

จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาเพาะเลี้ยงในอาหารหางนมปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะตั้งนิ่ง (Dembczynski และ Jankowski, 2002) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นเวลา 432 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างตามข้อ 1.16

1.16 การวิเคราะห์

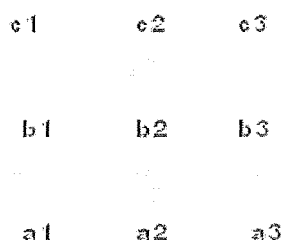
นำน้ำหมักมาวิเคราะห์ปริมาณกรดโพธิ์ฟอนิก น้ำตาลแลคโตสที่เหลือ และวัดค่าพีเอช โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดโพธิ์ฟอนิกด้วยเครื่อง HPLC (high-performance liquid chromatography) ใช้คอลัมน์ Inertsil C8-3 เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.7 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (Deionize water) และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (ประยุกต์จากญานี ลิตะนันท์. 2541) และวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสที่เหลือด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก ตามวิธีของ Dubois. 1956

1.17 ผลการทดลอง

1.17.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา

เมื่อตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ร้อยละ 3, 4 และ 5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสายยาง 0.89, 1.52 และ 2.02 มิลลิเมตร และปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3, 5 และ 7 จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาหมักในอาหารหางนมปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะตั้งนิ่ง เป็นเวลา 432 ชั่วโมง เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวัดปริมาณกรดโพธิ์ฟอนิก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 คือ ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ เพคตินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสายยาง 1.52 มิลลิเมตร และพบว่าเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 สามารถผลิตกรดโพธิ์ฟอนิกได้เท่ากับ 18.5 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 336 ชั่วโมง ดังตารางที่ 1.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 3, 4 และ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าเมื่อใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาความเข้มข้นร้อยละ 3 เม็ดเจลมีลักษณะเป็นรูปหยดน้ำ (รูปที่ 1.9) และเกิดการแตกได้ง่าย เนื่องจากมีการพอร์มเจลของแคลเซียมเพคเตตเจลที่ไม่สมบูรณ์ มีผลทำให้เซลล์สามารถรั่วไหลออกจากเม็ดเจลได้ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมามากกว่าร้อยละ 4 พบว่าเม็ดเจลมีลักษณะเป็นทรงกลม (รูปที่ 1.9) และมีความแข็งแรงขึ้น แต่พบปัญหาเรื่องความสามารถในการแพร่และการกระจายตัวของเซลล์เกิดขึ้น ทำให้เซลล์ภายในเม็ดเจลได้รับอาหารไม่เพียงพอ เนื่องจากการแพร่ผ่านของอาหารเป็นไปได้ยาก จึงทำให้ความสามารถในการผลิตกรดโพธิ์ฟอนิกลดลง และพบว่าการใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา

ความเข้มข้นร้อยละ 4 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ และเม้ดเจลมีความคงตัวไม่เปลี่ยนรูปในระหว่างการทดลอง ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับการนำมาตรึงเซลล์



รูปที่ 1.9 แสดงผลการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูงเขมาที่ความเข้มข้นต่างๆ ($a1-a3 = 3\%$, $b1-b3 = 4\%$ และ $c1-c3 = 5\%$) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง ที่ขนาดต่างๆ ($a1, b1, c1 = 2.02$ มม., $a2, b2, c2 = 1.52$ มม. และ $a3, b3, c3 = 0.89$ มม.)

สำหรับผลการศึกษาปริมาณของเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3, 5 และ 7 (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อการเพิ่มการผลิตกรดและ เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นจนถึงร้อยละ 5 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุด อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากกว่าร้อยละ 5 ไม่ส่งผลให้การผลิตกรดโพรพิโอนิกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากข้อจำกัด (substrate limitation) เนื่องจากเซลล์ภายในเม้ดเจลเกิดการแย่งอาหารเพื่อนำไปใช้สำหรับการเจริญและการผลิตกรดโพรพิโอนิก

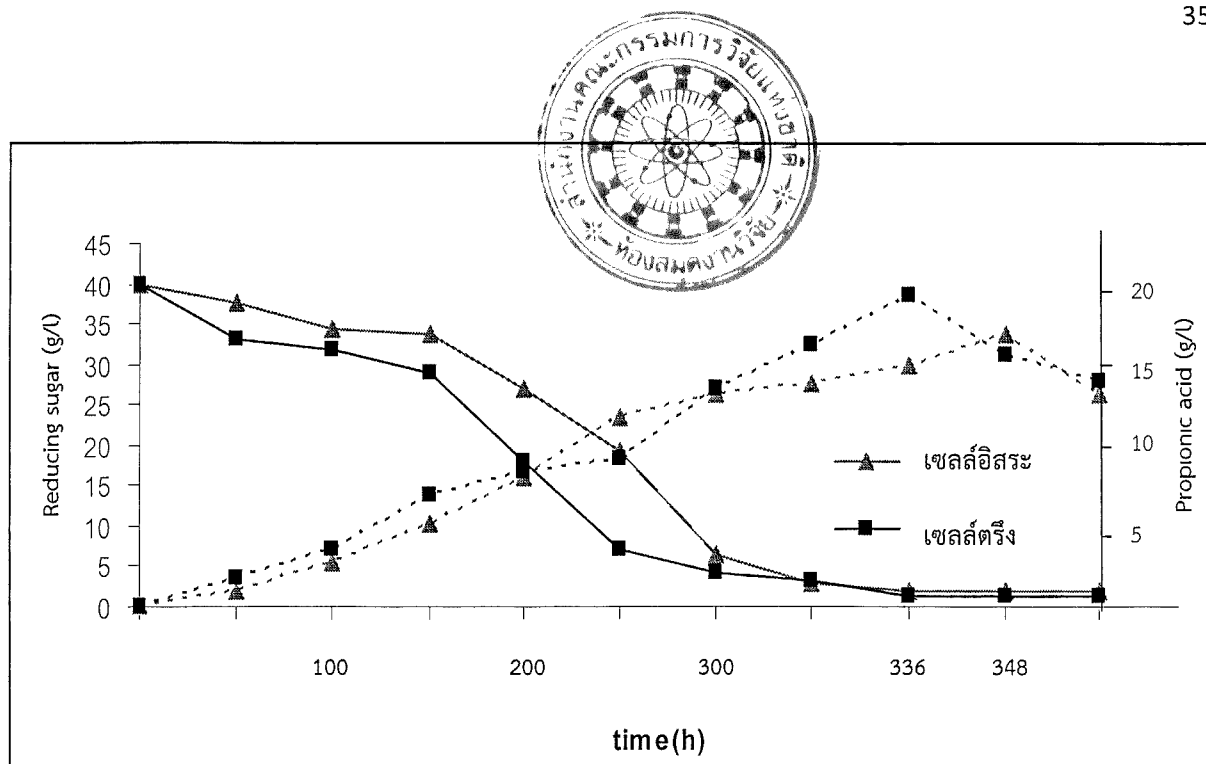
สำหรับผลการศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 0.89, 1.52 และ 2.02 มิลลิเมตร ซึ่งขนาดของสายยางมีผลต่อขนาดของเม้ดเจล พบว่าการใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 2.02 มิลลิเมตร ทำให้เกิดเม้ดเจลขนาดใหญ่ (รูปที่ 1.9) ไม่ส่งผลให้การผลิตกรดโพรพิโอนิกเพิ่มมากขึ้น แต่ในขณะที่การใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยางที่มีขนาดเล็กทำให้เกิดเม้ดเจลขนาดเล็ก (รูปที่ 1.9) ทำให้เม้ดเจลมีพื้นที่ผิวมากขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลของสารอาหารสามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในเม้ดเจลได้เร็วกว่าเม้ดเจลที่มีขนาดใหญ่

Table 1.4 Effect of pectin concentration, innerdiameter of silicone tube and inoculum for immobilization on propionic acid production by immobilized *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

Pectin concentration (%) (A)	Innoculum (%) (B)	Innerdiameter of silicone tube (mm) (C)		
		0.89 (c ₁)	1.52 (c ₂)	2.02 (c ₃)
3 (a ₁)	3 (b ₁)	13.04 ^{jk}	13.61 ^k	12.09 ^l
	5 (b ₂)	14.58 ^e	14.82 ^f	13.60 ^g
	7 (b ₃)	15.97 ^{bc}	15.10 ^{cd}	14.41 ^e
4 (a ₂)	3 (b ₁)	14.56 ^g	14.78 ^g	13.07 ^{ij}
	5 (b ₂)	17.86 ^a	18.50 ^a	16.23 ^d
	7 (b ₃)	17.94 ^a	16.76 ^b	15.92 ^{bc}
5 (a ₃)	3 (b ₁)	13.4 ^h	13.69 ^{hi}	12.17 ^k
	5 (b ₂)	14.04 ^{cd}	14.73 ^d	13.70 ^f
	7 (b ₃)	14.32 ^d	14.62 ^e	13.99 ^e

Value with different letters are significantly different (p<0.05)

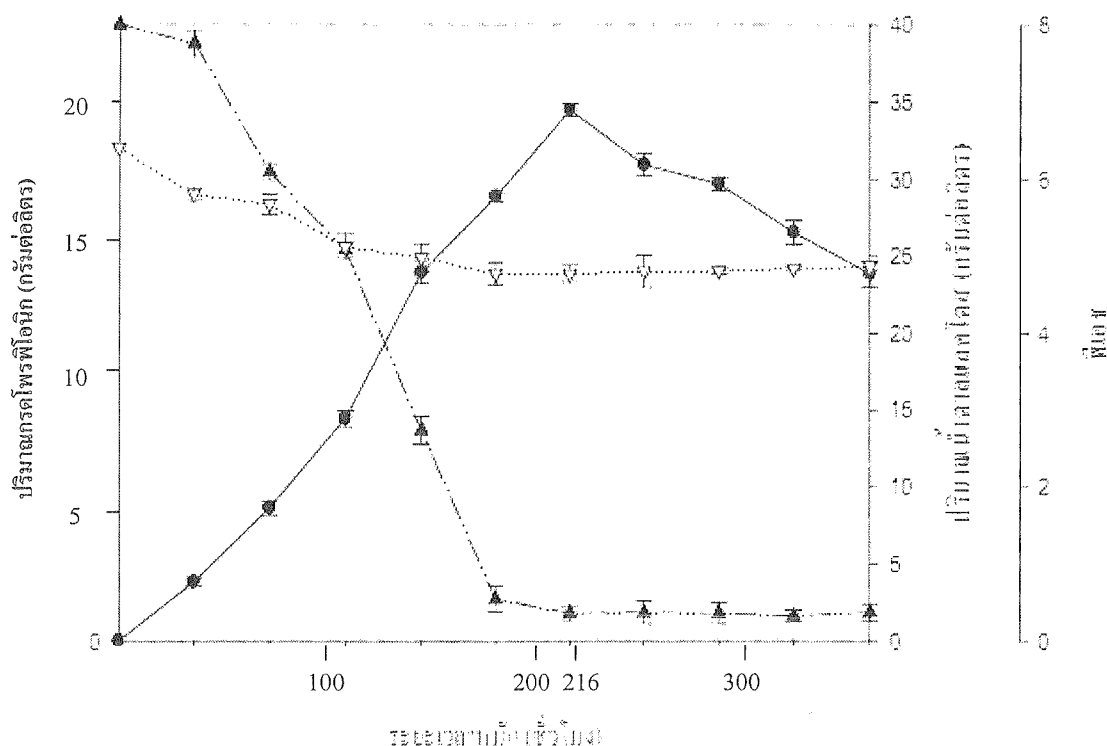
เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกกับเซลล์อิสระของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารหางนม ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนี้ ระยะเวลาในการหมัก 432 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าเซลล์อิสระสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เท่ากับ 16.88 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 348 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 1.10 การที่เซลล์อิสระสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้น้อยกว่าเซลล์ตรึง เนื่องจากเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น การผลิตกรดโพรพิโอนิกจะมีความเข้มข้นมากขึ้นด้วย ส่งผลให้กรดโพรพิโอนิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (product inhibition) ทำให้ความสามารถของเชื้อในรูปเซลล์อิสระสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้น้อยลง แต่ในขณะที่เซลล์ตรึงมีสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูเซมาเป็นวัสดุตรึงที่ช่วยปกป้องตัวเซลล์จากน้ำหมัก อีกทั้งสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรูเซมายังมีคุณสมบัติทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้ดี จึงส่งผลให้สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพิ่มขึ้น



รูปที่ 1.10 แสดงปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง ในอาหารหางนม ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

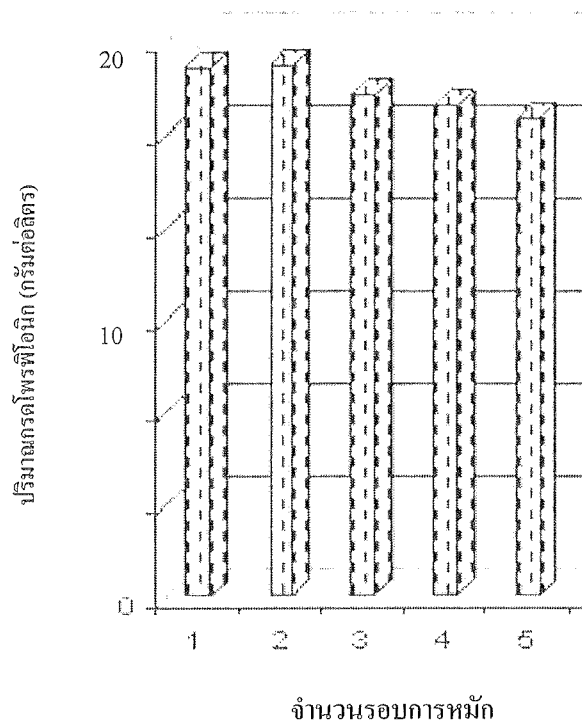
1.17.2 ศึกษาศักยภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารพอลิเมอร์จากใบกรูงเขมาโดยการนำกลับมาใช้ใหม่ (cell recycle) เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดพอลิเมอร์จากใบกรูงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เมื่อใช้สภาวะดังกล่าวในการผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมัก พบว่าสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 20.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระซึ่งสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 19.24 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เช่นกัน และเมื่อศึกษาการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ พบว่าสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้ 5 รอบการหมัก



รูปที่ 1.11 แสดงปริมาณกรดไพรูวิกที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมาในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที

ผลการศึกษาศักยภาพของเซลล์ตรึงด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที (เนื่องจากที่เวลา 216 ชั่วโมงของการหมักน้ำตาลแลคโตสมีการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดไพรูวิกติดเพิ่มสูงขึ้นสูงสุด หลังจากนั้นการผลิตกรดไพรูวิกจะค่อยๆ ลดลง และปริมาณน้ำตาลแลคโตสเหลือน้อยมากจนเกือบหมด) หลังจากทุกๆ รอบการหมักที่ 216 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเวย์ที่ใช้ในการหมัก และทำซ้ำโดยใช้อาหารเวย์ใหม่หลังจากล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ พบว่าสามารถผลิตกรดไพรูวิกได้สูงสุด 20.5 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.595 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ 0.552 กรัมต่อกรัม แสดงดังรูปที่ 1.11 จากผลการทดลองพบว่าสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 5 รอบการหมัก แสดงดังรูป 1.12 และตารางที่ 1.5 แต่เมื่อสิ้นสุดการหมักรอบที่ 5 เม็ดเจลมีการแตกและละลายตัวเกือบทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถหมักรอบต่อไปได้อีก และเมื่อพิจารณาการผลิตกรดไพรูวิก พบว่าอัตราการผลิตกรดไพรูวิกลดลงเรื่อยๆ เมื่อจำนวนรอบในการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากเซลล์อาจเกิดการเสื่อมสภาพ (cell degeneration) เซลล์อ่อนแอ (inactivated cells) และความเสื่อมสภาพของเม็ดเจล ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดไพรูวิกลดลง



รูปที่ 1.12 แสดงจำนวนรอบของการหมักกรดโพรพิโอนิกของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ

ตารางที่ 1.5 แสดงจำนวนรอบของการหมักกรดโพรพิโอนิก อัตราการผลิต และผลได้ของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ

จำนวนรอบการหมัก	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลได้ (กรัมต่อลิตร)
1	20.50	0.593	0.543
2	20.50	0.595	0.552
3	19.05	0.451	0.509
4	18.87	0.434	0.489
5	18.43	0.419	0.473