. Hirasawa, K. Yoshikawa, K. Ashitani and H. Shimizu. 2009. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.** 26: 17-30.

- Managbanag, J.R. 2002. An analysis of trehalose, glycerol, and mannitol accumulation during heat and salt stress in a salt marsh isolate of *Aureobasidium pullulans*. **Mycologia**. 94 (3): 384-391.
- Miyamoto, T, K. Kawabata, K. Honjoh and S. Hatano. 1996. Effect of trehalose on freeze tolerance of baker's yeast. **Fac. Agr. Kyushu Univ.** 41: 105-112.
- Moat, A.G., J.W. Foster and M.P. Spector. 2002. **Microbial Physiology**. 4th ed. Wiley-Liss, Inc.
- National Center for Biotechnology Information. n.d. **Trehalose-compound summary (CID 7427)**. Available Source: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=7427>, October 22, 2010.
- Neronova, N.M., A.I. Anchurova and N.D. Ierusalimski. 1962. Formation of vitamin B₁₂ by propionic acid bacteria with respect to condition of cultivation. **Mikrobiol.** 31 (2): 203-208.
- _____, _____, S.I. Ibragimova and N.D. Ierusalimski. 1967a. Investigations of the growth of *Propionibacterium shermanii* by short continuous cultivation experiments. **Mikrobiol.** 36 (2): 259-263.
- _____, S.I. Ibragimova and N.D., Ierusalimskii. 1967b. Effect of propionate concentration on the specific growth rate of *Propionibacterium shermanii*. **Mikrobiol.** 36 (3): 404-409.
- Nguyen, V.K, L. Ehret-Sabatier, M. Goeldner, C. Boudier, G. Jamet, J.M. Water and P. Poindron. 1997. Stabilization of dry immobilized acetylcholinesterase on microfiltration plate for colorimetric determination of its inhibition in water and biological-fluids. **Enzyme Micro. Technol.** 20 (1): 18-23.

- Nishimoto, T., M. Nakano, S. Ikegami, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka. 1995. Existence of a novel enzyme converting maltose into trehalose. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 59: 2189-2190.
- _____, _____, T. Nakada, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka. 1996a. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 60: 640-644.
- _____, T. Nakada, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka. 1996b. Purification and characterization of a thermostable trahalose synthase from *Thermus aquaticus*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 60: 835-839.
- Osman, H.G. and M.S. Chenouda. 1968. Biosynthesis of vitamin B₁₂ by *Propionibacterium shermanii* II. The suitability of different carbon and nitrogen sources as well as the effect of vitamins, purines and pyrimidines on the growth and vitamin B₁₂ synthesis. **Chem. UAR.** 11: 353-361.
- Panek, A. 1963. Function of trehalose in baker's yeast. **Arch. Biochem. Biophys.** 98: 349-355.
- Park, H.S., G.W. Reinbold., E.G. Hammond and W.S. Clark. 1967. Growth of propionibacteria at low temperatures. **Dairy Sci.** 50: 589-591
- Passmore, R., B.M. Nicol, M. Narayana Rao, G.H. Beaton and E.M. Demayer. 1974. **Handbook on Human Nutritional Requirement.** FAO and WHO., Rome. 66.
- Prescott, S.C. and C.G. Dunn. 1959. Production of vitamin B₁₂, pp. 482-496. **Industrial Microbiology.** 3rd ed. McGraw Hill Book Company, New York.
- Quesada-Chanto, A.S. Afschar and F. Wagner. 1994. Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42: 16-21.

- Rao, R.S., R.S. Prakasham, K.K. Prasad, S. Rajesham, P.N. Sarmab and L.V. Rao. 2004. Xylitol production by *Candida sp.*: parameter optimization using Taguchi approach. **Process Biochem.** 39(8): 951-956.
- Rehberger, J.L. and B.A. Glatz. 1998. Response of cultures of *Propionibacterium* to acid and low pH : tolerance and inhibition. **Food Protec.** 61 (2): 211-216.
- Richards, A.B., S. Krakowka, L.B. Dexter, H. Schmid , A.P.M. Wolterbeek, D.H. Waalkens-Berendsen, A. Shigoyuki and M. Kurimoto. 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. **Food Chem. Toxicol.** 40: 871-898.
- Roser, B. and C. Colaco. 1993. A sweeter way to fresher food. **New Sci.** 138: 25-28.
- Roy, R.K. 2001. **Design of Experiments using the Taguchi Approach.** John Wiley & Son, Inc, New York.
- Salminen, S.O. and J.G. Streeter. 1986. Enzyme of α,α -trehalose metabolism in soybean nodules. **Plant Physiol.** 81: 538-541.
- Schiraldi, C., I. Di Lernia and M. De Rosa. 2002. Trehalose production: exploiting novel approaches. **Trends Biotechnol.** 20: 420-425.
- Seshadri, N. and S.N. Mukhopadhyay. 1993. Influence of environmental parameters on propionic acid upstream bioprocessing by *Propionibacterium acidipropionici*. **Biotechnol.** 29 (3): 321-328.
- Sharma, S.C. and M.S. Anand. 2006. Role of selenium supplementation and heat stress on trehalose and glutathione content in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 133 (1):1-7.

- Shitakke, E.I., R.K. Seidalina and R.M. Dzyubanova. 1967. Change in the properties of propionic acid bacteria in nutritive media with ascorbic acid, (Endl. Sum.) *Izv, Akad. Nuak. Kaz. SSSR Ser. Biol.* 2: 36-39. *Cited by* D.H. Hettinga and D.W. Reinbold. The propionic acid bacteria-a review. *Milk Food Technol.* 35: 295-301.
- Simola, M, A.L. Hanninen, S.M. Stranius and M. Makarow. 2000. Trehalose is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum but not for maintenance of membrane traffic functions after severe heat stress. *Molecular Microbiol.* 37: 42-53.
- Singer, M.A. and S. Lindquist. 1998. Thermotolerance in *saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 16: 460-468.
- Souza, N.D. and A.D. Panek. 1968. Location of trehalase and trehalose in yeast cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 22-28.
- Suwannakham, S. 2005. **Metabolic Engineering for Enhanced Propionic Acid Fermentation by *Propionibacterium acidipropionici***. Ph.D. Thesis, Ohio State University.
- _____ and S.T. Yang. 2005. Enhanced Propionic Acid Fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* Mutant Obtained by Adaptation in a Fibrous-Bed Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 91 (3): 325-337.
- Tatum, E.L., E.B. Fred, H.G. Wood and W.H. Peterson. 1936. Essential growth factors for propionic acid bacteria. I. Source and fractionation. II. Nature of the Neuberg precipitate fraction of potato: replacement by ammonium sulphate or by certain amino acids. *Bacteriol.* 32: 157-166, 167-174. *Cited by* D.H. Hettinga and D.W. Reinbold. The propionic acid bacteria-a review. I. Growth. *Milk Food Technol.* 35: 295-301.
- Thomson, R.C. 1943. The B-vitamin requirements of the propionibacteria. *Bacteriol.* 46: 99-104.

Trevelyan, W.E. and J.S. Harrison. 1956. Studies on yeast metabolism. **Biochem.** 63 (1): 23-33.

Vorob'eva, L.I. 1957. Effect of aeration on propionic acid fermentation. **Mikrobiol.** 28 (2): 209-241.

_____, L.F. Kozyreva and L.L. Lisenkova. 1967. Effect of light on the metabolism of propionic acid bacteria. **Mikrobiologiya** 33 (1): 26-30.

Wang, L., R. Huang, G. Gu and H. Fang. 2008. Optimization of trehalose production by a novel strain *Brevibacterium* sp. SY361. **Basic Microbiol.** 48: 410-415.

Wiemken, A. 1990. Trehalose in yeast stress protectant rather than reserve carbohydrate. **Antonie van Leeuwenhoek.** 58: 209-217.

Wikipedia. 2014a. **Lactose**. Available Source: <http://en.wikipedia.org/wiki/Lactose>, May 17, 2014.

_____. 2014b. **Propanoic acid**. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Propanoic_acid, May 17, 2014.

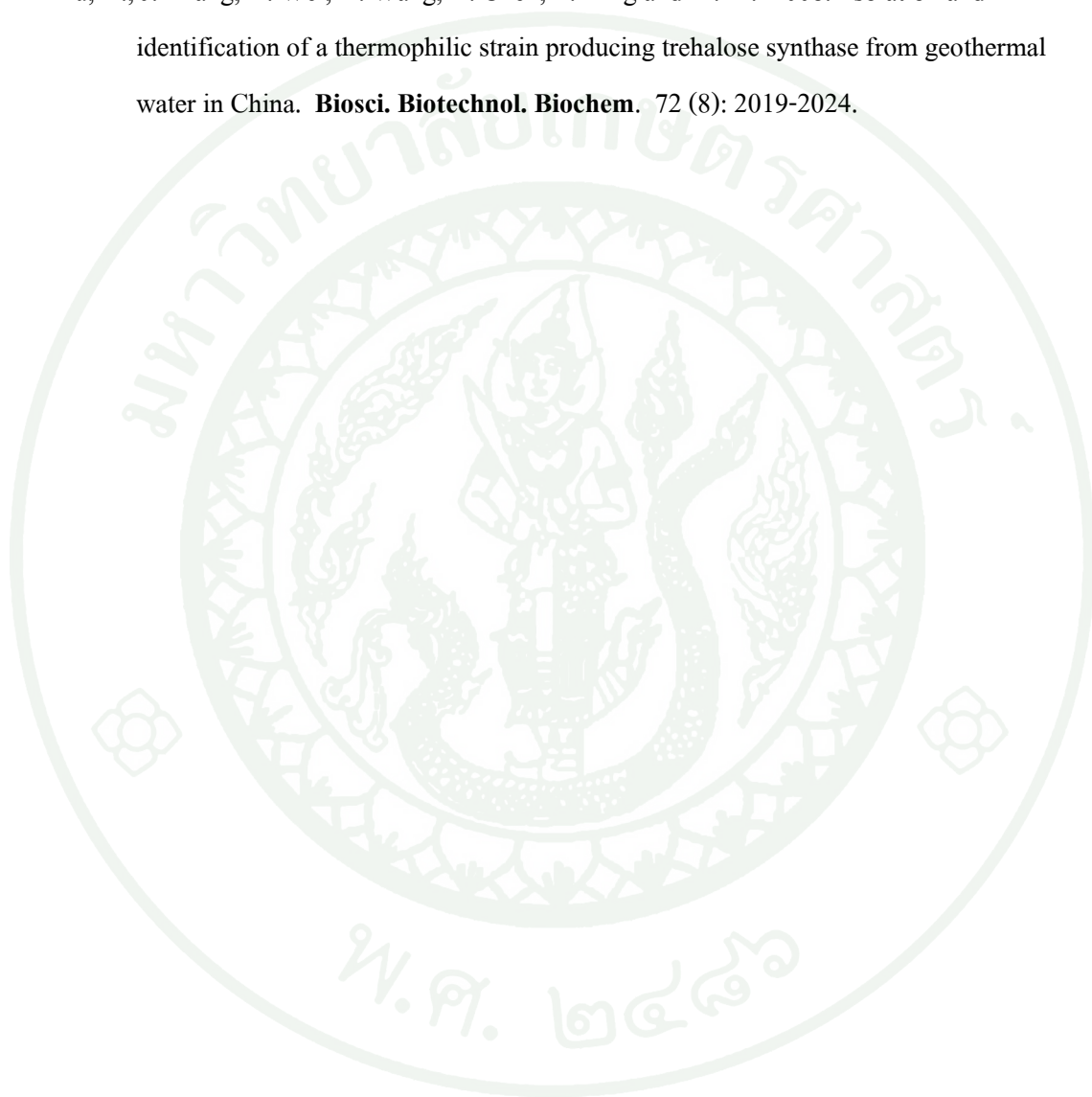
_____. 2014c. **Carbon dioxide**. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_dioxide, May 17, 2014.

Wood, H.G., A.A. Andersen and C.H. Werkman. 1938. Nutrition of the propionic acid bacteria. **Bacteriol.** 36: 201-214.

Yang, S.T. and Huang. 1995. A novel recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose. **Biotechnol. Bioeng.** 45: 379-368.

Zeidan, A.A. and W.J. van Niel. 2010. A quantitative analysis of hydrogen production efficiency of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor owensensis* OL^T. **Int. J. Hydrogen Energy**. 35: 1128-1137.

Zhu, Y., J. Zhang, D. Wei, Y. Wang, X. Chen, L. Xing and M. Li. 2008. Isolation and identification of a thermophilic strain producing trehalose synthase from geothermal water in China. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 72 (8): 2019-2024.





ภาคผนวก



ตารางผนวกที่ ก1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	4.98	0.079	10.710	0.00
6		0.115		
12	4.88	0.172		
24	4.71	0.295	10.555	17.00
30		0.466		
36	4.59	0.643		
42		0.698		
48	4.43	1.015	8.801	24.60
54		1.144		
60	4.26	1.512		
72	4.14	1.999	6.102	209.40
78		2.112		
84	4.06	2.407		
91		2.438		
96	4.00	2.633	4.005	381.40
102		2.602		
108	3.97	2.695		
114		2.711		
120	3.94	2.848	2.825	307.60
126		2.857		
132	3.91	2.906		
144	3.89	2.975	1.814	438.00
156	3.89	2.988		
168	3.88	3.030	1.197	291.20

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
180	3.86	3.008		
192	3.85	3.015	0.865	231.40
204	3.87	2.997		
216	3.84	3.023	0.588	222.80
228	3.85	3.015		
240	3.86	3.003	0.422	213.60

ตารางผนวกที่ ก2 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	5.64	0.075	11.800	0.000
6		0.133		
12	5.27	0.201		
20		0.297		
24	4.96	0.531	10.360	0.000
30		0.609		
36	4.69	0.809		
43		1.070		
48	4.42	1.308	8.523	69.600
54		1.550		
60	4.27	1.780		
66		1.892		
72	4.16	2.048	5.307	304.400
78		2.101		
84	4.11	2.193		
92		2.216		
97	4.08	2.284	3.433	329.800
102		2.317		
108	4.08	2.349		
120	4.06	2.412	2.966	341.800
126		2.392		
132	4.04	2.428		
144	4.05	2.507	2.431	333.000
156	4.02	2.486		

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
169	4.00	2.498	2.350	313.200
180	4.02	2.499		
192	4.00	2.491	2.219	223.000
204	4.04	2.507		
216	4.03	2.498	2.054	136.400
228	4.03	2.451		
240	4.04	2.438	1.965	93.800

ตารางผนวกที่ ก3 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	6.46	0.085	10.931	0.000
6		0.182		
12	6.15	0.260		
18		0.349		
24	6.15	0.480	10.528	0.000
30		0.577		
36	5.79	0.691		
48	5.40	1.046	9.131	9.400
54		1.210		
60	5.10	1.396		
66		1.422		
75	5.03	1.485	7.666	55.200
78		1.525		
84	5.01	1.553		
90		1.553		
96	5.00	1.584	7.483	39.600
108	4.97	1.555		
120	4.95	1.525	7.660	28.000
132	4.94	1.506		
144	4.91	1.508	7.069	15.400
156	4.93	1.476		
168	4.94	1.466	7.309	11.000
180	4.92	1.430		
192	4.92	1.470	7.020	0.000

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
204	4.94	1.420		
216	4.92	1.439	7.292	0.000
228	4.87	1.392		
240	4.93	1.407	7.157	0.000

ตารางผนวกที่ ก4 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	4.99	0.073	20.523	0.000
6		0.147		
12	4.75	0.303		
18		0.752		
24	4.43	1.176	19.172	19.000
30		1.540		
36	4.18	1.978		
48	4.09	2.511	14.255	345.400
54		2.598		
60	4.01	2.639		
66		2.775		
72	4.00	2.857	13.925	378.200
78		2.897		
84	3.98	3.116		
96	3.99	3.194	13.522	423.600
102		3.205		
108	3.98	3.263		
114		3.252		
120	3.96	3.248	13.063	394.600
132	3.97	3.301		
144	3.93	3.291	12.704	290.800
156	3.96	3.263		
168	3.94	3.273	12.417	213.800
180	3.94	3.234		

ตารางผนวกที่ ก4 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
192	3.94	3.228	12.488	137.600
204	3.95	3.197		
216	3.94	3.139	12.129	44.600
228	3.93	3.139		
240	3.94	3.096	12.252	0.000

ตารางผนวกที่ ก5 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	5.73	0.073	20.827	0.000
6		0.134		
12	5.28	0.184		
24	4.98	0.368	20.498	31.000
30		0.419		
36	4.82	0.452		
42		0.484		
49	4.76	0.511	20.093	27.800
54		0.524		
60	4.75	0.545		
67		0.569		
72	4.73	0.595	19.742	24.400
78		0.599		
84	4.71	0.595		
97	4.71	0.595	20.050	5.000
108	4.68	0.583		
120	4.70	0.599	19.279	0.000
132	4.71	0.590		
144	4.74	0.566	19.410	0.000
156	4.74	0.578		
168	4.74	0.581	20.678	0.000
180	4.73	0.574		
192	4.74	0.566	20.685	0.000
204	4.74	0.564		

ตารางผนวกที่ ก5 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
216	4.75	0.567	20.403	0.000
228	4.75	0.567		
240	4.75	0.564	20.072	0.000

ตารางผนวกที่ 6 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	6.36	0.075	18.488	0.000
6		0.127		
12	5.87	0.222		
20		0.332		
24	5.18	0.636	17.244	0.000
30		0.683		
36	4.86	0.864		
43		1.070		
48	4.59	1.170	15.431	5.800
54		1.360		
60	4.42	1.507		
66		1.621		
72	4.32	1.763	12.929	150.200
78		1.847		
84	4.25	2.044		
92		2.119		
97	4.21	2.250	11.890	429.000
102		2.317		
108	4.15	2.381		
120	4.14	2.589	10.149	433.800
126		2.639		
132	4.07	2.663		
139		2.677		
144	4.08	2.763	9.537	575.000

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
156	4.05	2.853		
169	4.02	2.872	8.291	595.000
180	4.03	2.920		
192	4.01	2.969	8.662	550.800
204	4.04	3.078		
216	4.02	2.967	8.041	533.600
228	4.01	3.026		
240	4.01	3.026	7.961	462.200

ตารางผนวกที่ ก7 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	5.00	0.090	31.943	0.000
6		0.163		
12	4.85	0.242		
24	4.73	0.452	30.774	0.000
30		0.494		
36	4.69	0.555		
42		0.591		
49	4.68	0.662	31.399	0.000
54		0.646		
60	4.67	0.676		
67		0.700		
72	4.66	0.702	29.793	0.000
78		0.700		
84	4.66	0.711		
97	4.65	0.718	32.682	0.000
108	4.60	0.718		
120	4.64	0.725	32.408	0.000
132	4.65	0.734		
144	4.66	0.720	28.620	0.000
156	4.65	0.738		
168	4.64	0.740	33.165	0.000
180	4.64	0.736		
192	4.63	0.740	29.608	0.000
204	4.63	0.740		

ตารางผนวกที่ ก7 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
216	4.65	0.736	30.605	0.000
228	4.65	0.734		
240	4.63	0.740	30.934	0.000

ตารางผนวกที่ ๘ ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	5.65	0.080	27.468	0.000
6		0.145		
12	5.31	0.252		
18		0.413		
24	4.83	0.932	28.304	0.000
30		1.229		
36	4.46	1.612		
48	4.30	2.259	24.021	48.200
54		2.429		
60	4.17	2.592		
66		2.748		
72	4.12	2.970	22.371	199.000
78		2.941		
84	4.05	3.297		
96	4.01	3.505	21.224	323.400
102		3.561		
108	4.01	3.680		
114		3.761		
120	4.00	3.746	21.133	353.106
132	4.00	3.937		
144	3.97	4.091	19.521	326.400
156	3.99	4.161		
168	3.97	4.196	19.080	338.400
180	3.97	4.211		

ตารางผนวกที่ ๓ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
192	3.98	4.206	19.248	304.000
204	3.96	4.271		
216	3.96	4.233	20.138	249.800
228	3.93	4.226		
240	3.95	4.226	19.848	164.400

ตารางผนวกที่ 9 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแล็กโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แล็กโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	6.35	0.083	27.422	0.000
6		0.153		
12	5.50	0.257		
18		0.380		
24	4.91	0.720	26.022	18.800
30		0.947		
36	4.61	1.254		
42		1.439		
48	4.43	1.712	25.273	214.200
54		1.784		
60	4.33	1.948		
72	4.33	1.968	22.243	306.000
78		1.993		
84	4.28	2.038		
96	4.27	2.040	22.549	221.200
108	4.23	2.057		
120	4.24	2.053	21.452	131.000
132	4.23	2.046		
144	4.21	2.042	20.308	100.200
156	4.22	2.025		
167	4.23	1.972	20.022	61.400
180	4.23	1.995		
192	4.24	1.980	20.736	25.400
204	4.24	1.985		

ตารางผนวกที่ ก9 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น		
		เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (มิลลิกรัมต่อลิตร)
216	4.21	1.985	20.470	11.000
228	4.23	1.995		
240	4.22	1.993	20.980	0.000

ตารางผนวกที่ ก10 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่สภาวะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนที่ 80 รอบต่อนาที ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีค่าเท่ากับ 7 โดยไม่มีการควบคุมค่าพีเอช (ก) ควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 1 (ค1) ควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 7 ช่วงที่ 2 (ค2) และควบคุมค่าพีเอชให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 ช่วงที่ 2 (ง)

ช่วงการ เพาะเลี้ยง	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น							
			เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	Residual biomass ¹ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (กรัมต่อลิตร)	กรดพรอพิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	กรดแอสซิดิก (กรัมต่อลิตร)	กรดซักซินิก (กรัมต่อลิตร)	กรดทั้งหมด ² (กรัมต่อลิตร)
ก	0	6.2	0.120	20.138	0.000	1.157	0.000	0.449	1.605	0.120
	4	5.92	0.080	20.994	0.000	1.346	0.000	0.598	1.944	0.080
	8	5.61	0.300	21.057	0.000	1.378	0.000	0.949	2.327	0.300
	16	5.28	0.280	20.535	0.000	1.318	0.033	1.014	2.364	0.280
	20	5.16	0.410	20.558	0.000	1.164	0.051	1.050	2.265	0.410
	24	5.06	0.480	19.137	0.000	1.174	0.074	1.091	2.339	0.480
	28	4.99	0.520	20.816	0.000	0.983	0.097	1.249	2.328	0.520
	32	4.96	0.610	19.723	0.004	0.970	0.154	1.205	2.329	0.606
	40	4.92	0.730	19.752	0.004	1.026	0.193	1.526	2.745	0.726
	44	4.89	0.780	19.966	0.005	0.929	0.218	1.542	2.689	0.775
	48	4.87	0.830	20.155	0.005	0.956	0.317	1.357	2.630	0.825

ตารางผนวกที่ ก10 (ต่อ)

ช่วงการ เพาะเลี้ยง	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น							
			เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	Residual biomass ¹ (กรัมต่อลิตร)	แลกโทส (กรัมต่อลิตร)	ทรีฮาโลส (กรัมต่อลิตร)	กรดพรูปิโอนิก (กรัมต่อลิตร)	กรดแอซิดิก (กรัมต่อลิตร)	กรดซัคซินิก (กรัมต่อลิตร)	กรดทั้งหมด ² (กรัมต่อลิตร)
ข	52	5.51	0.790	19.709	0.004	1.140	0.260	1.500	2.900	0.786
	56	5.53	0.920	19.686	0.005	1.105	0.303	1.941	3.349	0.915
	60	5.54	0.980	19.832	0.009	1.091	0.355	1.878	3.324	0.971
	66	5.5	1.050	19.034	0.012	1.134	0.445	1.895	3.474	1.038
	68	5.5	1.140	18.908	0.014	1.132	0.544	1.623	3.299	1.126
	72	5.5	1.180	17.144	0.011	1.089	0.520	1.766	3.375	1.169
	76	5.5	1.350	18.827	0.024	1.086	0.606	1.981	3.674	1.326
	90	5.5	1.580	16.818	0.043	1.011	0.909	2.244	4.164	1.537
	96	5.5	1.640	16.434	0.049	1.001	1.007	2.575	4.583	1.591
	114	5.5	2.030	15.619	0.093	1.009	1.513	3.264	5.785	1.937
ค1	114.5	7	2.250	17.065	0.085	1.317	0.786	2.315	4.418	2.165
	122	7	1.900	15.426	0.098	0.846	1.016	2.703	4.565	1.802
	132	7	2.420	13.773	0.114	0.913	1.657	3.709	6.279	2.306
	138	7	2.640	12.512	0.109	0.881	1.485	3.848	6.214	2.531

ตารางผนวกที่ ก10 (ต่อ)

ช่วงการ เพาะเลี้ยง	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น							
			เซลล์	Residual	แลกโทส	ทรีฮาโลส	กรดพอร์ฟิโอนิก	กรดแอซีติก	กรดซัคซินิก	กรดทั้งหมด
			(กรัมต่อลิตร)	biomass ¹ (กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)
	144	7	2.750	10.997	0.166	0.849	1.584	4.166	6.599	2.584
	150	7	3.010	10.846	0.325	0.903	1.897	4.544	7.344	2.685
	162	7	3.240	9.504	0.381	0.965	2.380	5.550	8.894	2.859
	168	7	3.280	9.031	0.420	0.862	2.403	5.490	8.756	2.860
	174	7	3.470	8.170	0.688	0.973	2.355	6.119	9.447	2.782
	180	7	3.420	7.392	0.755	0.877	2.798	6.150	9.825	2.665
	186	7	3.480	6.619	0.811	0.874	2.762	6.198	9.834	2.669
	192	7	3.570	6.120	0.845	0.909	3.332	6.640	10.881	2.725
ค2	198	7	3.220	5.469	0.661	0.886	3.220	6.413	10.518	2.559
	210	7	3.720	4.273	0.784	0.936	3.295	7.136	11.367	2.936
	216	7	3.910	3.669	0.751	0.948	3.376	7.307	11.631	3.159
ง	216.75	5.53	3.880	3.428	0.701	0.819	3.500	7.382	11.701	3.179
	222	5.5	3.940	3.451	0.925	0.861	3.589	7.504	11.954	3.015
	234	5.5	3.940	2.403	0.846	0.963	4.083	7.549	12.595	3.094

ตารางผนวกที่ ก10 (ต่อ)

ช่วงการ เพาะเลี้ยง	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ความเข้มข้น							
			เซลล์	Residual	แลกโทส	ทรีฮาโลส	กรดพรอพิโอนิก	กรดแอซีติก	กรดซัคซินิก	กรดทั้งหมด
			(กรัมต่อลิตร)	biomass ¹ (กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)
	240	5.5	3.870	2.017	0.868	0.948	4.440	7.951	13.340	3.002
	246	5.5	3.520	1.103	0.768	0.928	4.121	8.095	13.145	2.752
	258	5.5	3.890	0.056	0.818	1.035	4.380	8.872	14.287	3.072

หมายเหตุ ¹ ได้มาจากการคำนวณโดยมีค่าเท่ากับผลต่างระหว่างความเข้มข้นเซลล์กับทรีฮาโลส

² ได้มาจากการคำนวณโดยมีค่าเท่ากับผลรวมของกรดพรอพิโอนิก กรดแอซีติก และกรดซัคซินิก



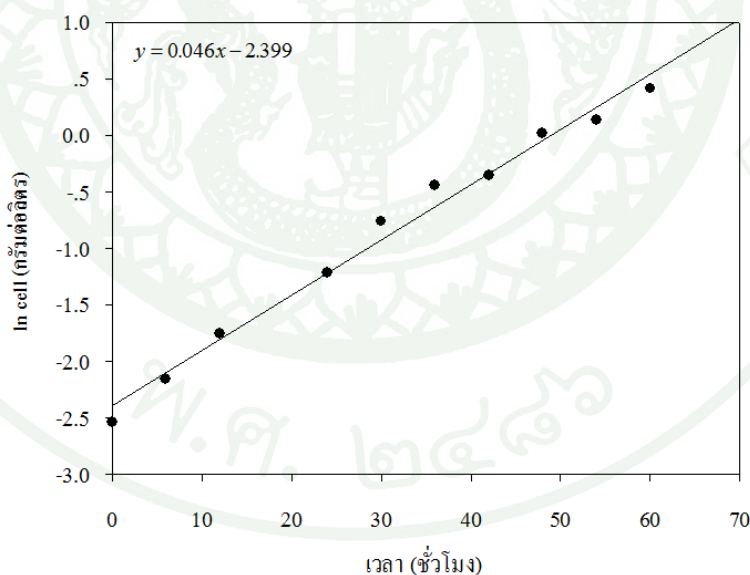
1. การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมัก

1.1 อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate)

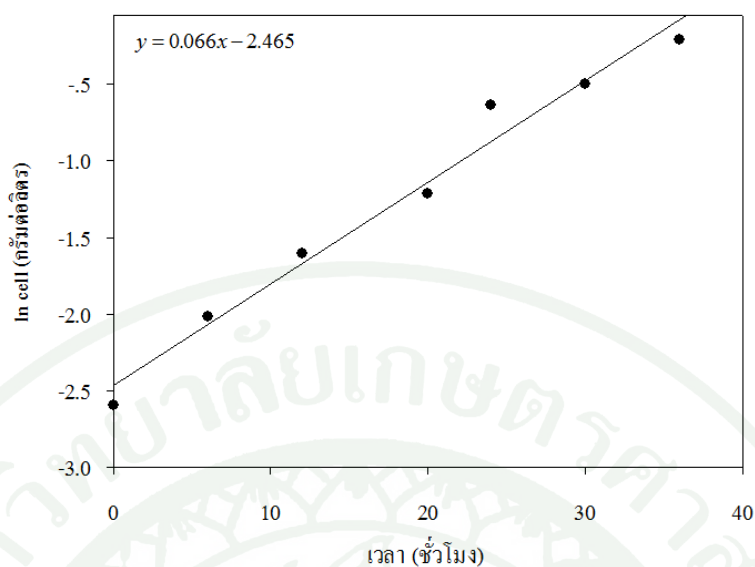
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) สามารถหาได้จากการเขียนกราฟลอการิทึม Natural logarithm ของความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์กับเวลา ซึ่งความชันของกราฟ (Slope) ในช่วงเอกซ์โพเนนเชียล จะมีค่าเท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อตามสมการ

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu X$$

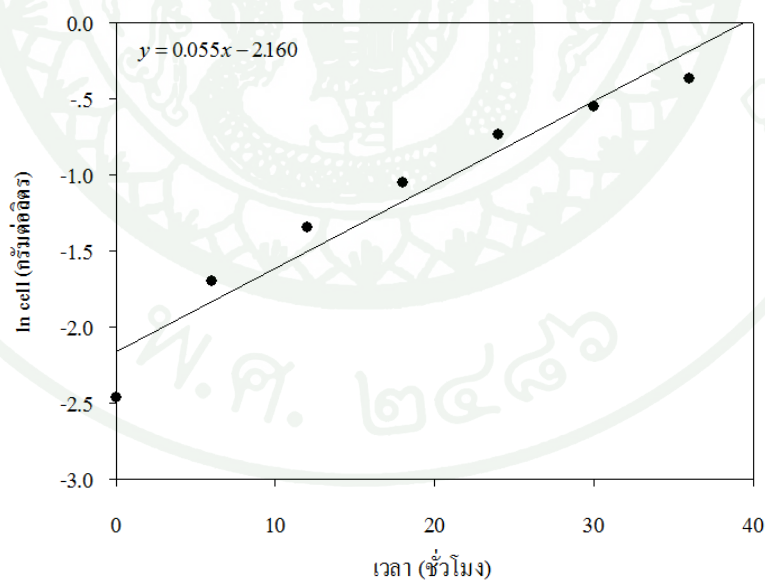
เมื่อ X คือ ความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์
 X_0 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์จุลินทรีย์
 X_t คือ ความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ที่เวลา t ใด ๆ
 μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ



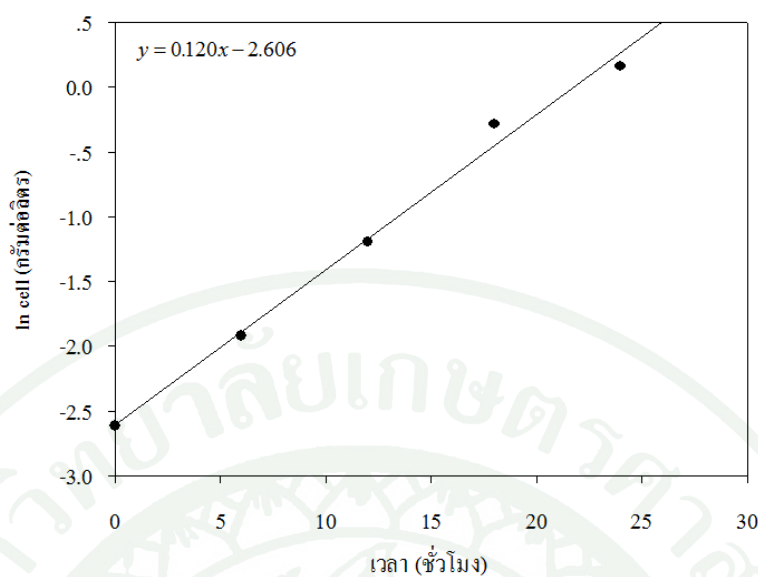
ภาพผนวกที่ ข1 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแล็กโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที (การทดลองที่ 1)



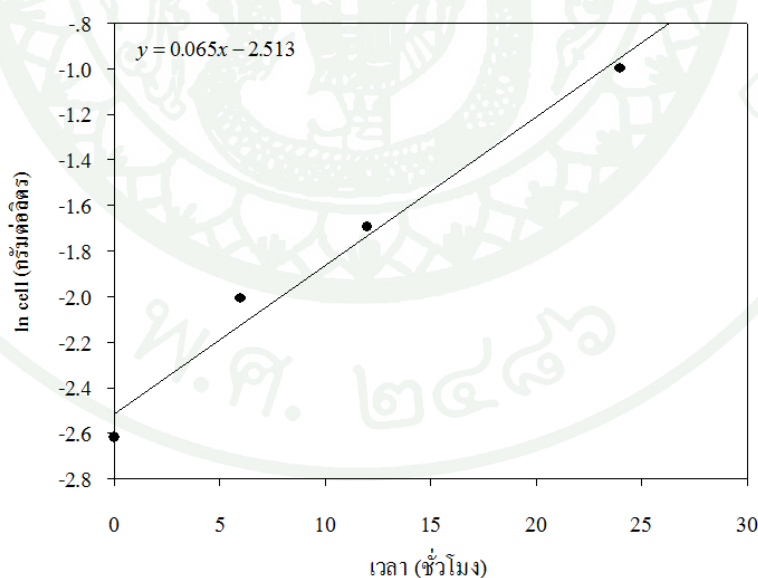
ภาพผนวกที่ ข2 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแล็กโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที (การทดลองที่ 2)



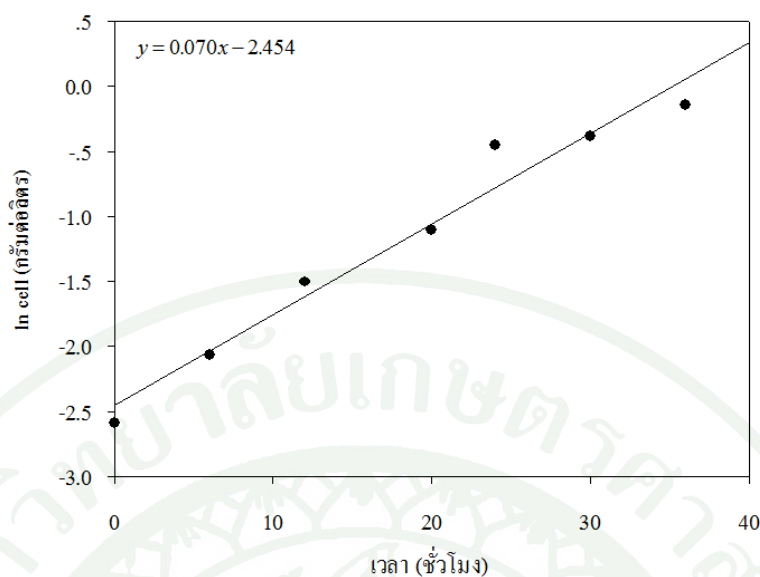
ภาพผนวกที่ ข3 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแล็กโทส 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที (การทดลองที่ 3)



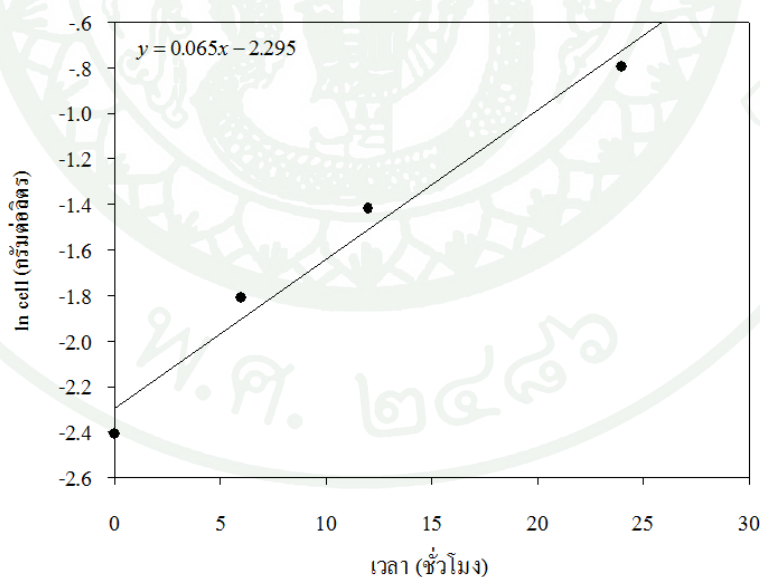
ภาพผนวกที่ ข4 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแล็กโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที (การทดลองที่ 4)



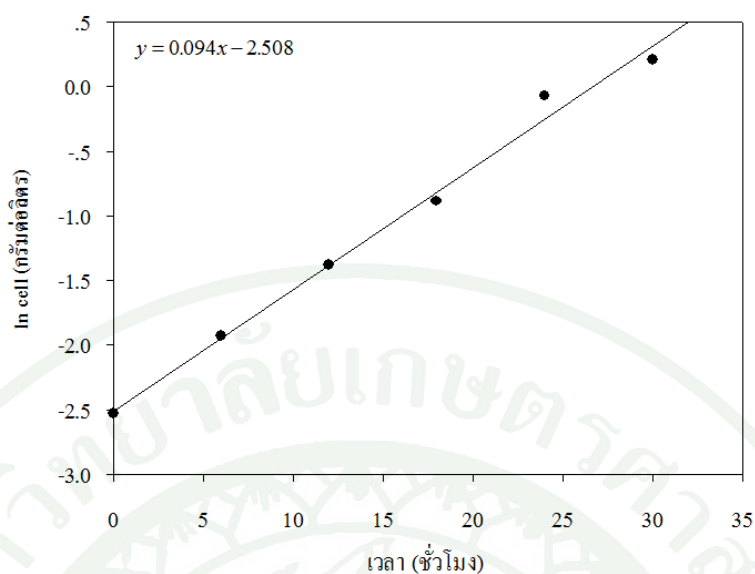
ภาพผนวกที่ ข5 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแล็กโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที (การทดลองที่ 5)



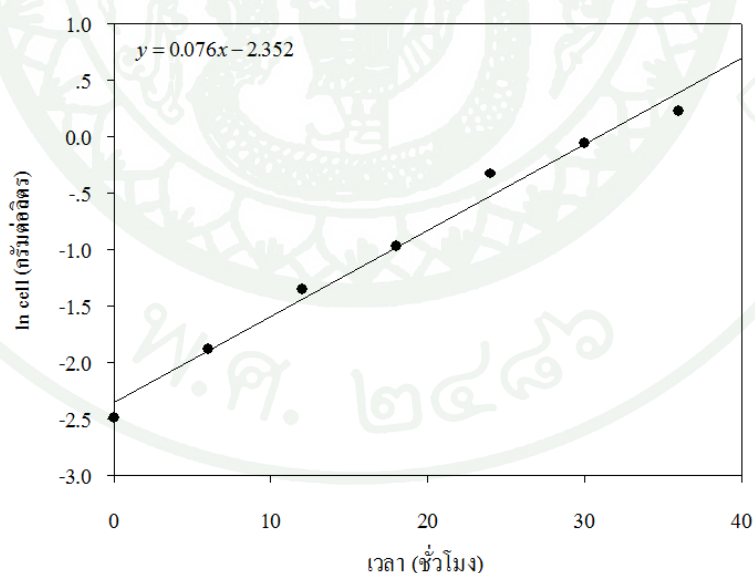
ภาพผนวกที่ ข6 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลคโทส 20 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที (การทดลองที่ 6)



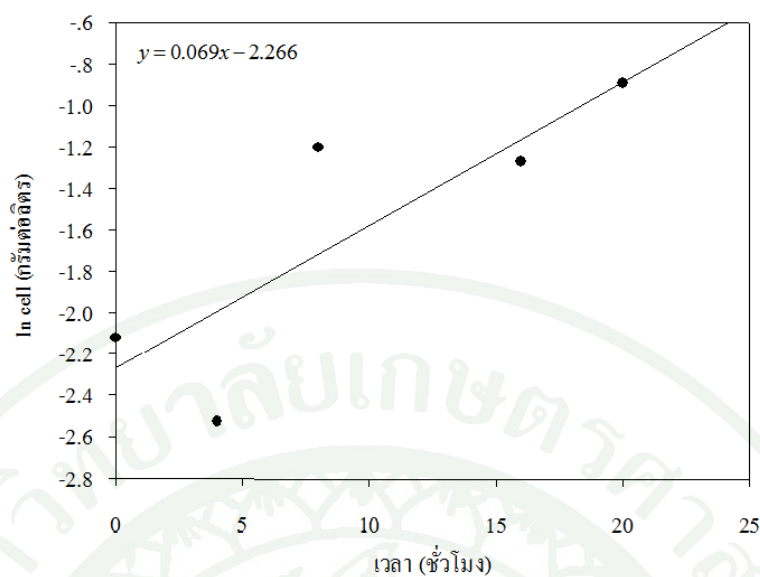
ภาพผนวกที่ ข7 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลคโทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที (การทดลองที่ 7)



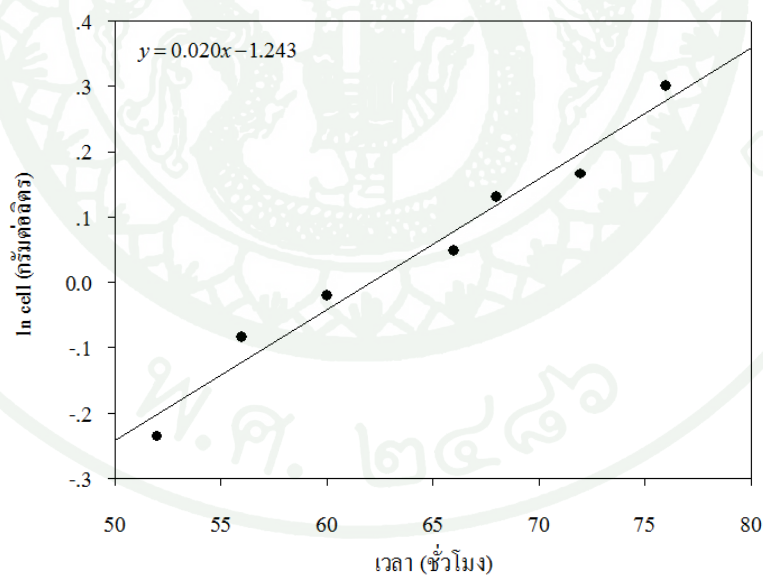
ภาพผนวกที่ ข8 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลก-โทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที (การทดลองที่ 8)



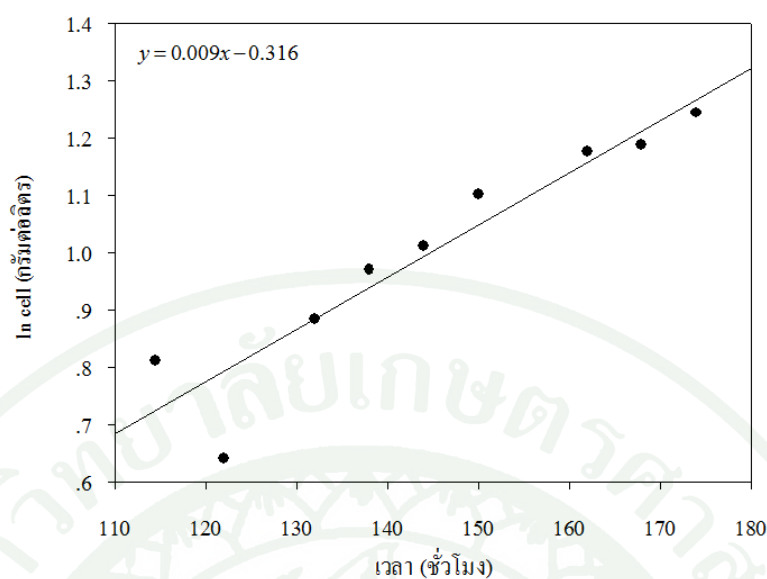
ภาพผนวกที่ ข9 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในขวดรูปชมพู่ ที่สภาวะความเข้มข้นแลก-โทส 30 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที (การทดลองที่ 9)



ภาพผนวกที่ ข10 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ไม่ควบคุมพีเอช



ภาพผนวกที่ ข11 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1



ภาพผนวกที่ ข12 การหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1

1.2 อัตราการใช้แลกโทสเชิงปริมาตร (Q_{Lac}) มีหน่วยเป็นกรัมแลกโทสต่อลิตร ต่อชั่วโมง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$Q_{Lac} = \frac{Lac_0 - Lac_t}{t - t_0}$$

เมื่อ Q_{Lac} คือ อัตราการใช้แลกโทสเชิงปริมาตร
 Lac_0 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแลกโทส
 Lac_t คือ ความเข้มข้นของแลกโทสที่เวลา t ใด ๆ
 t คือ เวลา t ใด ๆ
 t_0 คือ เวลาเริ่มต้น

1.3 อัตราการผลิตเซลล์เชิงปริมาตร มีหน่วยเป็นกรัมเซลล์ต่อลิตร ต่อชั่วโมง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$Q_x = \frac{X_t - X_0}{t - t_0}$$

เมื่อ	Q_x	คือ อัตราการผลิตเซลล์เชิงปริมาตร
	X_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์
	X_t	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลา t ใด ๆ
	t	คือ เวลา t ใด ๆ
	t_0	คือ เวลาเริ่มต้น

1.4 อัตราการผลิตทรีฮาโลสเชิงปริมาตร มีหน่วยเป็นกรัมทรีฮาโลสต่อลิตร ต่อชั่วโมง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$Q_{Tre} = \frac{Tre_t - Tre_0}{t - t_0}$$

เมื่อ	Q_{Tre}	คือ อัตราการผลิตทรีฮาโลสเชิงปริมาตร
	Tre_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของทรีฮาโลส
	Tre_t	คือ ความเข้มข้นของทรีฮาโลสที่เวลา t ใด ๆ
	t	คือ เวลา t ใด ๆ
	t_0	คือ เวลาเริ่มต้น

1.5 อัตราการผลิตกรดทั้งหมดเชิงปริมาตร มีหน่วยเป็นกรัมกรดทั้งหมดต่อลิตร ต่อชั่วโมง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$Q_{Ta} = \frac{Ta_t - Ta_0}{t - t_0}$$

เมื่อ	Q_{Ta}	คือ อัตราการผลิตกรดทั้งหมดเชิงปริมาตร
	Ta_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นกรดทั้งหมด
	Ta_t	คือ ความเข้มข้นของกรดทั้งหมดที่เวลา t ใด ๆ
	t	คือ เวลา t ใด ๆ
	t_0	คือ เวลาเริ่มต้น

1.6 อัตราจำเพาะของการใช้แลกโทส มีหน่วยเป็นกรัมแลกโทสต่อกรัมเซลล์ ต่อชั่วโมง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$q_{Lac} = \frac{1}{\bar{X}} \left(\frac{dLac}{dt} \right) = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2} \right)} \left(\frac{Lac_0 - Lac_t}{t - t_0} \right)$$

เมื่อ	q_{Lac}	คือ อัตราจำเพาะของการใช้แลกโทส
	Lac_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแลกโทส
	Lac_t	คือ ความเข้มข้นของแลกโทสที่เวลา t ใด ๆ
	X_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์
	X_t	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลา t ใด ๆ
	t	คือ เวลา t ใด ๆ
	t_0	คือ เวลาเริ่มต้น

1.7 อัตราจำเพาะของผลิตทรีฮาโลส มีหน่วยเป็นกรัมทรีฮาโลสต่อกรัมเซลล์ ต่อชั่วโมง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$q_{Tre} = \frac{1}{\bar{X}} \left(\frac{dTre}{dt} \right) = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2} \right)} \left(\frac{Tre_t - Tre_0}{t - t_0} \right)$$

เมื่อ	q_{Tre}	คือ อัตราจำเพาะของการผลิตทรีฮาโลส
	Tre_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของทรีฮาโลส
	Tre_t	คือ ความเข้มข้นของทรีฮาโลสที่เวลา t ใด ๆ
	X_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์
	X_t	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลา t ใด ๆ
	t	คือ เวลา t ใดๆ
	t_0	คือ เวลาเริ่มต้น

1.8 อัตราจำเพาะของผลิตกรดพรีโอไนค มีหน่วยเป็นกรัมกรดพรีโอไนคต่อกรัมเซลล์ ต่อชั่วโมง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$q_{Pro} = \frac{1}{\bar{X}} \left(\frac{dPro}{dt} \right) = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2} \right)} \left(\frac{Pro_t - Pro_0}{t - t_0} \right)$$

เมื่อ	q_{Pro}	คือ อัตราจำเพาะของการผลิตกรดพอร์ฟิโอนิก
	Pro_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดพอร์ฟิโอนิก
	Pro_t	คือ ความเข้มข้นของกรดพอร์ฟิโอนิกที่เวลา t ใด ๆ
	X_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์
	X_t	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลา t ใด ๆ
	t	คือ เวลา t ใดๆ
	t_0	คือ เวลาเริ่มต้น

1.9 อัตราจำเพาะของผลิตกรดแอซีติก มีหน่วยเป็นกรัมกรดแอซีติกต่อกรัมเซลล์ ต่อ ชั่วโมง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$q_{Ace} = \frac{1}{\bar{X}} \left(\frac{dAce}{dt} \right) = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2} \right)} \left(\frac{Ace_t - Ace_0}{t - t_0} \right)$$

เมื่อ	q_{Ace}	คือ อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก
	Ace_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดแอซีติก
	Ace_t	คือ ความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่เวลา t ใด ๆ
	X_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์
	X_t	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลา t ใด ๆ
	t	คือ เวลา t ใดๆ
	t_0	คือ เวลาเริ่มต้น

1.10 อัตราจำเพาะของผลิตกรดซักซินิก มีหน่วยเป็นกรัมกรดซักซินิกต่อกรัมเซลล์ ต่อ ชั่วโมง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$q_{Suc} = \frac{1}{\bar{X}} \left(\frac{dSuc}{dt} \right) = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2} \right)} \left(\frac{Suc_t - Suc_0}{t - t_0} \right)$$

เมื่อ	q_{Suc}	คือ อัตราจำเพาะของการผลิตกรดซัคซินิก
	Suc_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดซัคซินิก
	Suc_t	คือ ความเข้มข้นของกรดซัคซินิกที่เวลา t ใด ๆ
	X_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์
	X_t	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลา t ใด ๆ
	t	คือ เวลา t ใดๆ
	t_0	คือ เวลาเริ่มต้น

1.11 อัตราจำเพาะของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด มีหน่วยเป็นกรัมกรดทั้งหมดต่อกรัมเซลล์ ต่อ ชั่วโมง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$q_{Ta} = \frac{1}{\bar{X}} \left(\frac{dTa}{dt} \right) = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2} \right)} \left(\frac{Ta_t - Ta_0}{t - t_0} \right)$$

เมื่อ	q_{Ta}	คือ อัตราจำเพาะของการผลิตกรดทั้งหมด
	Ta_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดทั้งหมด
	Ta_t	คือ ความเข้มข้นของกรดทั้งหมดที่เวลา t ใด ๆ
	X_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์
	X_t	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลา t ใด ๆ
	t	คือ เวลา t ใดๆ
	t_0	คือ เวลาเริ่มต้น

1.12 อัตราจำเพาะของผลิตภัณฑ์คาร์บอนไดออกไซด์

ในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการวัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น ในคำนวณหา ค่าอัตราจำเพาะของผลิตภัณฑ์คาร์บอนไดออกไซด์ จึงสมมุติว่า ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอยู่ในระบบจะมีปริมาณเท่ากับกรดแอซิดิก เนื่องจากในการหมักเพื่อผลิตกรดพรอพิโอนิกโดยเชื้อแบคทีเรียพรอพิโอนิก สามารถแสดงคุณสมบัติได้ดังนี้



ดังนั้น จึงสามารถคำนวณอัตราจำเพาะของผลิตภัณฑ์คาร์บอนไดออกไซด์ได้จากสมการ

$$q_{CO_2} = \frac{1}{\bar{X}} \left(\frac{dAce}{dt} \right) = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2} \right)} \left(\frac{Ace_t - Ace_0}{t - t_0} \right)$$

เมื่อ	q_{CO_2}	คือ อัตราจำเพาะของผลิตภัณฑ์คาร์บอนไดออกไซด์
	Ace_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดแอซีติก
	Ace_t	คือ ความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่เวลา t ใด ๆ
	X_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์
	X_t	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลา t ใด ๆ
	t	คือ เวลา t ใดๆ
	t_0	คือ เวลาเริ่มต้น

1.13 ผลได้ของเซลล์ต่อแลกโทส

การประมาณค่าผลได้ของเซลล์ต่อแลกโทส ($Y_{X/Lac}$) มีค่าเท่ากับอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น (กรัมเซลล์ต่อลิตร) ต่อปริมาณแลกโทส (กรัมต่อลิตร) ที่ถูกใช้ไป ดังสมการ

$$Y_{X/Lac} = \frac{X_t - X_0}{Lac_0 - Lac_t}$$

เมื่อ	$Y_{X/Lac}$	คือ ผลได้ของเซลล์จากแลกโทส
	X_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์
	X_t	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลา t ใด ๆ
	Lac_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแลกโทส
	Lac_t	คือ ความเข้มข้นของแลกโทสที่เวลา t ใด ๆ

1.14 ผลได้ของทรีฮาโลสต่อแลกโทส

การประมาณค่าผลได้ของทรีฮาโลสต่อแลกโทส ($Y_{Tre/Lac}$) มีค่าเท่ากับอัตราส่วนระหว่างปริมาณทรีฮาโลสที่เกิดขึ้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อปริมาณแลกโทส (กรัมต่อลิตร) ที่ถูกใช้ไป ดังสมการ

$$Y_{Tre/Lac} = \frac{Tre_t - Tre_0}{Lac_0 - Lac_t}$$

เมื่อ	$Y_{Tre/Lac}$	คือ ผลได้ของทรีฮาโลสต่อแลกโทส
	Tre_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของทรีฮาโลส
	Tre_t	คือ ความเข้มข้นของทรีฮาโลสที่เวลา t ใด ๆ
	Lac_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแลกโทส
	Lac_t	คือ ความเข้มข้นของแลกโทสที่เวลา t ใด ๆ

1.15 ผลได้ของทรีฮาโลสต่อเซลล์

การประมาณค่าผลได้ของทรีฮาโลสต่อเซลล์ ($Y_{Tre/X}$) มีค่าเท่ากับอัตราส่วนระหว่างปริมาณทรีฮาโลสที่เกิดขึ้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ที่ถูกใช้ไป ดังสมการ

$$Y_{Tre/X} = \frac{Tre_t - Tre_0}{X_t - X_0}$$

เมื่อ	$Y_{Tre/X}$	คือ ผลได้ของทรีฮาโลสต่อเซลล์
	Tre_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของทรีฮาโลส
	Tre_t	คือ ความเข้มข้นของทรีฮาโลสที่เวลา t ใด ๆ
	X_0	คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์
	X_t	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลา t ใด ๆ

2. การคำนวณในการออกแบบโดยวิธีทะกัจ (Roy, 2001)

2.1 อัตราส่วน S/N

$$\text{S/N ratio} = -10 \log (\text{MSD})$$

2.2 ค่ากลางเบี่ยงเบนมาตรฐาน (MSD)

Bigger is better;

$$\text{MSD} = \frac{\sum \left(\frac{1}{y^2} \right)}{N}$$

Smaller is better;

$$\text{MSD} = \frac{\sum (y)^2}{N}$$

Nominal is bestter;

$$\text{MSD} = \frac{\sum (y - y_0)^2}{N}$$

หมายเหตุ y คือ ผลการทดลอง

y_0 คือ ผลการทดลองที่กำหนด

N คือ จำนวนการทดลอง

2.3 เปอร์เซนต์อิทธิพลหลัก (%Main effect)

$$\% \text{Main effect} = \frac{(\text{Max} - \text{Min})}{\text{Max}} \times 100$$

2.4 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N-1}}$$

2.5 ค่า Factor sum of square (SS_{Factor})

$$SS_{Factor} = \frac{N \times r}{L} \sum_{k=1}^L (\bar{y}_k - \bar{y})^2$$

2.6 ค่า Error sum of square (SS_{Error})

$$SS_{Error} = \sum (SD)^2 \times (r-1)$$

2.7 ค่าองศาอิสระของแฟกเตอร์ (DOF_{Factor})

$$DOF_{Factor} = (L-1)$$

2.8 ค่าองศาอิสระของข้อผิดพลาด (DOF_{Error})

$$DOF_{Error} = N(r-1)$$

2.9 ค่าองศาอิสระรวม (DOF_{Total})

$$DOF_{Total} = (N \times r) - 1$$

2.10 ค่าความแปรปรวน (Variance, Var)

$$\text{Var} = \frac{SS}{DOF}$$

2.11 ค่าสัดส่วนความแปรปรวน (Variance ratio, F_{ratio})

$$F_{ratio} = \frac{\text{Var}}{\text{Var}_{Error}}$$

2.12 ค่าความน่าเชื่อมั่น (Confidence)

$$\text{Confidence} = 100 - F_{DIST}(F_{ratio}, DOF_{Factor}, DOF_{Error}) \times 100$$

2.13 การหาค่าผลการทดลองที่คาดไว้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Result expected at optimum condition, Y_{opt})

2.13.1 พิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N

$$Y_{opt} = \overline{T1} + (\overline{A1} - \overline{T1}) + (\overline{B3} - \overline{T1}) + (\overline{C1} - \overline{T1}) + (\overline{D3} - \overline{T1})$$

$$Y_{opt} = \overline{T2} + (\overline{A2} - \overline{T2}) + (\overline{B3} - \overline{T2}) + (\overline{C1} - \overline{T2}) + (\overline{D2} - \overline{T2})$$

2.13.2 พิจารณาจากค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง

$$Y_{opt} = \overline{T2} + (\overline{A1} - \overline{T2}) + (\overline{B3} - \overline{T2}) + (\overline{C1} - \overline{T2}) + (\overline{D3} - \overline{T2})$$

$$Y_{opt} = \overline{T1} + (\overline{A2} - \overline{T1}) + (\overline{B3} - \overline{T1}) + (\overline{C1} - \overline{T1}) + (\overline{D2} - \overline{T1})$$

2.14 การประมาณค่า $Y_{expected}$

$$Y_{expected} = (\text{MSD})^{\frac{1}{2}}$$

หมายเหตุ FDIST เป็นค่าที่คำนวณโดยใช้ฟังก์ชันสำเร็จรูปในโปรแกรม Excel โดยเป็น

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า F_{ratio} , DOF_{Factor} , DOF_{Error}

$\bar{y}$, y , N , r , L และ k คือ ผลการทดลองค่าเฉลี่ยของการทดลอง ผลการทดลอง

จำนวนการทดลอง จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง จำนวนระดับของปัจจัย ระดับของปัจจัย

$\bar{T1}$ และ $\bar{T2}$ คือ ผลรวมทั้งหมดของค่าอัตราส่วน S/N เฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง และ

ผลรวมทั้งหมดของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นทริฮาโลสที่ได้จากการทดลอง ตามลำดับ

A1, A2, B3, C1, D2 และ D3 คือ ค่าเฉลี่ยของผลรวมของการทดลองของแต่ละระดับ

ของปัจจัยที่เหมาะสมที่ได้

3. การคำนวณหาอัตราส่วนของการใช้คาร์บอน (Carbon recovery, R_C)

ตารางผนวกที่ ข1 แสดงสูตรทางเคมีและน้ำหนักโมเลกุลของสารที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในสถานะที่มีการปรับพีเอช ซึ่งจะถูกนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณคาร์บอน (α) ของสารแต่ละตัว ดังสมการ

$$\text{ปริมาณคาร์บอน } (\alpha) \text{ (กรัมต่อกรัม)} = \frac{\text{จำนวนคาร์บอน} \times \text{มวลอะตอมของคาร์บอน}}{\text{น้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล)}}$$

เนื่องจากทริฮาโลสเป็นสารที่เชื้อผลิตขึ้นแล้วสะสมไว้ภายในเซลล์ ดังนั้นจึงสามารถคำนวณหา Residual biomass ได้จากผลต่างของความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์กับความเข้มข้นของทริฮาโลส และในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการวัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอยู่ในระบบ จึงคำนวณค่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น โดยการพิจารณาจากวิธีการผลิตกรดพริกฟิโอนิกจากกลูโคสของแบคทีเรียพริกฟิโอนิก ซึ่งปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์จะมีค่าเท่ากับปริมาณแอมโมเนีย ดังแสดงตามสมการ (Moat *et al.*, 2002)



เนื่องจากไม่ทราบสูตรทางเคมีของเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 จึงใช้สูตรเฉลี่ยทั่วไปทางเคมีของเซลล์ คือ $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ (สาโรจน์ และคณะ, 2544) โดยคิดเป็นน้ำหนักโมเลกุลของ Residual biomass ได้เท่ากับ 24.6 กรัมต่อโมล

ตารางผนวกที่ ข1 สูตรทางเคมีและน้ำหนักโมเลกุลของสารที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในสภาวะที่มีการปรับพีเอช

สาร	สูตรทางเคมี	น้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล)
แลกโทส	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	342.30
ทรีฮาโลส	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	342.31
กรดพรอพิโอนิก	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$	74.08
กรดแอซีติก	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	60.05
กรดซักซินิก	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	118.09
คาร์บอนไดออกไซด์	CO_2	44.01

ที่มา: สาโรจน์ และคณะ (2544); Richards *et al.* (2002); Wikipedia (2014a, 2014b, 2014c)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในอาหาร Complete medium ที่สถานะความเข้มข้นแลกโทส 20 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 80 รอบต่อนาที ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีค่าเท่ากับ 7 สามารถแสดงคุณสมบัติของคาร์บอนได้ดังนี้

$$\alpha_1 q_{Lac} = \alpha_2 \mu_R + \alpha_3 q_{Tre} + \alpha_4 q_{Pro} + \alpha_5 q_{Ace} + \alpha_6 q_{Suc} + \alpha_7 q_{CO2}$$

เมื่อ	α_1	คือ ปริมาณคาร์บอนของแลกโทส (กรัมคาร์บอนต่อกรัมแลกโทส)
	α_2	คือ ปริมาณคาร์บอนของ Residual biomass (กรัมคาร์บอนต่อกรัม Residual biomass)
	α_3	คือ ปริมาณคาร์บอนของทรีฮาโลส (กรัมคาร์บอนต่อกรัมทรีฮาโลส)
	α_4	คือ ปริมาณคาร์บอนของกรดพรอพิโอนิก (กรัมคาร์บอนต่อกรัมกรดพรอพิโอนิก)
	α_5	คือ ปริมาณคาร์บอนของกรดแอซิดิก (กรัมคาร์บอนต่อกรัมกรดแอซิดิก)
	α_6	คือ ปริมาณคาร์บอนของกรดซักซินิก (กรัมคาร์บอนต่อกรัมกรดซักซินิก)
	α_7	คือ ปริมาณคาร์บอนของคาร์บอนไดออกไซด์ (กรัมคาร์บอนต่อกรัมคาร์บอนไดออกไซด์)
	q_{Lac}	คือ อัตราจำเพาะของการใช้แลกโทส (กรัมแลกโทสต่อกรัม Residual biomass ต่อชั่วโมง)
	μ_R	คือ อัตราการเจริญจำเพาะของ Residual biomass (ต่อชั่วโมง)
	q_{Tre}	คือ อัตราจำเพาะของการผลิตทรีฮาโลส (กรัมทรีฮาโลสต่อกรัม Residual biomass ต่อชั่วโมง)
	q_{Pro}	คือ อัตราจำเพาะของการผลิตกรดพรอพิโอนิก (กรัมกรดพรอพิโอนิกต่อกรัม Residual biomass ต่อชั่วโมง)
	q_{Ace}	คือ อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซิดิก (กรัมกรดแอซิดิกต่อกรัม Residual biomass ต่อชั่วโมง)
	q_{Suc}	คือ อัตราจำเพาะของการผลิตกรดซักซินิก (กรัมกรดซักซินิกต่อกรัม Residual biomass ต่อชั่วโมง)
	q_{CO2}	คือ อัตราจำเพาะของการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัม Residual biomass ต่อชั่วโมง)

จากสมการของการคูลคาร์บอนสามารถแสดงอัตราส่วนของการใช้คาร์บอน (Carbon recovery, R_C) ได้ดังนี้

$$R_c = \frac{\alpha_2 \mu_R + \alpha_3 q_{Tre} + \alpha_4 q_{Pro} + \alpha_5 q_{Ace} + \alpha_6 q_{Suc} + \alpha_7 q_{CO_2}}{\alpha_1 q_{Lac}} = 1$$

ตัวอย่างการคำนวณ

การคำนวณหาปริมาณคาร์บอนของแลกโทส (α_1)

$$\alpha_1 = \frac{12 \times 12}{342.30} = 0.42 \text{ กรัมคาร์บอนต่อกรัมแลกโทส}$$

การคำนวณหาปริมาณคาร์บอนของ Residual biomass (α_2)

$$\alpha_2 = \frac{12 \times 1}{24.6} = 0.49 \text{ กรัมคาร์บอนต่อกรัม Residual biomass}$$

การคำนวณหาปริมาณคาร์บอนของทรีฮาโลส (α_3)

$$\alpha_3 = \frac{12 \times 12}{342.31} = 0.42 \text{ กรัมคาร์บอนต่อกรัมทรีฮาโลส}$$

การคำนวณหาอัตราส่วนของการใช้คาร์บอนของการเพาะเลี้ยงเชื้อในช่วงที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1 (ข) และการเพาะเลี้ยงเชื้อในช่วงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1 (ค1)

$$\begin{aligned} R_c(\text{ข}) &= ((0.49 \times 0.014) + (0.42 \times 0.0009) + (0.49 \times 0.031) + \\ &\quad (0.40 \times 0.014) + (0.41 \times 0.003) + (0.27 \times 0.014)) \div (0.42 \times 0.084) \\ &= 0.9365 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R_c(\text{ค1}) &= ((0.49 \times 0.004) + (0.42 \times 0.0042) + (0.49 \times 0.021) + \\ &\quad (0.40 \times 0.015) + (0.41 \times 0.001) + (0.27 \times 0.015)) \div (0.42 \times 0.057) \\ &= 1.0223 \end{aligned}$$



1. การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งด้วยเครื่องสเปกโทโฟโตมิเตอร์ (ดัดแปลงมาจาก Coral *et al.*, 2008)

1.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

1.1.1 นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.1 - 1.0

1.1.2 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นแลกโทสและค่าพีเอชต่าง ๆ เป็น Blank

1.1.3 นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้ง

1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

1.2.1 เตรียมหลอดทดลองที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอนจำนวน 10 หลอด

1.2.2 งดตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

1.2.3 นำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

1.2.4 นำเซลล์ที่ได้มาล้างด้วยบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 จำนวน 2 ครั้ง

1.2.5 รินส่วนลอยทิ้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

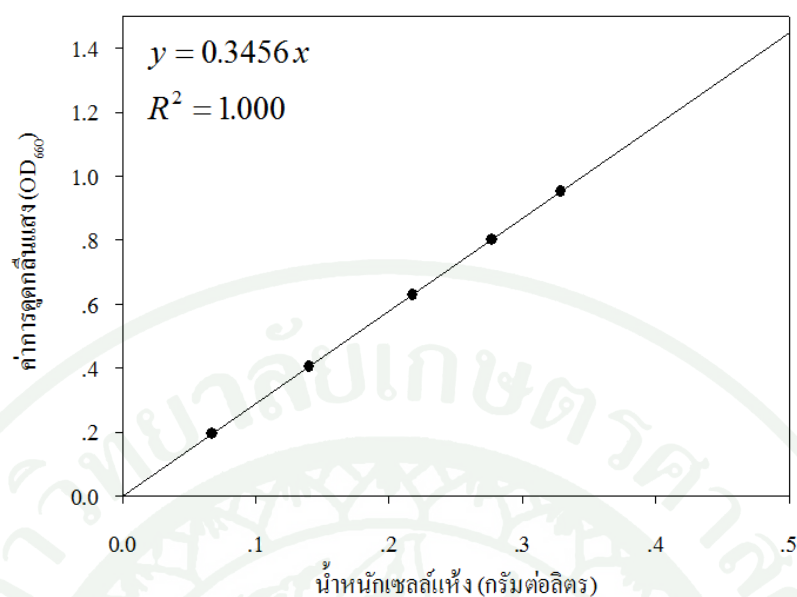
1.2.6 ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

1.2.7 คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นกรัมต่อลิตร ดังสมการ

$$C_x \text{ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดทดลองและเซลล์ (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดทดลอง (กรัม)}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$

1.2.8 นำส่วนของตัวอย่างเดียวกันมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นแลกโทสและค่าพีเอชต่าง ๆ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

1.2.9 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพผนวกที่ 11 เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณเซลล์แห้งของตัวอย่างที่หาจากค่าการดูดกลืนแสงแทนการหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยตรง



ภาพผนวกที่ ๑1 กราฟน้ำหมักเซลล์แห้งมาตรฐาน

2. การสกัดทรีฮาโลส (ดัดแปลงจาก Mahmud *et al.*, 2009)

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 เครื่องหมุนเหวี่ยง

2.1.2 เครื่องเขย่า

2.1.3 บัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟตความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0

2.1.4 กรดไตรคลอโรแอซิดิก (Trichloroacetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

2.2 วิธีการ

2.2.1 เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

2.2.2 นำส่วนเซลล์ที่ได้มาล้างด้วยบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟตความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 จำนวน 2 ครั้ง

2.2.3 นำเซลล์ที่ได้หลังจากล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟตมาสกัดทรีฮาโลสด้วยการเติมกรดไตรคลอโรแอซิดิก (Trichloroacetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

2.1.4 เมื่อครบกำหนดเวลานำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้

2.1.5 ทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง นำสารละลายส่วนใสจากการสกัดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มารวมกัน และนำไปทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นทริสาโลสต่อไป

3. การหาปริมาณทริสาโลสด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Zhu *et al.*, 2008)

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 High Performance Liquid Chromatography

3.1.2 คอลัมน์ Hypersil-NH₂ ขนาด 250 × 4.6 มิลลิเมตร (Thermo Electron Corporation)

3.1.3 RI detector

3.1.4 Recorder

3.1.5 สารละลายทริสาโลสมาตรฐานเตรียมโดยเจือจางทริสาโลสด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีความเข้มข้น 1.20 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 1.20 กรัมต่อลิตร

3.2 วิธีการ

3.2.1 ทำการเตรียมตัวอย่างโดยกรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร แล้วฉีดเข้าเครื่อง

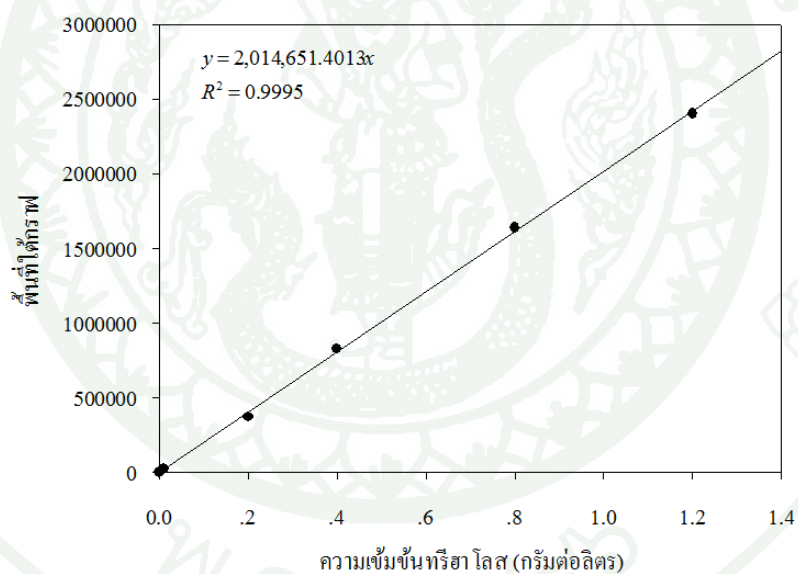
3.2.2 ใช้แอซีโทไนไทรล์ 75 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำปราศจากไอออน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ด้วยอัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.2.3 นำค่าที่ได้วิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐาน

$$\text{ความเข้มข้นทริสาโลส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้โครมาโทแกรมทริสาโลส}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

ตารางผนวกที่ ค1 การเตรียมสารละลายทรีฮาโลสมมาตรฐาน

สารละลายทรีฮาโลสมมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	สารละลายทรีฮาโลส (1.2 กรัมต่อลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำปราศจากไอออน (มิลลิลิตร)
0	0.00	3.00
0.01	0.04	4.96
0.2	0.83	4.17
0.4	1.67	3.33
0.8	3.33	1.67
1.2	5.00	0.00



ภาพผนวกที่ ค2 กราฟทรีฮาโลสมมาตรฐานที่ได้ภายหลังจากนิต HPLC

4. การหาปริมาณแล็กโทส กรดพรอพิโอนิก กรดแอซีติก และกรดซักซินิกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Zeidan and Niel, 2010)

4.1 อุปกรณ์และสารเคมี

4.1.1 High Performance Liquid Chromatography

4.1.2 คอลัมน์ Aminex HPX-87H ขนาด 350×7.8 มิลลิเมตร (Bio-Rad)

4.1.3 RI detector สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นแลกโทส

4.1.4 UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดพอร์ฟิโอนิก กรดแอสซิดิก และกรดซัคซินิก

4.1.5 Recorder

4.1.6 สารละลายแลกโทสมาตรฐานเตรียมโดยเจือจางแลกโทสด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 25.0 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 25.0 กรัมต่อลิตร

4.1.7 สารละลายกรดพอร์ฟิโอนิกมาตรฐานเตรียมโดยเจือจางกรดพอร์ฟิโอนิกด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 10.0 กรัมต่อลิตร

4.1.8 สารละลายกรดแอสซิดิกมาตรฐานเตรียมโดยเจือจางกรดแอสซิดิกด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 6.0 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 6.0 กรัมต่อลิตร

4.1.9 สารละลายกรดซัคซินิกมาตรฐานเตรียมโดยเจือจางกรดซัคซินิกด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 1.5 กรัมต่อลิตร

4.2 วิธีการ

4.2.1 ทำการเตรียมตัวอย่างโดยกรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร แล้วฉีดเข้าเครื่อง

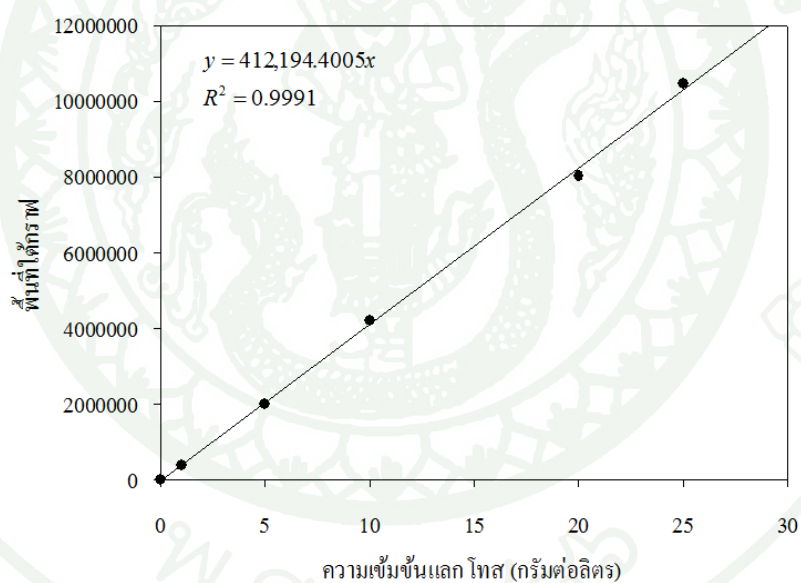
4.2.2 ใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในน้ำปราศจากไอออนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ด้วยอัตราเร็ว 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

4.2.3 นำค่าที่ได้วิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐาน

$$\text{ความเข้มข้นแลกโทส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้โครมาโทแกรมแลกโทส}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

ตารางผนวกที่ ค2 การเตรียมสารละลายแล็กโทสมาตรฐาน

สารละลายแล็กโทสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	สารละลายแล็กโทส (25.0 กรัมต่อลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำปราศจากไอออน (มิลลิลิตร)
0	0.00	5.00
1.0	0.20	4.80
5.0	1.00	4.00
10.0	2.00	3.00
20.0	4.00	1.00
25.0	5.00	0.00

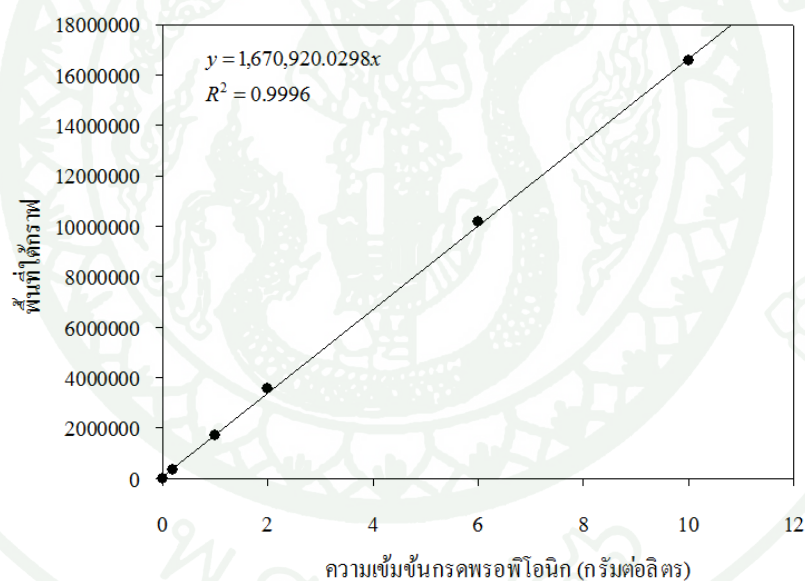


ภาพผนวกที่ ค3 กราฟแล็กโทสมาตรฐานที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC

$$\text{ความเข้มข้นกรดพรีโอนิก (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้โครมาโทแกรมกรดพรีโอนิก}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

ตารางผนวกที่ ค3 การเตรียมสารละลายกรดพริกอินิกมาตรฐาน

สารละลายกรดพริกอินิกมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	สารละลายกรดพริกอินิก (มิลลิลิตร) (10.0 กรัมต่อลิตร)	น้ำปราศจากไอออน (มิลลิลิตร)
0	0.00	5.00
0.2	0.10	4.90
1.0	0.50	4.50
2.0	1.00	4.00
6.0	3.00	2.00
10.0	5.00	0.00

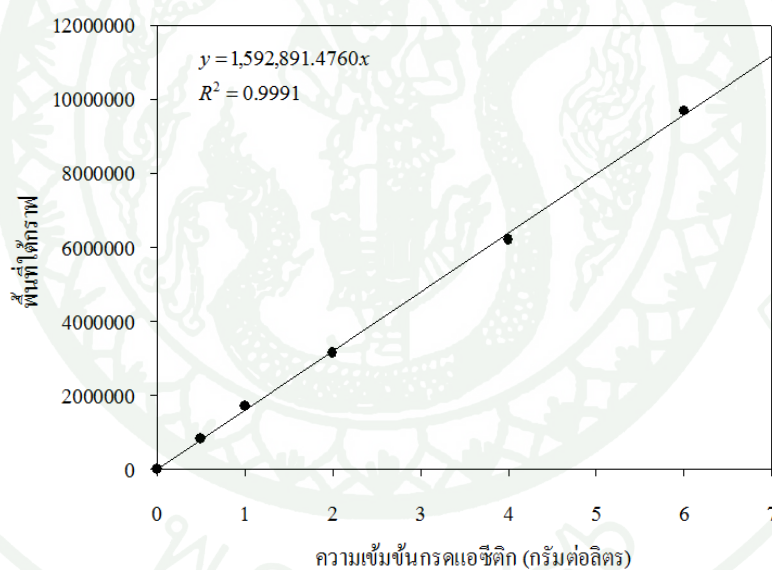


ภาพผนวกที่ ค4 กราฟกรดพริกอินิกมาตรฐานที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC

$$\text{ความเข้มข้นกรดแอซิดิก (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้โครมาโทแกรมกรดแอซิดิก}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

ตารางผนวกที่ ค4 การเตรียมสารละลายกรดแอซีติกมาตรฐาน

สารละลายกรดแอซีติกมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	สารละลายกรดแอซีติก (6.0 กรัมต่อลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำปราศจากไอออน (มิลลิลิตร)
0	0.00	5.00
0.5	0.42	4.58
1.0	0.83	4.17
2.0	1.67	3.33
4.0	3.33	1.67
6.0	5.00	0.00

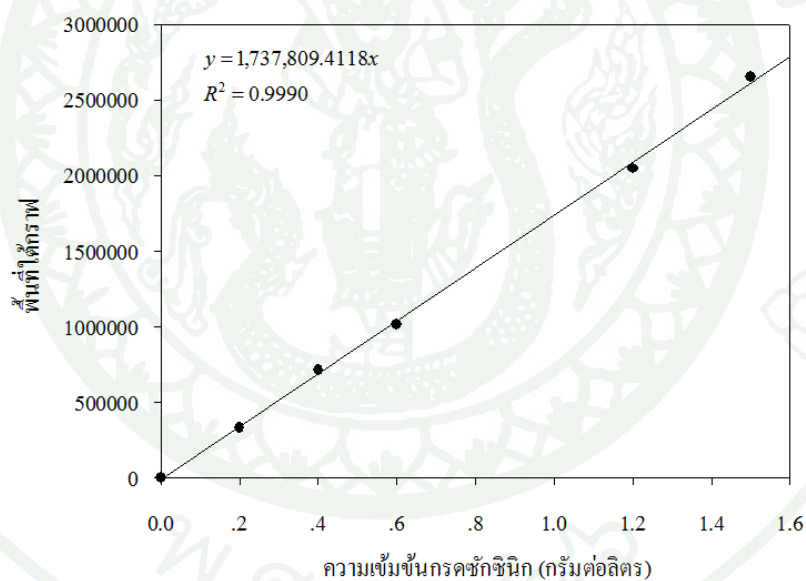


ภาพผนวกที่ ค5 กราฟกรดแอซีติกมาตรฐานที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC

$$\text{ความเข้มข้นกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้โครมาโทแกรมกรดแอซีติก}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

ตารางผนวกที่ ค5 การเตรียมสารละลายกรดซัลฟอนิกมาตรฐาน

สารละลายกรดซัลฟอนิกมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	สารละลายกรดซัลฟอนิก (1.5 กรัมต่อลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำปราศจากไอออน (มิลลิลิตร)
0	0.00	5.00
0.2	0.67	4.33
0.4	1.33	3.67
0.6	2.00	3.00
1.2	4.00	1.00
1.5	5.00	0.00



ภาพผนวกที่ ค6 กราฟกรดซัลฟอนิกมาตรฐานที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC



ภาคผนวก ง
การประมาณค่าพารามิเตอร์ด้วยโปรแกรม Berkeley Madonna

การเลียนแบบการกระบวนการหมักของการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในสถานะที่มีการปรับพีเอช

ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโต และการผลิตทรีฮาโลส โดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในสถานะที่มีการปรับพีเอชถูกนำมาใช้ในการเลียนแบบกระบวนการหมัก โดยทำการเลียนแบบกระบวนการหมักในช่วงสถานะที่ควบคุมพีเอช 5.5 ช่วงที่ 1 และช่วงสถานะที่ควบคุมพีเอช 7.0 ช่วงที่ 1 ด้วยโปรแกรม Berkeley Madonna แสดงดังภาพผนวกที่ ง1 และภาพผนวกที่ ง2 โดยโมเดลที่นำมาใช้ในการประมาณค่าพารามิเตอร์ ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการประมาณค่า และผลที่ได้จากการเลียนแบบด้วยโปรแกรม Berkeley Madonna แสดงไว้ในตารางผนวกที่ ง1 และภาพผนวกที่ ง3 ตามลำดับ

```

METHOD RK4

STARTTIME = 52
STOPTIME=114
DT = 2

UM = 0.1705           ; Constant
KS = 190.5655
K1 = 0.066            ; The yield of product from residual biomass (g trehalose/g residual biomass)
K2 = 5.5674          ; The inverse of the growth yield from lactose (g lactose/g residual biomass)
K3 = 0.0842           ; The specific rate of lactose consumption (g lactose/g residual biomass.h)

R0 = 0.786            ; Initial
X0 = R0+P0
S0 = 19.709
P0 = 0.004

INIT R = R0
INIT X = X0
INIT S = S0
INIT P = P0

R' = RR               ; Balance equation
X' = RR+RP
S' = RS
P' = RP

U = UM*S/(KS+S)       ; Monod equation
RR = U*R              ; Rate equation
RS = -((K2*RR)+(K3*R))
RP = K1*RR
Limit S>= 15.619
  
```

ภาพผนวกที่ ง1 การเขียนโปรแกรมในการทำ Curve fit ในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1

```

METHOD RK4

STARTTIME = 114.5
STOPTIME=192
DT = 2

UM = 0.025176      ; Constant
KS = 46.83165
K1 = 0.345988      ; The yield of product from residual biomass (g trehalose/g residual biomass)
K2 = 0.004185      ; The specific rate of product formation (g trehalose/g residual biomass.h)
K3 = 12.19393      ; The inverse of the growth yield from lactose (g lactose/g residual biomass)
K4 = 0.057086      ; The specific rate of lactose consumption (g lactose/g residual biomass.h)

R0 = 2.165          ; Initial
X0 = R0+P0
S0 = 17.065
P0 = 0.085

INIT R = R0
INIT X = X0
INIT S = S0
INIT P = P0

R' = RR              ; Balance equation
X' = RR+RP
S' = RS
P' = RP

U = UM*S/(KS+S)      ; Monod equation
RR = U*R             ; Rate equation
RS = -((K3*RR)+(K4*R))
RP = (K1*RR)+(K2*R)
Limit S>= 6.120

```

ภาพผนวกที่ 2 การเขียนโปรแกรมในการทำ Curve fit ในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1

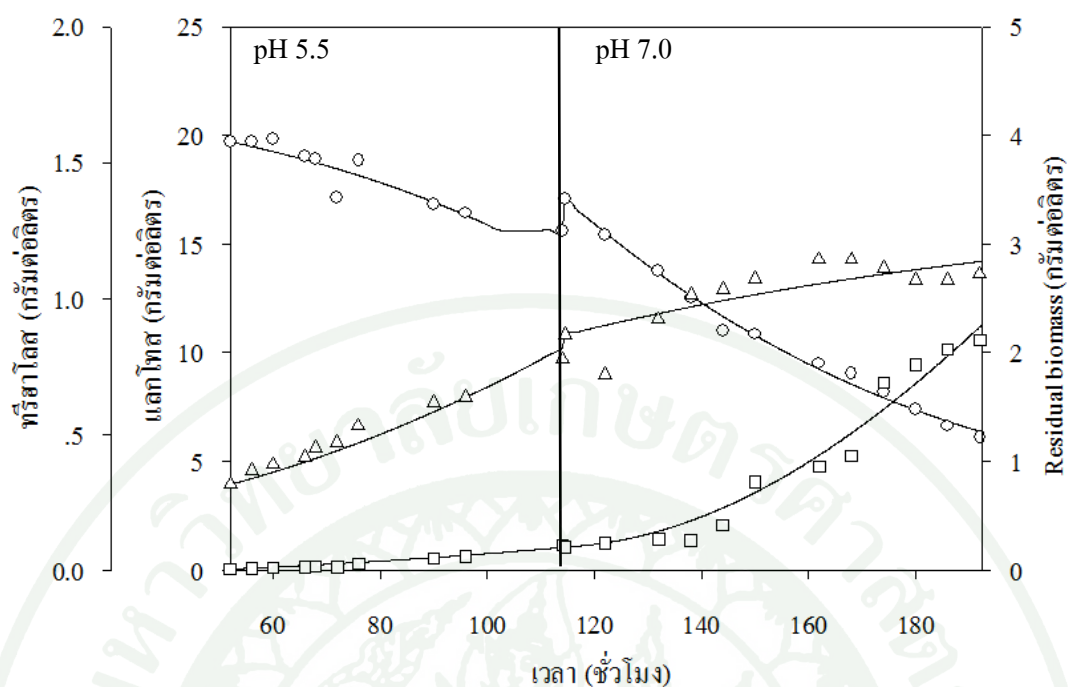
จากผลของการทำ Curve fit ด้วยโปรแกรม Berkeley Madonna กับผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าสมการที่นำมาใช้อธิบายมีความเหมาะสมเฉพาะใช้อธิบายในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1 โดยค่าพารามิเตอร์ที่ประเมินได้ค่อนข้างสอดคล้องกับค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากผลการทดลอง แต่เมื่อพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ที่ประเมินได้ในช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1 จะเห็นได้ว่าค่าพารามิเตอร์บางค่ามีค่าเกินจริง และมีค่าติดลบ จึงแสดงให้เห็นว่าสมการที่นำมาใช้อธิบายผลการทดลองอาจจะยังไม่เหมาะสมเพียงพอ ซึ่งอาจจะมีผลของปัจจัยอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้องอีก

ตารางผนวกที่ ๑1 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1 และช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1 ที่ได้จากการทำ Curve fit ด้วยโปรแกรม Berkeley Madonna

โมเดล	พารามิเตอร์	ช่วงการเพาะเลี้ยง	
		ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1	ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1
$\frac{dR}{dt} = \left(\frac{\mu_m \times S}{K_s + S}\right) \times R$	อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_m , ต่อชั่วโมง) ค่าคงที่ของโมนอด (K_s , กรัมต่อลิตร) R^2	0.143 144.608 0.975	537.408 1.659×10^6 0.725
$\frac{dS}{dt} = -((K3 \times RR) + (K4 \times R))$	ส่วนกลับของผลได้ Residual biomass จากแลกโทส ($K3$, กรัมแลกโทสต่อกรัม Residual biomass) อัตราจำเพาะของการใช้แลกโทส ($K4$, กรัมแลกโทส ต่อกรัม Residual biomass ต่อชั่วโมง) R^2	0.094 0.065 0.935	20.763 - 0.017 0.994
$\frac{dP}{dt} = (K1 \times RR) + (K2 \times R)$	ผลได้ของทรีฮาโลสจาก Residual biomass ($K1$, กรัมทรีฮาโลสต่อกรัม Residual biomass) อัตราจำเพาะของการผลิตทรีฮาโลส ($K2$, กรัมทรีฮาโลส ต่อกรัม Residual biomass ต่อชั่วโมง) R^2	0.063 - 0.982	- 1.737 0.010 0.976

หมายเหตุ R , S และ P คือ ความเข้มข้น Residual biomass, ความเข้มข้นแลกโทส และความเข้มข้นทรีฮาโลส ตามลำดับ

RR คือ อัตราการผลิต Residual biomass เชิงปริมาตร



ภาพผนวกที่ 3 การผลิตทรีฮาโลสโดยเชื้อ *P. acidipropionici* DSM 20273 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 ช่วงที่ 1 (ช่วงการหมักที่เวลา 52 - 114 ชั่วโมง) และช่วงการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ช่วงที่ 1 (ช่วงการหมักที่เวลา 114.5 - 192 ชั่วโมง): ความเข้มข้นทรีฮาโลส (◇) แล็กโทส (○) และ Residual biomass (△) กับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (เส้น)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุคนธ์ทิพย์ เลือเต่า
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 27 พฤศจิกายน 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดราชบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยศิลปากร
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์บัณฑิตวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2550