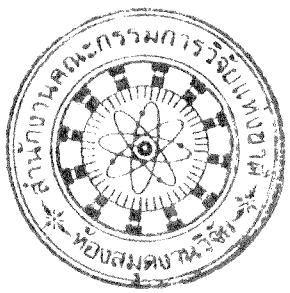
องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเอาเฉพาะส่วนใสมาเติมหัวเชื้อ *L. acidoilus* และเติมเชื้อยีสต์ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 30–33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง

Fitzpatrick และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *L. casei* โดยเติมยีสต์ สกัด มอลต์ และถั่ว เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

Panesar และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยเชื้อ *L. casei* พบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มสูง (ร้อยละ94.37) ให้เป็นกรดแลคติก (32.95 กรัมต่อลิตร)

1.9 อุปกรณ์และวิธีการ



1.9.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

กระบอกตวง (cylinder)ของบริษัท PYREX^{R}

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX^{R}

คิวเวต (cuvette)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

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

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่นLIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องเขย่าของบริษัท Gallenkamp

เครื่องอบร้อนของบริษัท Binder

ตู้เย็นอุณหภูมิ -83 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO รุ่น MDF-U 4086S

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkampตู้เขี่ยเชื้อ (lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

โถดูดความชื้น

บีกเกอร์ (beaker)ของบริษัท PYREX^{R}

ปิเปตต์ (pipette)ของบริษัท PYREX^{R}

ปั๊ม Peristaltic pump ของบริษัท Heidolph รุ่น PD 5201

สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.89 เซนติเมตร ของบริษัท Cole-Parmer Instrument Company รุ่น Tygon tubing 2-stop

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^{R}

1.9.2 สารเคมี

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

เปปโตน (peptone)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 .4\ H_2O$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 .7H_2O$)

แลคโตส (lactose)

ยีสต์สกัด(yeast extract)

เอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

โซเดียมแอลจิเนต (sodium alginate) ของบริษัท Carlo Erba®

เพคตินจากส้ม(citrus pectin)ของบริษัท Sigma®

เพคตินจากแอปเปิ้ล (apples pectin)ของบริษัท Fluka®

เพคตินจากบริษัท Himedia®

1.10 วัตถุดิบ

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

1.10.1 การเก็บวัตถุดิบ

เวย์ที่ใช้ในงานวิจัยจะเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส โดยนำมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งานต่อไป

1.10.2 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ ประยุกต์จาก Kassler (1981)

นำเวย์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการแยกโปรตีนออกจากเวย์ ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกไขมันโดยกรองด้วยกระดาษกรองGlass fiber (GC-50) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จะได้น้ำเวย์ที่พร้อมใช้ในการทดลอง

1.11 การสกัดเพคตินจากใบกรุงเขมา (ประยุกต์จาก พิเชษฐ เทบำรุง. 2546)

ใบกรุงเขมาใช้ในงานวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร 199 หมู่ 3 ถ.พังโคน-วาริชภูมิ อ.พังโคน จ.สกลนคร 47160

1.11.1 การเตรียมตัวอย่างใบกรุงเขมา

นำใบกรุงเขมามาล้างน้ำให้สะอาด แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (blender) แล้วชั่ง 10 กรัม นำมาเติมสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองเอาสารละลายทิ้งไป นำใบหมาน้อยที่ได้จากการกรองมาเติมสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาใบหมาน้อยแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสให้แห้งสนิท

1.11.2 ขั้นตอนการสกัดเพคตินจากใบหมาน้อย

นำใบหมาน้อยที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้ว ชั่ง 5 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร นำไปสกัดเพคตินแบบร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นกรองแยกเอากากของใบหมาน้อยออกขณะร้อน แล้วนำสารละลายที่ได้จากการกรอง มาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum evaporator) ให้เหลือ 1 ใน 3 ส่วนของสารละลาย จากนั้นนำมาตกตะกอนเพคตินโดยเติมสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนของสารละลายเพคตินต่อสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ 1:2 โดยปริมาตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง กรองแยกเอาตะกอนเพคติน แล้วล้างตะกอนเพคตินด้วยสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 4-5 ครั้ง หลังจากนั้นอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บดเป็นผงร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh ชั่งน้ำหนักของเพคตินที่ได้แล้วนำไปคำนวณหาร้อยละของปริมาณเพคติน

1.12 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1.12.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแล้วลาก (streak) ลงบนอาหารแข็ง MRS แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Youssef และคณะ. 2000) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

1.12.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง

เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Ha และคณะ. 2003) เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Senthuran และคณะ. 1999) (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ปริมาตรร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหาร (ปริมาตรแปรผันตามการทดลอง) นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง

จากนั้นเติมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีตะกอนเซลล์ เขย่าให้เข้ากันจนเกิดสารแขวนลอยเซลล์ จะได้เชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์อิสระหรือสำหรับเซลล์ตรึง

1.13 อาหารสำหรับการผลิตกรดโพรพิโอนิก

นำเวย์ที่เป็นของเหลวที่เตรียมได้จากข้อ 1.10.2 มาเติมด้วยสารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ทริปติเคสซอยบรอท 0.25 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร และ แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 ($\pm$ 0.1) และปรับปริมาตรเป็น1 ลิตร

อาหารที่ใช้ในอาหารหมักในระดับฟลาสก์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตร (ร้อยละ70) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และอาหารที่ใช้ในอาหารหมักในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตร 1400 มิลลิลิตร (Nancib และคณะ. 2000) จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.14 การตรึงเซลล์

1.14.1 การตรึงเซลล์ด้วยเพคติน

การตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา เตรียมเพคตินให้อยู่ในรูปโพแทสเซียมเพคเตต โดยทำปฏิกิริยา de-esterification ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับหัวเชื้อเริ่มต้น จากนั้นหยดสารผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ผ่านปั๊ม (peristaltic pump) โดยใช้สายยางซิลิโคน นำเม็ดเจลบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างแคลเซียมไอออนที่มากเกินและตัวเซลล์ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้ม จะได้เม็ดเจลเซลล์ตรึงที่ได้ไปใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

1.15 การศึกษาสภาะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาเพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

- ศึกษาความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ร้อยละ 3, 4 และ5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- ศึกษาปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ร้อยละ 3, 5 และ7 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
- ศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสายยาง 0.89, 1.52 และ2.02 มิลลิเมตร