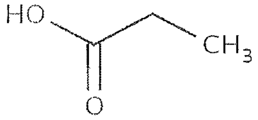
เนื้อเรื่อง

1.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกจัดเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ได้จากการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทรา นอกจากนี้ยังพบกรดโพรพิโอนิกตามธรรมชาติได้ในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ในเหงื่อของคนและในอาหารประเภทหมักดอง เป็นต้น กรดโพรพิโอนิกมีสูตรโมเลกุล คือ CH_3CH_2COOH สูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก แสดงดังตารางที่ 1.1

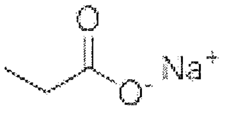


รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก

ที่มา : http://bmrb.wisc.edu/metabolomics/standards/propionic_acid/lit/3463.png
สืบค้นข้อมูลวันที่ 5 ตุลาคม 2553

1.2 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่ไม่แตกตัว มีประโยชน์ในการทำลายจุลินทรีย์โดยไปละลายสารภายในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีการตั้งสมมติฐานว่า กรดโพรพิโอนิกสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยไปรบกวนการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการยับยั้งการขนส่งอิเล็คตรอนภายในเซลล์ ส่งผลให้สภาพภายในเซลล์มีความเป็นกรดมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ช่วยในการยับยั้งการเจริญและทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของกรดโพรพิโอนิกที่ทำให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 3.4 ถึง 4.5 โดยที่พีเอช 4 จะมีโมเลกุลของกรดและเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 88 ในขณะที่พีเอช 6 จะมีโมเลกุลของกรดและเกลือที่ไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 6.7 ซึ่งกรดที่ไม่แตกตัวนี้ทำให้เกิดการยับยั้งการใช้อาหารของจุลินทรีย์ อีกทั้งกรดโพรพิโอนิกจะมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นเมื่อมีแอนไอออนไปรบกวนการแตกตัวของกรด กรดโพรพิโอนิกที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะอยู่ในรูปของเกลือ ได้แก่ เกลือโซเดียม แคลเซียม และโพแทสเซียม (ศิวาพร, 2546) สูตรโครงสร้างโมเลกุลของโซเดียมโพรพิโอเนต แสดงดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของโซเดียมโพรพิโอเนต

ที่มา : http://www.chemicalbook.com/CAS%5CGIF%5C137-40-6.gif
สืบค้นข้อมูลวันที่ 5 ตุลาคม 2553

ตารางที่ 1.1 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ	**กรดโพรพิโอนิก**
น้ำหนักโมเลกุล	74.08
Conversion factor	1 พีพีเอ็มเท่ากับ 3.02 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร
	1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตรเท่ากับ0.3พีพีเอ็ม ที่ 25 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	
จุดเดือด	(-20) ถึง (-22) องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น	141.1 องศาเซลเซียส
การละลายน้ำ	0.992 – 0.994
ค่าพีเอช	สามารถละลายน้ำได้
การละลายในสารละลาย	2.9
ความดันบรรยากาศ	สามารถละลายในเอทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม
ความดันไอ	2.55
อัตราการระเหย	0.32 ถึง 0.4 กิโลปาสคาล
อุณหภูมิวิกฤติ	ไม่ระเหย
ค่าความเป็นกรด	339 องศาเซลเซียส
ความดันวิกฤติ	กรดอ่อน pKa 4.87
ความคงตัว	5370 กิโลปาสคาล
การกัดกร่อนเหล็ก	มีความคงตัว
สภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง	สามารถกัดกร่อน เหล็กกล้า นิกเกิล โครเมียม และตะกั่ว
วัตถุที่ควรหลีกเลี่ยง	อุณหภูมิเกิน 50 องศาเซลเซียส
	สารออกซิไดซ์ กรดแก่ Reactive metal Reducing agent

ที่มา : http://absoluteastronomy.com/encyclopedia/p/pr/propionic_acid.htm
สืบค้นข้อมูลวันที่ 5 ตุลาคม 2553

กรดโพรพิโอนิกมีความปลอดภัยในการใช้ในอาหาร จึงไม่ได้กำหนดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในอาหาร ยกเว้นในอาหารบางประเภทซึ่งกำหนดความเข้มข้นสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ ดังนี้ ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งให้ใช้ได้ในปริมาณสูงสุดไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 1 กิโลกรัม (ศิวาพร,2546) สำหรับผลิตภัณฑ์ประเภทขนมปัง ให้ใช้ได้ในปริมาณสูงสุดไม่เกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 1 กิโลกรัม (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2527 ฉบับที่ 84 เรื่องวัตถุเจือปนในอาหาร) นอกจากนี้มีรายงานการใช้กรดโพรพิโอนิกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนี้ Vandegraft และคณะ (1975) รายงานการใช้กรดโพรพิโอนิกความ

เข้มข้นร้อยละ 0.1 กับเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 28 พบว่าตลอดการทดลอง 29 สัปดาห์ ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* กับ *Aspergillus ochraceus* และไม่พบสารอะฟลาทอก-ซิน B_1 กับสารโอคราทอกซินเลย

Buchanan และ Ayres (1976) รายงานว่าการใช้กรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อ 100 ลิตร ของอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. parasiticus* และการสร้างอะฟลาทอกซินได้บางส่วน แต่ถ้าเพิ่มเป็น 0.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการสร้างอะฟลาทอกซินได้ อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 7 วัน

Racker และคณะ (1992) รายงานว่ากรดโพรพิโอนิกร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 26.8 และ 29.6 ได้ตลอดการทดลอง 42 สัปดาห์

Filya และคณะ (2004) รายงานว่าการใช้เชื้อ *P. acidipropionici* เพียงชนิดเดียวหรือผสมร่วมกันกับ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งจะมีผลต่อกระบวนการหมักและสภาวะการให้อากาศของข้าวสาลี ข้าวฟ่าง และข้าวโพด ซึ่งเป็นอาหารสัตว์พบว่าการใช้เชื้อ *P. acidipropionici* เพียงชนิดเดียวจะมีการสร้างกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติกในระดับที่สูงกว่าการใช้เชื้อ *L. plantarum* เพียงชนิดเดียวและเชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* กับ *L. plantarum* ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการยับยั้งกิจกรรมของยีสต์ที่มีต่อข้าวสาลี ข้าวฟ่าง และข้าวโพดในอาหารสัตว์

1.3 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ 2 วิธี ดังนี้

1.3.1 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี ในปัจจุบันการผลิตกรดโพรพิโอนิกในเชิงพาณิชย์นิยมใช้วิธารสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากใช้เวลาในการผลิตสั้นและได้ผลผลิตตามต้องการ โดยใช้ปฏิกิริยาการออกซิเดชันของโพรพิโอนอลดีไฮด์ที่อุณหภูมิ 40–50 องศาเซลเซียส

ดังสมการที่ 1 และ 2

$$CO + 2H_2 + C_2H_2 \longrightarrow CH_3CH_2CHO \quad (1)$$

คาร์บอนโมโนออกไซด์ ไฮโดรเจน เอทีรีน โพรพิโอนอลดีไฮด์

$$CH_3CH_2CHO + 1/2O_2 \longrightarrow CH_3CH_2COOH \quad (2)$$

โพรพิโอนอลดีไฮด์ 1/2ออกซิเจน กรดโพรพิโอนิก

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Propionic_acid สืบค้นข้อมูลวันที่ 6 ตุลาคม 2553

1.3.2 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ สำหรับกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium* อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากผลผลิตที่ได้มีปริมาณน้อยโดยมีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

Woskow และ Glatz (1991) รายงานผลการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคโตสจากหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P9 และ 200910 หมักแบบกะและแบบกึ่งกะ พบว่าเชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ 200910 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกปริมาณ 47 กรัมต่อลิตร สูงกว่าผลผลิตที่ได้จากสายพันธุ์ P9 และให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *P. acidipropionici* ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกและวิตามินบี 12 จากซูโครส พบว่าปริมาณของ $FeSO_4.7H_2O$ 1.5 มิลลิกรัม ธาตุโคบอลต์ 0.75 มิลลิกรัม และ 5,6 ไดเมทิลเบนซิมิดสโซล 0.3 มิลลิกรัม เป็นปริมาณแร่ธาตุที่จำเป็นนอกเหนือจากแหล่งไนโตรเจน ฟอสเฟต และแมกนีเซียม ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของซูโครสที่ปริมาณ 30 ถึง 170 กรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลให้เกิดการยับยั้งจากซับสเตรตและสำหรับการผลิตเพื่อให้ได้กรดโพรพิโอนิกนั้นต้องทำในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนการผลิตวิตามินบี 12 นั้นต้องทำในสภาวะที่มีอากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.5

Paik และ Glatz (1994) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก ได้แก่ กลูโคสและแลคเตตจาก corn steep liquor (CSL) โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* สายพันธุ์ P9 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและเชื้ออิสระในสภาพการหมักแบบกะ กึ่งกะ และแบบต่อเนื่อง พบว่าการหมักแบบกะจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดในเวลา 36 ชั่วโมง การใช้แลคเตตเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตของกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าการใช้กลูโคส ส่วนการหมักแบบกึ่งกะจะใช้เวลาหมักนาน 250 ชั่วโมง ปริมาณสูงสุดของกรดโพรพิโอนิกที่ได้จากการใช้กลูโคส เท่ากับ 57 กรัมต่อลิตร สูงกว่าการใช้แลคเตตที่ได้ผลผลิต 45.6 กรัมต่อลิตร และในสภาพการหมักทั้งแบบกะและแบบต่อเนื่อง เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าเซลล์อิสระ

Ramsay และคณะ (1998) ศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพเพื่อเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสเป็นกรดโพรพิโอนิก ในการศึกษาใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ส่วนที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 60 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 2.5 กรัมต่อลิตร การเกิดกรดจะเกิดควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของเชื้อ มีอัตราการเจริญจำเพาะคือ 0.1 ต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือ 0.23 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Rickert และคณะ (1998) ศึกษาการตรึงเซลล์ *P. thoenii* สายพันธุ์ P20 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกในสภาพการหมักแบบกะ โดยใช้กลูโคสและแลคเตตเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่

ปริมาณของกลูโคสเท่ากับ 75 กรัมต่อลิตร และแลคเตต 42 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่ 34 กรัมต่อลิตร และ 22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีอัตราการใช้กลูโคสและการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดที่พีเอช 6.0 แต่ผลผลิตที่ได้สูงสุดเมื่อควบคุมพีเอช เท่ากับ 7.0

Himmi และคณะ (2000) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* และ *P. freudenreichii* spp. *Shermanii* พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด โดย *P. acidipropionici* มีความสามารถใช้สารตั้งต้นได้เร็วกว่า คือ 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดสูงกว่า คือ 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อมีการผลิตกรดอะซิติก ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตกรดโพรพิโอนิกในปริมาณเพิ่มขึ้น โดยปริมาณของกรดอะซิติกที่ได้จะมากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 2 เท่า ส่วนเชื้อ *P. freudenreichii* เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการใช้กลีเซอรอลกับการสร้างผลผลิต จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมะสม สำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *P. acidipropionici*

Martinez–Campos และTorre (2002) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ มีการเติมกลูโคสและแลกเตต ซึ่งกลูโคสและ แลกเตตจะถูกใช้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การใช้กลูโคสและแลกเตตร่วมกันจะเพิ่มอัตราการผลิตโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) และยังเป็นการเพิ่มส่วนของธาตุคาร์บอนสำหรับที่จะนำไปใช้ในการผลิตชีวมวล ผลผลิตของโพรพิโอเนตต่ออะซิเตตเท่ากับ 7.6 เมื่อใช้แลกเตตและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์ อัตตราส่วนโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต เท่ากับ 1.34 เมื่อใช้แลกเตตอย่างเดียว และ 1.85 เมื่อใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียว

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

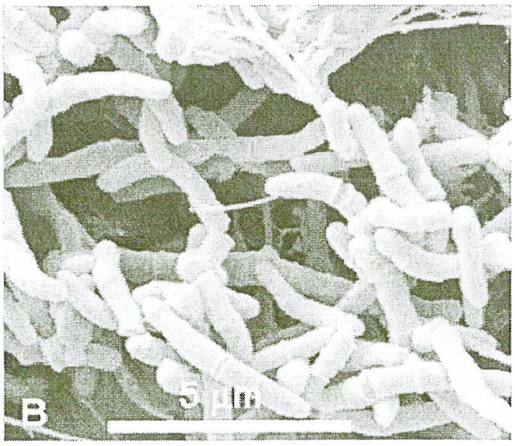
วรัญญา (2550) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ของเชื้อ *P. freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงในน้ำล้างซากไก่ พบว่ามีการผลิตกรดโพรพิโอนิกออกมานอกเซลล์ (1.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่าในเซลล์ (1.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ปริมาณกรดโพรพิโอนิกผลิตได้ในอาหาร complete medium น้ำล้างซากไก่ที่เติมธาตุอาหาร น้ำล้างซากไก่ที่รวมกับอาหาร complete medium ในปริมาณที่เท่ากัน และในน้ำล้างซากไก่ มีค่าเท่ากับ 1.89 1.52 1.47 และ 0.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

ฤทัยรัตน์ (2550) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากหางนมโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *P. acidipropionici* ATCC 4965 ร่วมกับเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 พบว่าปริมาณหัวเชื้อ

เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก คือหัวเชื้อ *P. acidipropionici* ปริมาณร้อยละ 5 และหัวเชื้อ *Lactococcus lactis* ปริมาณร้อยละ 5 โดยการเติมหัวเชื้อทั้ง 2 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกันเมื่อเริ่มทำการทดลอง เมื่อทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่ต้องพ่นอากาศ ใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด คือ 17.27 กรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการหมัก 168 ชั่วโมง ได้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.443 กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก 0.103 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 2.90×10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 3.50×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

1.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

แบคทีเรียที่ผลิตกรดโพรพิโอนิกจัดอยู่ในสกุล *Propionibacterium* เรียกว่าเป็น propionic acid bacteria (Quesada-Chanto,1994) พบครั้งแรกโดยแยกได้จากเนยสวิส ซึ่งในกระบวนการหมักจะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ทำให้เกิดลักษณะรูพรุนในเนื้อเนยแข็ง แบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ รูปร่างกลม ท่อนยาว อาจพบในลักษณะเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่ มีการเจริญแบบแฟคัลเททีฟแอนแอโรบ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิก ซักซินิก แอซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมัก เจริญเติบโตช้า แบคทีเรียประเภทนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมหรือกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นม มีจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ *Propionibacterium freudenreichii P. thoenii P. jensenii P. acidipropionici P. coccoides* และ *P. cyclohexanicum* ซึ่งกลุ่มนี้ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง การผลิตวิตามินบี 12 การผลิตกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สองคือ กลุ่มที่เจริญบนผิวหนังมนุษย์ หรือกลุ่มที่ทำให้เกิดสิว เช่น *P. acnes* ซึ่งไม่มีบทบาทในอุตสาหกรรมมากนัก (Lewis และYang,1992) ลักษณะของเชื้อ *P. acidipropionici* แสดงดังรูปที่ 1.3 และการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1.2



รูปที่ 1.3 ลักษณะของเชื้อ *P. acidipropionici*

ที่มา : http://www.cns.fr/spip/IMG/jpg/image3.jpg สืบค้นข้อมูลวันที่ 6 ตุลาคม 2553

ตารางที่ 1.2 แสดงการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *Propionibacterium* สายพันธุ์ต่างๆ

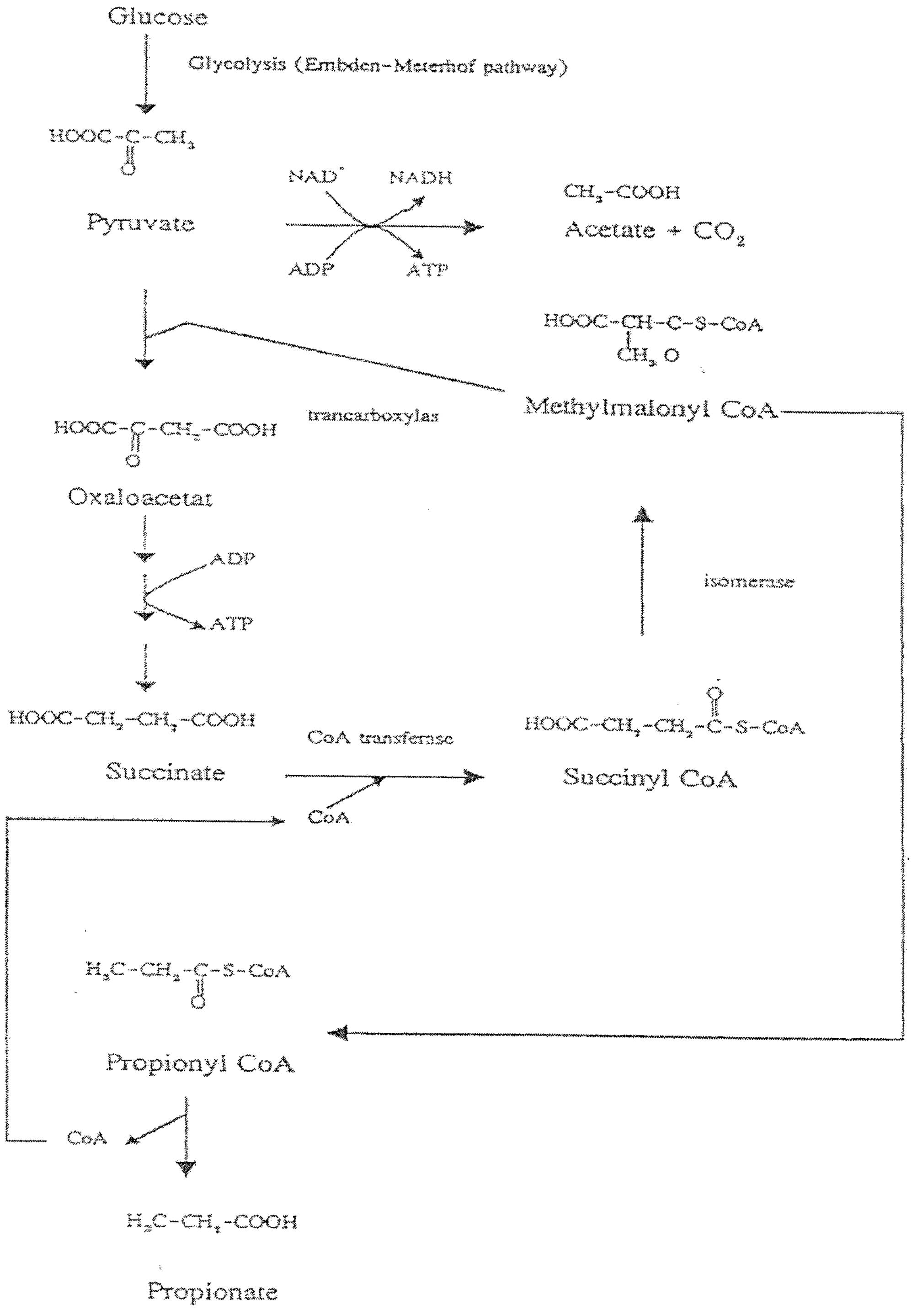
สปีชีส์	สายพันธุ์อ้างอิง	กรดโพรพิโอนิก (70 ชั่วโมง) กรัมต่อลิตร	พีเอช
P. acidipropionici	ATCC 4965	9.8	4.65
	CNRZ 287	7.5	4.67
	CNRZ 721	2.0	5.67
	CNRZ 733	0.0	4.40
P. thoenii	ATCC 4871	8.0	4.62
P. jensenii	ATCC 4870	0.0	5.82
	CNRZ 83	2.0	5.10
	ATCC 4867	0.0	5.10
	CNRZ 731	0.0	4.11
P. freudenreichii subsp. eudenreichii	NCIB 5959	0.0	5.82
	CNRZ 89	3.1	5.03
	CNRZ 725	2.6	5.29
	CNRZ 726	3.0	5.36
	CNRZ 727	3.2	5.10
	CNRZ 728	3.2	5.24
	CNRZ 729	3.2	5.31
P. freudenreichii subsp.shermanii	NCIB	3.7	5.15
	CNRZ	2.3	5.18
	CNRZ	4.5	4.73
	CNRZ	0.0	5.81
	SO-STANDA	6.0	4.51
	2908-STANDA	6.2	4.45
	2910-STANDA	1.92	5.67
	7916-STANDA	0.55	5.90
	PSI-BOLL	0.82	5.20

ที่มา : Colomban และคณะ (1993)

1.4 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก

การผลิตกรดโพรพิโอนิกเกิดขึ้นได้หลายวิธี ซึ่งคาร์บอนจากแหล่งต่างๆจะถูกใช้ในการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Propionibacterium* โดยเริ่มจากสารตัวกลางที่สำคัญคือ ไพรูเวท ออกซาโรอะซิเตต มาเลท ซักซิเนต และโพรพิโอเนต ตามลำดับ ที่ได้มาจากกลูโคส แสดงดังรูปที่ 1.4 (Daniel,1995) หรือ แลคเตต แสดงดังรูปที่ 1.4 การสร้างซักซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ แสดงดังรูปที่ 1.5 โดยเริ่มต้นจากการสร้างออกซาโลอะซิเตตด้วยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้กับไพรูเวทหรือให้กับฟอสโฟอีนอลไพรูเวท (PEP) และถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอล-มาเลท (L-malate) โดยการทำงานของเอนไซม์มาลิกดีไฮโดรจิเนส (malic dehydrogenase) ซึ่งกรดมาลิกที่ได้จะถูกดึงน้ำออกโดยเอนไซม์ฟูมาเรส (fumarase) ทำให้ได้กรดฟูมาริก (fumaric acid) ปฏิกิริยานี้ผันกลับได้ จากนั้นกรดฟูมาริกจะถูกเปลี่ยนให้เป็นซักซิเนตโดยเอนไซม์ฟูมาเรตรีดักซ์เตส (fumarate reductase) ซึ่งซักซิเนตจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในกระบวนการ โดยทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โคเอทรานเฟอเรส (CoA transferase) ได้ซักซินิลโคเอ (succinyl CoA) ปฏิกิริยาต่อไปซักซินิลโคเอจะเปลี่ยนเป็นอาร์-เมททิล มาโลนิลโคเอ (R-methyl malonyl CoA) โดยเอนไซม์อาร์-เมททิล มาโลนิลมิวเตส (R-methyl malonylmutase) หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนอาร์-เมททิลมาโลนิลโคเอไปเป็นเอส-เมททิลมาโลนิลโคเอ (S-methyl malonyl CoA) ซึ่งคาร์บอนของเอส-เมททิลมาโลนิลโคเอจะถูกย้ายออกไปรวมกับไพรูเวท ทำให้เกิดการสร้างออกซาโลอะซิเตต เมื่อคาร์บอนเคลื่อนย้ายออกไปจะทำให้ได้โพรพิโอนิลโคเอ (propionyl CoA) จากนั้นโคเอ (CoA) จะถูกย้ายออกจากโมเลกุลเพื่อนำไปใช้กับซักซินิกตัวต่อไป ทำให้ได้กรดโพรพิโอนิกออกมาในที่สุด

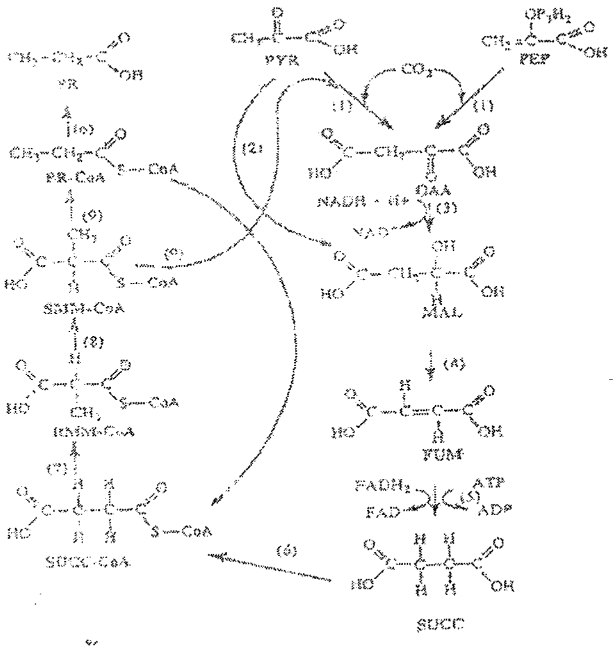
วิถีอะครีเลต (Acrylate) ของการสร้างโพรพิโอเนต รายละเอียดของวิถีนี้แสดงดังรูปที่ 1.6 กรดโพรพิโอนิกจะถูกสร้างขึ้นตามลำดับ เริ่มต้นจากการเปลี่ยนรูปของแอล-แลกเตต (L-lactate) ไปเป็นแอล-แลกติล โคเอ (L-lactryl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์โคเอ ทรานเฟอเรส (CoA transferase) จากนั้นแอล-แลกติล โคเอ จะเปลี่ยนรูปไปเป็น อะครีลิล โคเอ (Acrylyl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีไฮดราเทส อะครีลิล โคเอ (dehydratase acrylyl CoA) และเปลี่ยนเป็นโพรพิโอนิลโคเอ โดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของฟลาโวโปรตีน (flavor protein)ซึ่งโพรพิโอนิลโคเอจะย้ายโมเลกุลโคเอไปให้แอล-แลกเตตเพื่อสร้างแอล-แลกติล โคเอ และเกิดเป็นกรดโพรพิโอนิกอิสระ สำหรับการสร้างอะซิเตตและคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดควบคู่ไปกับการสร้างโพรพิโอเนต วิถีการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยเชื้อ *P. acidipropionici* แสดงดังรูปที่ 1.7 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการย่อยแป้งและเซลลูโลส แสดงดังรูปที่ 1.8



รูปที่ 1.4 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสโดยเชื้อ *Propionibacterium*

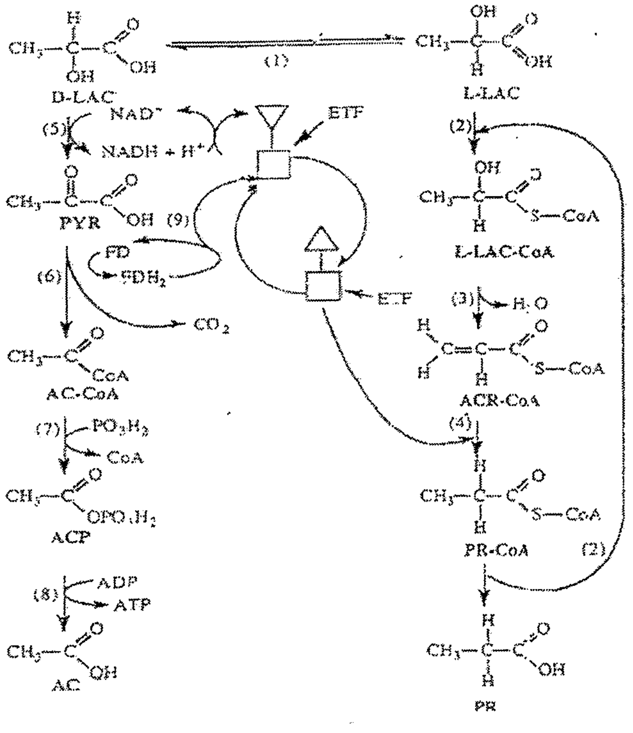
ที่มา : Daniel (1995)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย



รูปที่ 1.5 การสร้างซักซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

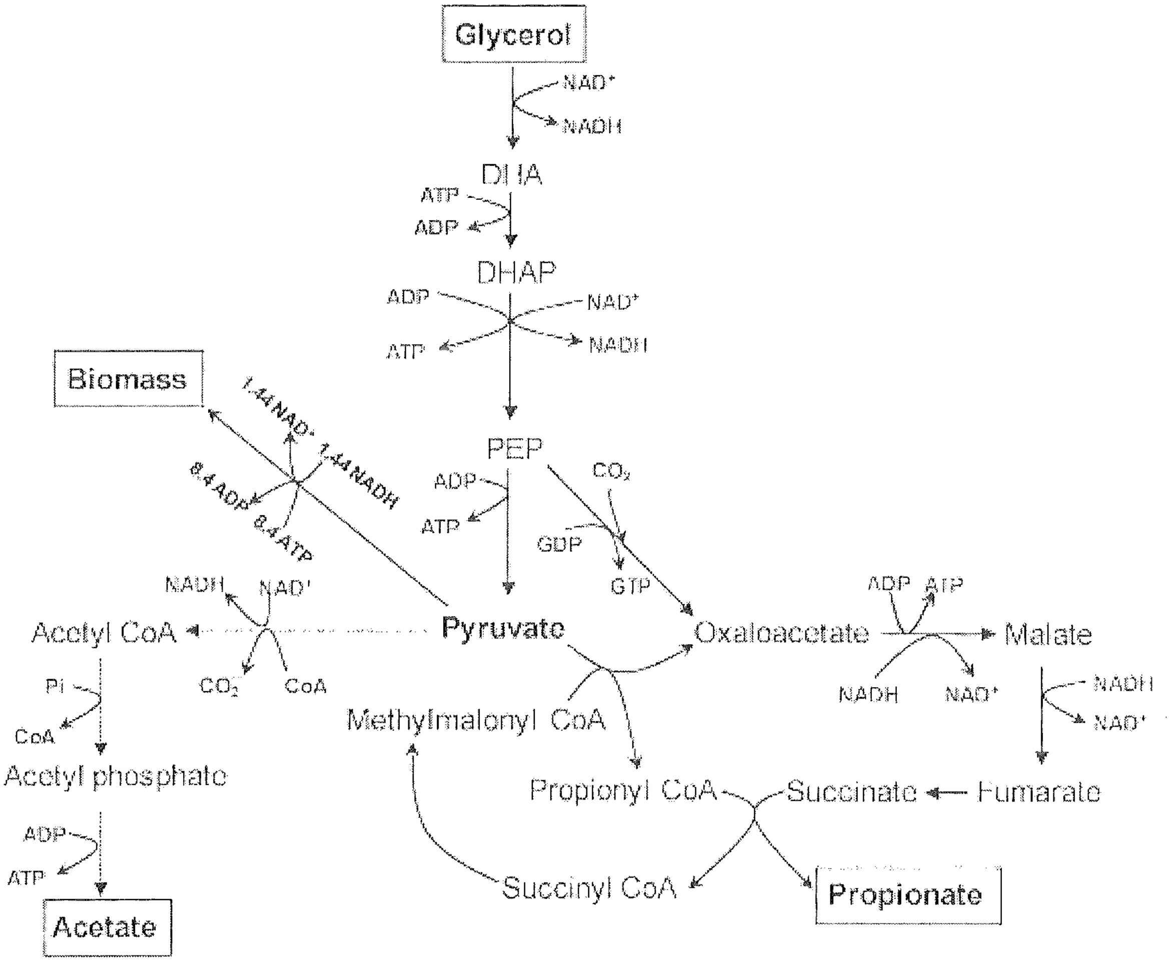
ที่มา : Daniel (1995)



รูปที่ 1.6 วิถีอะครีเลตของการสร้างโพรพิโอเนต

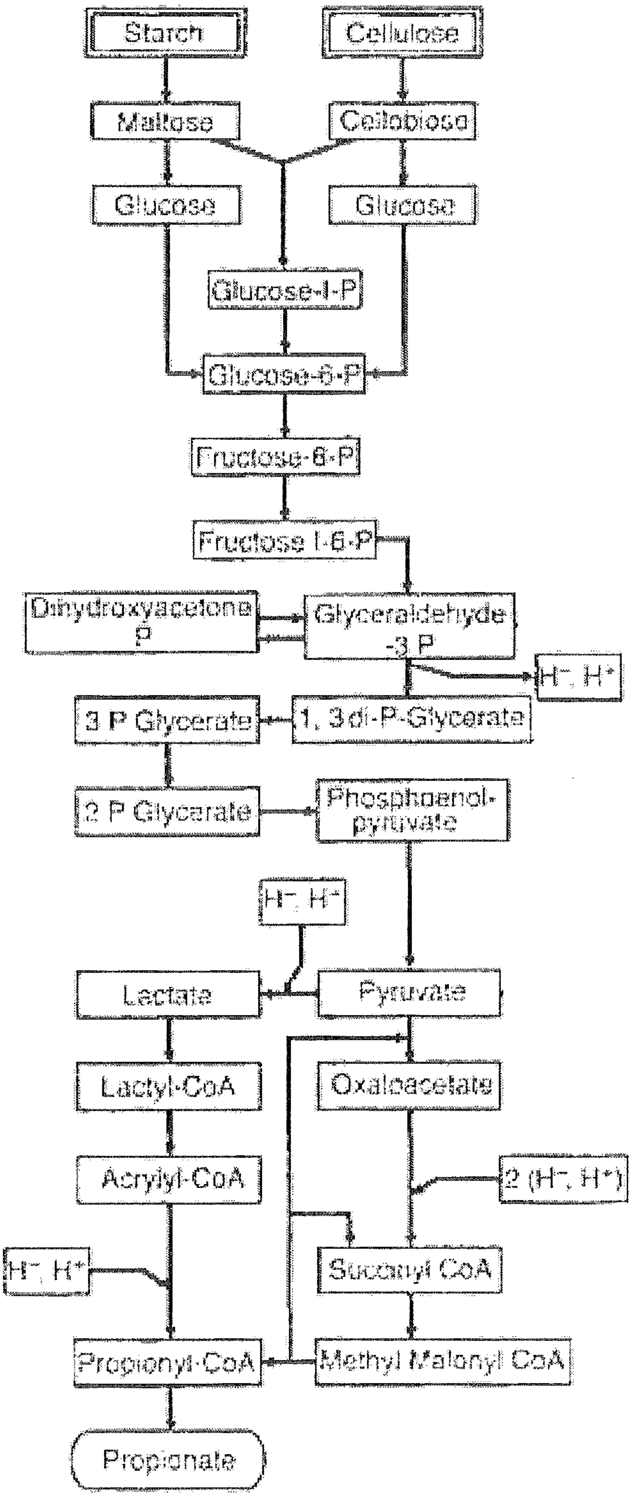
ที่มา : Daniel (1995)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 19 มี.ค. 2555
เลขทะเบียน 243385
เลขเรียกหนังสือ



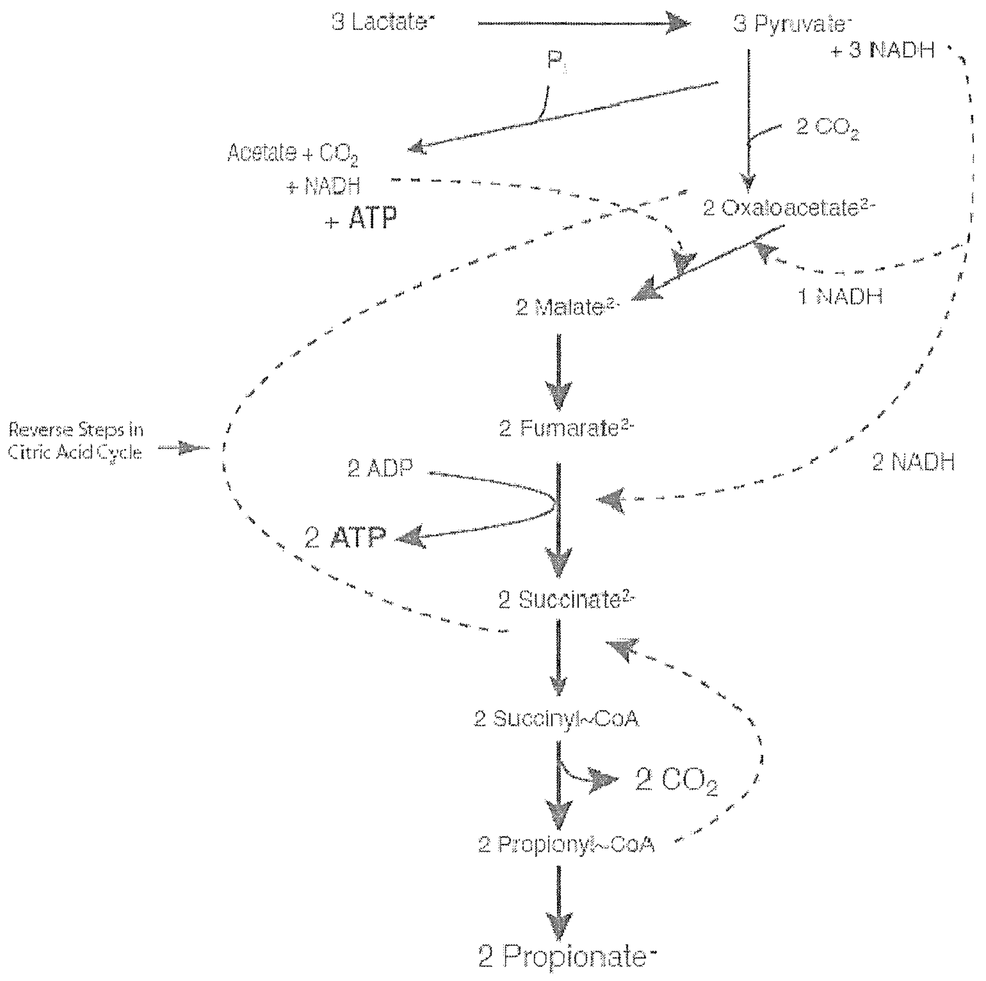
รูปที่ 1.7 วิถีการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยเชื้อ *P. acidipropionici*

ที่มา : An Zhang และ Shang-Tian Yang (2009)



รูปที่ 1.8 วิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการย่อยแป้งและเซลลูโลส

ที่มา : ดัดแปลงจาก J.P.F D’Mello (2000)



รูปที่ 1.9 วิถีการเกิดโพรพิโอเนตจากแลกเตต

ที่มา: http://apropos.mcw.edu/kegg_pathways/show/106 สืบค้นข้อมูลวันที่ 6 ตุลาคม 2553

มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิถีการเกิดกรดโพรพิโอนิก ดังนี้

Barbirato และคณะ (1997) ศึกษาการหมักกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอล พบว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงจากกลีเซอรอลไปเป็นกรดโพรพิโอนิกเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยารีดักชันโดย ATP 2 โมล จะถูกใช้ไปเพื่อสังเคราะห์กรดโพรพิโอนิก 1 โมล

Zhang และ Yang (2009) ศึกษาการหมักกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอล พบว่ากระบวน การเปลี่ยนแปลงจากกลีเซอรอลไปเป็นกรดโพรพิโอนิก เริ่มจากโมลของกลีเซอรอลเปลี่ยนเป็นไพรูเวท โดยสร้าง NADH 2 โมเลกุล จากนั้นผ่านวิถีการสังเคราะห์กรดโพรพิโอนิก โดยจะมีการเปลี่ยนNADH เป็น NAD^+ และยังคงรักษาสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ไว้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก

1.6.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยวัตถุดิบที่แบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กรดแลกติก กลีเซอรอล และแมนนิทอล ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ หรือ กลูโคส มอลโทส แลกโทส ซูโครส และแป้ง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบคาร์โบไฮเดรต (Prescott และ Dunn,1959) การเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติกของแบคทีเรีย *P. acidipropionici* แสดงดังสมการ

$$1.5\ C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$$

1.5 กลูโคส → 2 กรดโพรพิโอนิก + กรดอะซิติก

และ *P. acidipropionici* ยังสามารถเปลี่ยนกรดแลกติกไปเป็นกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก ดังสมการ

$$3\ CH_3CHOHCOOH \longrightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$$

3 กรดแลคติก → 2 กรดโพรพิโอนิก + กรดอะซิติก

ที่มา :Tyree และคณะ (1991)

Goswami และ Srivastava (2000) ได้ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจาก *P. acidipropionici* โดยใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะซึ่งใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นสารตั้งต้นที่พีเอชเท่ากับ 6.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ข้อมูลเกี่ยวกับจนพลศาสตร์การเพาะเลี้ยงแบบกะถูกนำมาใช้ในการพัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดโพรพิโอนิก แบบจำลองดังกล่าวที่ได้พัฒนานั้นพบว่าสามารถเพิ่มการผลิตกรดโพรพิโอนิกในการใช้ถังหมักโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ

Suwannakham และ Yang (2005) ศึกษากระบวนการหมักกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* โดยใช้กลูโคส ซอร์บิทอล กลูโคเนต และไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ซอร์บิทอลให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด โดยการใช้ซอร์บิทอลสามารถเพิ่มอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิก เพิ่มปริมาณของกรดโพรพิโอนิกสุดท้าย และเพิ่มอัตราส่วนระหว่างโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต นอกจากนี้ยังลดผลผลิตของอะซิเตตและซักซิเนตอีกด้วย

นิสากร และคณะ (2552) ศึกษาการผลิตสารประกอบอินทรีย์จากกากน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ 15 สายพันธุ์ในสภาวะตั้งนิ่ง พบว่าในแง่ของการใช้น้ำตาล *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5606 และ TISTR 5020 สามารถใช้น้ำตาลทั้งหมด (น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส) ในกากน้ำตาลได้มากที่สุด ส่วนในแง่ความสามารถในการผลิตสารอินทรีย์ พบว่า *Candida utilis* TISTR 5001 ผลิตกรด

โพรพิโอนิกได้ 8.04±1.04 กรัมต่อลิตร, *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ผลิตกรดแลกติกได้ 8.21±0.73 กรัมต่อลิตร เป็นต้น

Zhang และ Yang (2009) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยใช้ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ที่มีการเปลี่ยนแปลงยีนส์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่กลายพันธุ์นี้สามารถใช้กลีเซอรอลสำหรับการเจริญเติบโตและผลได้ของการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเท่ากับ 0.54–0.71 กรัมต่อกรัมและพบว่ามีค่ามากกว่าการใช้กลูโคส ประมาณ 0.35 กรัมต่อกรัม นอกจากนี้การผลิตกรดอะซิติกจากการหมักกลีเซอรอล พบว่ามีค่าน้อยกว่าการใช้กลูโคสมากดังนั้นการหมักโดยใช้กลีเซอรอลสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกที่มีความบริสุทธิ์สูงที่ซึ่งอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติกเท่ากับ 22.4 ของกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์ ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่สูงที่สุดที่ได้จากการหมักกลีเซอรอล คือ ประมาณ 106 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเป็น 2.5 เท่าของความเข้มข้นมากที่สุดของ การรายงานก่อนหน้า (ประมาณ 42 กรัมต่อลิตร)

Jefferson และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้ กากน้ำตาล กลีเซอรอล หรือ แลคเตต ในการหมักแบบกะที่อุณหภูมิ 30 และ 36 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลายต่ำ ไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่า สามารถผลิตชีวมวลได้มากในกากน้ำตาลที่อุณหภูมิ 30 และ 36 องศาเซลเซียส เท่ากับ 7.55 และ 3.71 กรัมต่อลิตร และหลังจากการหมักชั่วโมงที่ 133 ที่มีการใช้กากน้ำตาลเป็นซับสเตรต ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.77 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 8.23 ± 0.12 กรัมต่อลิตร และผลได้เท่ากับ 0.455±0.002 กรัมต่อกรัม การผลิตกรดโพรพิโอนิกและชีวมวลที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียสมีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสในทุกกรณี อัตราการผลิตที่ดีที่สุด คือ การใช้แลคเตต มีค่า 0.113 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ถึงแม้ว่าผลได้ของการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ามากกว่า นั่นคือ 0.724 กรัมต่อกรัม เนื่องจากกระบวนการผลิตไม่มีกรดอะซิติก แต่ การใช้กากน้ำตาลและแลคเตตจะเกิดกรดอะซิติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ จึงต้องมีการทำให้ได้กรดโพรพิโอนิกบริสุทธิ์

1.6.2 แหล่งไนโตรเจน

พรวิสาข์ (2551) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อยับยั้งเชื้อราและยีสต์โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้เวย์เป็นซับสเตรต พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีหางนมเป็นส่วนประกอบหลักผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร *P. acidipropionici* ATCC 4965 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุดเท่ากับ 11.53 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง ระยะเวลาการหมัก 336 ชั่วโมง

Prescott และ Dunn (1959) พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีผลต่ออัตราการหมักและอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติก โดย *P. shermanii* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี สารสกัดยีสต์ เป็นต้น แต่สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

Yang และคณะ (1994) ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในเวย์ โดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ ยีสต์สกัด และทริปทิเคสซอยบรอท พบว่าจะได้ปริมาณกรดสูงสุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดและทริปทิเคสซอยบรอทเติมลงไปในเวย์ปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Jefferson และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้ กากน้ำตาล กลีเซอรอล หรือ แลคเตต ในการหมักแบบกะ โดยใช้ยีสต์สกัด 5.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

1.6.3 แหล่งเกลือแร่

Quesada-Chanto และคณะ (1994) รายงานว่าเหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ *P. shermanii* โดยปริมาณ $FeSO_4.2H_2O$ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญ

1.6.4 แหล่งวิตามิน

Thompson (1943) ทำการศึกษาพบว่า กรดแพนโททินิกและไบโอติน เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของ *P. shermanii* และ *P. jensenii*

1.6.5 พีเอชของอาหาร

Lewis และ Yang (1992) ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่า เมื่อใช้แลคเตตเป็นสารที่ใช้ในการหมักซึ่งมีพีเอชเริ่มต้น 6.6 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอชเริ่มต้นที่ 6.0 และ 5.5

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ศึกษาผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าที่พีเอช 6.5 จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุด

Jefferson และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 โดยใช้ กากน้ำตาล กลีเซอรอล หรือ แลคเตต ในการหมักแบบกะ ปรับพีเอชเป็น 6.8 ถึง 7.0 พบว่าค่าพีเอช เริ่มต้น 6.87 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

Zhang และ Yang (2009) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยใช้ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ที่มีการเปลี่ยนแปลงยีนส์ ในการหมักแบบกะที่มีการตรึงเซลล์แบบ fibrous-bed แบบใช้เซลล์อิสระ และการหมักแบบกึ่งกะ พบว่า ที่พีเอชเริ่มต้น 7เหมาะสมต่อการให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

1.6.6 อุณหภูมิ

Yang และคณะ (1994) ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 โดยใช้อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตได้เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

Hammi และคณะ (2000) รายงานว่าในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอล โดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 255562 ในการหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการใช้

ซับสเตรตสูงสุด 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดโพรพิโอนิกสูงสุด 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Goswami และ Srivastava (1999) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 อยู่ที่ 30±1 องศาเซลเซียส

Jefferson และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในการหมักแบบกะที่อุณหภูมิ 30 และ 36 องศาเซลเซียส พบว่า การผลิตกรดโพรพิโอนิกและชีวมวลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสของการศึกษาทุกกรณี

Zhang และ Yang (2009) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยใช้ *P. acidipropionici* ATCC 4875 ที่มีการเปลี่ยนแปลงยีนส์ ในการหมักแบบกะที่มีการตรึงเซลล์แบบ fibrous-bed แบบใช้เซลล์อิสระ และการหมักแบบกึ่งกะ พบว่า ที่อุณหภูมิ 32องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

1.6.7 การให้อากาศ

Menon และShemin (1967) ศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. shermanii* ภายใต้สภาวะที่มีอากาศอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกจะต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

Quesada-Chanto และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยเชื้อ *P. acidipropionici* NRRL B3569 พบว่าจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ดีที่สุดในสภาวะไม่มีอากาศเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ การผลิตกรดอะซิติก และการผลิตวิตามินบี 12 จะเพิ่มมากขึ้น

1.7 กรุงเขมา

1.7.1 ลักษณะทั่วไปของกรุงเขมา

กรุงเขมา *(Cissampelos pareira* L.) นอกนี้ยังมีชื่อเรียกในท้องถิ่นอื่น เช่น ขงเขมา พระพาย กรุงบาดาล ใบก้นบิด (ภาคกลาง), สีฟัน (เพชรบุรี), เครือหมาน้อย (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ), เปล้าเลือด (แม่ฮ่องสอน), อะกามินเยาะ (มลายู-นราธิวาส) กรุงเขมาเป็นไม้เถาที่เลื้อยไปตามต้นไม้อื่น ไม่มีมือเกาะ มีคุณสมบัติพิเศษคือเมื่อนำมาขยี้กับน้ำแล้วทิ้งไว้ประประมาณ 15 นาที เกิดลักษณะเป็นเจลหรือวุ้น เนื่องจากมีเพคตินเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก (สัมภาษณ์ คำผุย. 2533 ; เทียนศักดิ์ และคณะ. 2545 ; พิเชษฐ เทบำรุง. 2546) การกระจายพันธุ์ในประเทศไทยพบว่าสามารถพบอยู่ทั่วไปแทบทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้พบว่ามีการกระจายพันธุ์ที่ประเทศอินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย แอฟริกา และอเมริกา สภาพที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ ริมแม่น้ำลำธาร ในป่าผลัดใบ ตั้งแต่

พื้นที่ราบระดับน้ำทะเลจนถึงพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ1,100 เมตร (ราชบัณฑิตยสถาน. 2538 ; พิเชษฐ เทบำรุง. 2546 ; กชพรรณ วงค์เจริญ. 2548) มีอนุกรมวิธานดังนี้ (สัมภาษณ์ คำผุย. 2533)

Kingdom Plantae

Division Anthophyta

Class Dicotyledonae

Order Ranales

Family Menispermaceae

Genus Cissampelos

Species pareira

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รูปที่ 1.7 กรุงเขมา

ที่มา : www.thaicattle.com/.../plant/kamoun.jpg

1.7.2 ลักษณะพฤกษศาสตร์

สัมภาษณ์ คำผุย (2533); กชพรรณ วงค์เจริญ (2548); Francis (2004); Anonymous (2004) ได้รายงานลักษณะของกรุงเขมาไว้ดังนี้

ราก เป็นรากที่มีลักษณะอวบใหญ่ สีน้ำตาล มีหน้าที่สะสมอาหาร

ใบ มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปกลม รูปหัวใจหรือรูปไต ก้นปิด ใบกว้าง 5.6-6.6 เซนติเมตร ยาว 6.9-7.6 เซนติเมตร ปลายแหลมหรือเป็นติ่งหนาม โคนมน ตัดหรือ เว้าเล็กน้อย หน้าใบและหลังใบมีขนสีน้ำตาลยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ปกคลุมหนาแน่น หลังใบมีขนปกคลุมหนาแน่นมากกว่าหน้าใบ ก้านใบมีขน

ก้านใบยาวประมาณ 1.7-2.5 เซนติเมตร เมื่อยังอ่อนมีขนอ่อนนุ่มหนาแน่นทั้ง 2 ด้าน และตามขอบใบ แต่จะร่วงไปเมื่อใบแก่

ดอก มีขนาดเล็กแยกเพศเป็นดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ต่างต้น มีสีเขียวอม เหลืองหรือเหลืองอ่อน ดอกเพศผู้ออกเป็นช่อกระจุกที่ง่ามใบ ช่อดอกยาวประมาณ 2-8.5 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยง กลีบดอก 4 กลีบ โคนติดกันเป็นรูปถ้วย ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยง ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของกลีบเลี้ยงเกสรเพศ ผู้มัดเดี่ยวยาวกว่ากลีบเลี้ยง อับเรณูติดกันเป็นรูปจาน ดอกเพศเมียออกเป็นช่อที่ง่ามใบ ช่อดอกยาวประมาณ 10-18 เซนติเมตร ก้านดอกสั้นมาก ใบประดับรูปกลม หรือรูปไต ซ้อนเหลื่อมกันแน่นไม่ร่วง ปลายเป็นติ่งหนาม มีขน กลีบเลี้ยง 1 กลีบ รูปขอบขนานแกมรูปไข่ กลีบดอก 1 กลีบ ออกตรงข้ามกับกลีบเลี้ยง และสั้นกว่า

ผล ผลสดเป็นแบบ drupe ค่อนข้างกลม เมื่อสุกจะมีสีแดง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.2 เซนติเมตร มีขน

เมล็ด เป็นเมล็ดเดียว เล็ก แข็ง รูปโค้ง หรือเป็นรูปเกือกม้า ผิวขรุขระ

1.7.3 การใช้ประโยชน์จากกรุงเขมา

สรรพคุณของกรุงเขมาในตำรายาไทยมีมากมาย เนื่องจากทุกส่วนของกรุงเขมาสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคและช่วยบำรุงร่างกาย ได้แก่

ราก สรรพคุณในการแก้ไข้ แก้ดีรั่ว ดีซ่าน เป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงอวัยวะเพศให้แข็งแรง แก้ลม โลหิตกำเดา แก้โรคตา ขับปัสสาวะ แก้อาการบวมน้ำ แก้ทางเดินปัสสาวะอักเสบกระเพาะปัสสาวะอักเสบ แก้กระหายน้ำ แก้ช้ำใน แก้ปวดท้อง แก้โรคฝีดาษ บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย เป็นยาระบาย แก้ท้องร่วง ในรากมีสารสำคัญ พวกอัลคาลอยด์ในปริมาณสูง (พะยอม ตันติวัฒน์. 2521; วุฒิ ธรรมเวช. 2540)

เถา สรรพคุณในการดับพิษไข้ทุกชนิด บำรุงโลหิตสตรีให้สมบูรณ์ แก้ระดูพิการ

ใบ สรรพคุณในการใช้ทาแก้โรคผิวหนัง แก้หิด รักษางูกัด พอกแผล ฝี แก้ร้อนใน ใบจะมีสารพวกเพคติน (พะยอม ตันติวัฒน์. 2521 ; ชยันต์ และคณะ. 2542)

นอกจากนั้นมีการนำใบกรุงเขมามาบริโภค โดยนำใบที่เจริญเต็มที่มาขยี้กับน้ำสะอาด กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวข้น แล้วปล่อยให้เกิดเจลหรือที่เรียกว่า วุ้น หมาน้อยจึงนำมารับประทาน (จิรศักดิ์ ศรีสมศักดิ์ และ ธนากร อัปมะเทา. 2543)

1.7.4 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการสกัดเพคตินจากใบกรุงเขมา

ศิริวรรณ และคณะ (2532) ได้ศึกษาวิธีการสกัดสารเพคตินจากใบหมาน้อย และใบบัวโคก โดยวิธีการต้มสกัดกับน้ำโดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักสดต่อน้ำ 1: 80 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที พบว่าสารเพคตินที่สกัดได้จากใบสดและใบแห้งได้ปริมาณไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบเป็นน้ำหนักแห้ง โดยใบหมาน้อยและใบบัวโคกได้ปริมาณสารเพคตินร้อยละ 27.80 และ 9.13 ตามลำดับ

สัมภาษณ์ คำผุย (2533) ศึกษาการสกัดสารเพคตินจากใบหมาน้อย พบว่าปริมาณสารเพคตินที่สกัดได้จากใบสดและใบแห้งของต้นหมาน้อยมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยได้ปริมาณสารเพคติน 2.576 กรัมต่อใบหมาน้อย 10 กรัม

เทียนศักดิ์ และคณะ (2545) โดยศึกษาวิเคราะห์ปริมาณสารเพคตินจากใบหมาน้อยด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี โดยปริมาณสารเพคตินที่วิเคราะห์ได้ปริมาณเฉลี่ย 0.25 กรัม ต่อน้ำหนักใบหมาน้อย 1 กรัม

พิเชษฐ เทบำรุง (2546) ศึกษาหาปริมาณและคุณภาพของเพคตินจากใบหมาน้อย ทำการสกัดแบบร้อนด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล และสารลายโซเดียมเฮกซาเมตาฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.1 สภาวะที่ใช้การสกัดคืออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที พบว่าการใช้สารละลายโซเดียมเฮกซาเมตาฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.1 ทำให้ได้ปริมาณเพคตินมากที่สุดเนื่องจากเป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพโดยจะไปไฮโดรไลส์โปรโตเพคตินให้เป็นเพคตินที่ละลายน้ำได้ และพบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่นได้เพคตินมีคุณภาพมากที่สุดโดยคุณภาพของเพคตินวัดจากปริมาณเมทธิลเอสเตอร์ และกรดกาแลคทูโรนิกในเพคติน และพบว่าเพคตินที่สกัดจากใบหมาน้อยเป็นเพคตินชนิดที่มีปริมาณเมทธิลเอสเทอร์ต่ำ

จีราภรณ์ สังข์ผุด (2549) ศึกษาการผลิตเพคตินผงจากรุงเขมาด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่นและกรดซิตริกร้อยละ 7 ใช้อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย 1:40 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพคตินประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ สกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ฟอกสีด้วยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 0.2 ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 จากนั้นอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียล จะได้ปริมาณเพคตินเท่ากับร้อยละ21.65±0.18 และ 48.48±0.35 (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับพบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่น มีปริมาณกรดกาแลคทูโรนิกสูงสุด (ร้อยละ76.45±0.13) มีปริมาณเมทธอกซิลร้อยละ 8.08 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณเมทธิลเอสเทอร์ต่ำ

น้ำทิพย์ นาเชียงใต้ และยุวภา ทัศบุต (2550) ศึกษาผลของ พีเอช และอุณหภูมิต่อคุณภาพของเพคตินที่สกัดได้จากใบหมาน้อย พีเอชและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ พีเอช 2 4 6 อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสได้ปริมาณเพคตินมากกว่าที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพบว่าการสกัดที่ พีเอช 2 มีปริมาณเถ้าน้อยที่สุดส่งผลให้เพคตินที่สกัดได้มีการละลายน้ำได้ง่าย พบว่า พีเอช มีผลต่อเวลาการเกิดเจลของเพคติน การสกัดที่ พีเอช 6 เพคตินจะเกิดเจลได้เร็วและเจลที่ได้มี

ลักษณะอ่อนนุ่ม แต่การสกัดที่ พีเอช 2 จะเกิดเจลได้ช้าแต่เจลมีความแข็งแรงกว่า ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีของเพคติน

Jittra (2005) ศึกษาการสกัดเพคตินและลักษณะทางกายภาพของเพคตินจากเครือหมาน้อย สกัดด้วยน้ำกลั่นใช้อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย 1 : 40 อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส พีเอช ธรรมชาติ (3.8-4.0) พบว่าเพคตินที่สกัดจากเครือหมาน้อยเป็นชนิดที่มีปริมาณเมทธิลเอสเทอร์ต่ำ และมีกรดกาแลกทูโล-นิกเป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 70-75)

1.8 เวย์ (whey)

เวย์เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็งหรือการแยกเคซีนจากนมสด เวย์มีลักษณะเป็นของเหลวใสมีสีค่อนข้างเขียวอมเหลือง (Marshall. 1982) องค์ประกอบของเวย์โดยทั่วไปพบว่าประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตสร้อยละ 4–5 โปรตีนร้อยละ 1 และเกลือแร่ร้อยละ 1 (Roukas และคณะ. 1998)

1.8.1 ประเภทของเวย์ เวย์แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามความเป็นกรด (Titable acidity) ได้แก่

1.8.1.1 สวีทเวย์ (Sweet whey) เป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งชนิดแข็ง เช่น เชดดา (Cheddar cheese) เกาดา (Gouda cheese) สวิส (Swiss cheese) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.10–0.20 และมีค่าพีเอชระหว่าง 5.8–6.1

1.8.1.2 แอซิดเวย์ (Acid whey) เป็นผลิตผลพลอยได้จากการตกตะกอนนม โดยการเติมกรดหรือเกลือแร่ลงไปโดยตรงในการผลิตเนยแข็งชนิดอ่อน เช่น คอทเทจ (Cottage) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.40–0.60 และมีค่าพีเอชระหว่าง 4.0–5.0 (Kosikowski. 1977) สรุปองค์ประกอบที่แตกต่างของเวย์ทั้งสองชนิดดังตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 องค์ประกอบโดยประมาณของสวีทเวย์และแอซิดเวย์

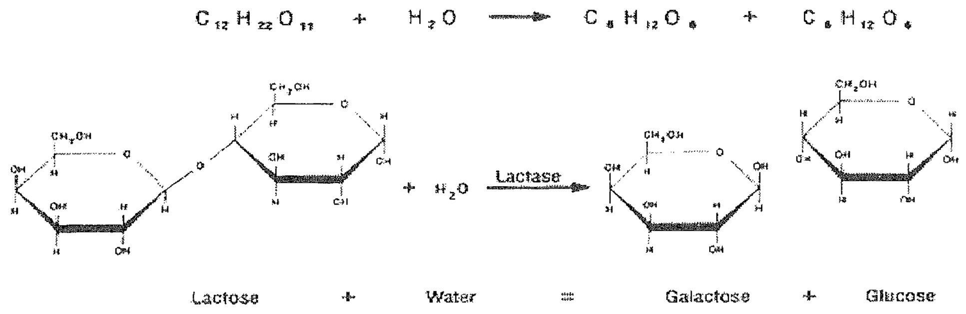
องค์ประกอบ (ร้อยละ)	สวีทเวย์		แอซิดเวย์	
	เชดดา	เกาดา	แลคติกแอซิด (คอทเทจ)	ไฮโดรคลอริก/ซัลฟิวริก แอซิดเวย์ (เคซีน)
ปริมาณของแข็ง	6.00	5.50	6.00	6.30
น้ำ	94.00	94.50	94.00	93.70
ไขมัน	0.06	0.05	0.05	0.05
โปรตีน	0.80	0.68	0.80	0.80
เถ้า(เกลือแร่)	0.50	0.45	0.67	0.80
น้ำตาลแลคโตส	4.49	4.18	3.63	4.50
กรดแลคติก	0.15	0.14	0.85	0.15

ที่มา : Nielsen และ Ullum (1989)

1.8.2 องค์ประกอบหลักทางเคมีของเวย์

1.8.2.1 น้ำตาลแลคโตส เป็นน้ำตาลที่พบในน้ำนมเท่านั้น ในน้ำนมวัวมีน้ำตาลแลคโตสอยู่ประมาณร้อยละ 4.7 ต่ำกว่าในน้ำนมมนุษย์ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสอยู่ประมาณร้อยละ 6.3 น้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลชนิดรีดิวซิง (reducing sugar) มีสูตรโครงสร้าง คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ และเมื่อถูกไฮโดรไลส์จะได้น้ำตาล 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส ดังสมการต่อไปนี้

$$\underset{\text{lactose}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{glucose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{galactose}}{C_6H_{12}O_6}$$



รูปที่ 1.8 แสดงสูตรโครงสร้างของน้ำตาลแลคโตสที่ถูกไฮโดรไลซ์

ที่มา : http://www.indiana.edu/~ensiweb/lessons/tp.2.gif

1.8.2.2 โปรตีน โปรตีนในเวย์เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนในน้ำนมซึ่งเป็นโปรตีนตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง โปรตีนในเวย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ เบตาแลคโตโกลบูลิน (β–lactoglobulin) และแอลฟาแลคทอลบูมิน (α–lactalbumin) โดยเบตาแลคโตโกลบูลินจะมีอยู่ประมาณร้อยละ 50 – 60 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือเจือจาง สามารถตกตะกอนได้ด้วยเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตและเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในแง่การให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลว (วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2532) ส่วนแอลฟาแลคทอลบูมิน มีอยู่ประมาณร้อยละ 15-20 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนได้เมื่อถูกความร้อน ส่วนที่เหลือ คือ ซีรัมอัลบูมิน อิมมูโนโกลบูลิน เอนไซม์ต่างๆ และโปรตีนอื่นๆ

1.8.3 การใช้ประโยชน์จากเวย์

ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง พบว่าจะมีน้ำเวย์ซึ่งเป็นผลพลอยจากการผลิตนั้นเป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปเวย์จะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง ถ้าเปรียบเทียบค่า BOD ระหว่างน้ำเสียที่ปล่อยลงแม่น้ำลำคลองควรบำบัดน้ำจนมีค่า BOD เหลือประมาณ 20 แต่เวย์มีค่า BOD อยู่ระหว่าง 4000–4800 ซึ่งก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม (Scott. 1986) ดังนั้นการนำน้ำเวย์ที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งมาใช้ประโยชน์จึงน่าจะเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มคุณค่าให้กับน้ำเวย์และลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียได้ ดังนั้นนักวิจัยจึงได้ศึกษาหาทางนำเวย์มาใช้ประโยชน์มีรายงานดังนี้

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาการนำเวย์มาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. delbrueckii* โดยเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 36 และยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร พบว่ากรดแลกติกที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างได้คือ 40 กรัมต่อลิตร ภายใน 84 ชั่วโมง

Bogdanova (1974) ได้ศึกษาการนำเวย์มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโดยการนำเวย์มาพาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 95–97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 35–40