

รายงานโครงการวิจัยเงินงบประมาณปีพ.ศ. 2554 ฉบับสมบูรณ์

เรื่อง การประยุกต์ใช้สารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรงเขมา (*Cissampelos pareira* L.)
ในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965
เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก

Application of Pectin Crude Extracts from Krung Kha Mao Leaves
(*Cissampelos pareira* L.) to Immobilized Cells of
Propionibacterium acidipropionici ATCC 4965 for Propionic acid Production

โดย

รศ.สุขใจ ชูจันทร์

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการประยุกต์ใช้สารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรงเชมา (*Cissampelos pareira* L.) ในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากเงินงบประมาณปีพ.ศ. 2554

ขอขอบคุณ บริษัท Minor Cheese Limited สำหรับความอนุเคราะห์น้ำเวย์ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นำมาใช้ในงานวิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
เนื้อเรื่อง	4
วิธีการทดลอง	27
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
สรุปผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง	39

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบ เพคตินจากใบกรงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์และการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ คือ ใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.52 มิลลิเมตร โดยใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมาร้อยละ 4 และใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่า *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 20.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระซึ่งสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 19.24 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เช่นกัน และเมื่อศึกษาการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ พบว่าสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้ 5 รอบการหมัก

ABSTRACT

The research was performed the application of pectin crude extracts from Krung Kha Mao leaves (*Cissampelos pareira* L.) to immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 for propionic acid production. Optimal conditions effecting to immobilization and propionic acid production were investigated. The results indicated that optimal conditions for immobilization were 4% pectin concentration, 1.52 mm inner diameter of silicone tube and 5% (v/v) inoculum for immobilization. The maximum concentrations of propionic acid was 20.5 g/l (216h), when produced by pectin crude extracts immobilized *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965. Whereas, the concentration of propionic acid produced by free cell of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 was 19.24 g/l (216h). The immobilization of pectin crude extracts immobilized *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 could be reuse up to 5 batch cycles.

บทนำ

กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทราและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Colomban และคณะ,1993) จึงนิยมใช้เป็นสารกันบูดในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ขนมปังและอาหารสัตว์ (Quesada-Chanto และคณะ,1994) โดยนิยมใช้ในรูปแบบของเกลือแคลเซียม เกลือโซเดียมและเกลือโพแทสเซียม (Yang และคณะ,1994) นอกจากนี้กรดโพรพิโอนิกยังใช้เป็นส่วนผสมในยาควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจ และเป็นสารให้กลิ่นรส (Himmi และคณะ,2000) อีกทั้งยังใช้ในอุตสาหกรรมการทำพลาสติกในรูปของเซลลูลอส โพรพิโอเนต (Barbirato และคณะ,1997) ในประเทศไทย พบว่ายังไม่มีการผลิตกรดโพรพิโอนิกในเชิงพาณิชย์ กรดโพรพิโอนิกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพ การผลิตเพื่อการค้านิยมผลิตโดยกระบวนการทางเคมี (Himmi และคณะ,2000) เนื่องจากได้ผลผลิตสูงและรวดเร็ว แต่ใช้สารเริ่มต้นที่เป็นอันตรายและก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น Propionaldehyde, methyl propylketone ซึ่งต้องใช้ต้นทุนสูงในการผลิตในช่วงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยลดขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และไม่เป็นพิษ (Paik และ Glatz,1994)

กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ นิยมใช้เชื้อแบคทีเรียสกุล *Propionibacterium* sp. และการใช้แบคทีเรียโพรพิโอนิกสามารถลดต้นทุนการผลิตและผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีความเป็นพิษ ซึ่งสามารถใช้กับอุตสาหกรรมประเภทอาหารได้ (Colomban และคณะ,1993)ซึ่งข้อจำกัดในการผลิตกรดโพรพิโอนิกทางชีวภาพจะใช้เวลาในการหมักนานและได้ผลผลิตกรดในปริมาณน้อย (Himmi และคณะ,2000) เช่น การหมักแบบกะสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เพียงร้อยละ 1-3 ซึ่งใช้เวลาในการหมัก 7-14 วัน (Schuppert และคณะ,1992); (Jefferson และคณะ, 2008); (Zhang และYang ,2009) ดังนั้นจึงได้มีการคิดหาวิธีเพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีต่างๆ เช่น การตรึงเซลล์ (Sowannakham และYang ,2005); (Zhang และYang ,2009) การใช้ระบบการหมักแบบกึ่งกะ(Goswami และ Srivastava ,2000); (Zhang และYang ,2009) การใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (Paik และ Glatz ,1994); (Kouya และคณะ,2008) และการคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโพรพิโอนิก (Jefferson และคณะ, 2008)

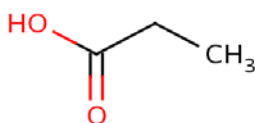
การตรึงเซลล์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในระบบการหมักจากจุลินทรีย์มีการนำเซลล์ตรึงมาใช้ในการหมัก การผลิตกรดอินทรีย์ กรดอะมิโน เอนไซม์ และยาปฏิชีวนะ ซึ่งพบว่าการใช้เซลล์ตรึงสามารถควบคุมกระบวนการหมักได้ง่าย และให้ผลผลิตดีกว่า รวมถึงมีความคงตัวมากกว่าการใช้เซลล์อิสระ(Jianlong, 2000) สำหรับวัสดุที่นิยมนำมาใช้ในการตรึงเซลล์ส่วนใหญ่ได้แก่ แอลจิเนต คาราจีแนน เพคติน และวุ้น (Roy และคณะ, 1987; Goksungur และคณะ, 2005) แต่ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วัสดุในการตรึงที่ได้จากธรรมชาติ คือใบกรูงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ซึ่งมีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น ใบหมาน้อย หรือใบกรูงบาตาล เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ *Menispermaceae* พบมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้มีการศึกษาพบว่าใบกรูงเขมา มีเพคตินเป็นส่วนประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 25-40 (พิเชษฐ เทบำรุง, 2546) เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย

ในการผลิต และใช้ทรัพยากรทางธรรมชาติที่มีอยู่ให้คุ้มค่า จึงมีความน่าสนใจที่จะนำไบกรูงเขามาสกัดเพื่อนำเพคตินมาใช้ประโยชน์เป็นวัสดุในการตรึงเซลล์

เนื้อเรื่อง

1.1 คุณสมบัติของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิกจัดเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ได้จากการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทรา นอกจากนี้ยังพบกรดโพรพิโอนิกตามธรรมชาติได้ในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ในเหงื่อของคนและในอาหารประเภทหมักดอง เป็นต้น กรดโพรพิโอนิก มีสูตรโมเลกุล คือ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ สูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก แสดงดังตารางที่ 1.1



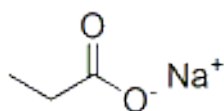
รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของกรดโพรพิโอนิก

ที่มา : http://bmr.b.wisc.edu/metabolomics/standards/propionic_acid/lit/3463.png

สืบค้นข้อมูลวันที่ 5 ตุลาคม 2553

1.2 ความสำคัญของกรดโพรพิโอนิก

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



รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของโซเดียมโพรพิโอเนต

ที่มา : <http://www.chemicalbook.com/CAS%5CGIF%5C137-40-6.gif>

นบ

สืบค้นข้อมูลวันที่ 5 ตุลาคม 2553

ตารางที่ 1.1 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดโพรพิโอนิก

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ	กรดโพรพิโอนิก
น้ำหนักโมเลกุล	74.08
Conversion factor	1 พีพีเอ็มเท่ากับ 3.02 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตรเท่ากับ 0.3 พีพีเอ็ม 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 ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งให้ใช้ได้ ปริมาณสูงสุดไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 1 กิโลกรัม (ศิวาพร, 2546) สำหรับผลิตภัณฑ์ประเภทขนมปัง ให้ใช้ได้ ปริมาณสูงสุดไม่เกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 1 กิโลกรัม (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2527 ฉบับที่ 84 เรื่องวัตถุเจือปนในอาหาร) นอกจากนี้มีรายงานการใช้กรดโพรพิโอนิกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนี้ Vandegrift และคณะ (1975) รายงานการใช้กรดโพรพิโอนิกความ

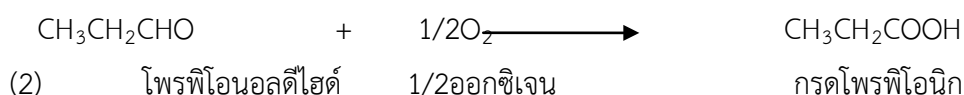
Racker และคณะ (1992) รายงานว่าการกรีดโพธิ์ไอนิก้าร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในข้าวโพดที่มีความชื้นร้อยละ 26.8 และ 29.6 ได้ตลอดการทดลอง 42 สัปดาห์

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

กรดโพธิ์โอนิกสามารถผลิตได้ 2 วิธี ดังนี้

1.3.1 กระบวนการผลิตกรดโพर्फิโรนิกด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี ในปัจจุบันการผลิตกรดโพर्फิโรนิกในเชิงพาณิชย์นิยมใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากใช้เวลาในการผลิตสั้น และได้ผลผลิตตามต้องการ โดยใช้ปฏิกิริยาการออกซิเดชันของโพर्फิรอนอลดีไฮด์ที่อุณหภูมิ 40–50 องศาเซลเซียส

ดังสมการที่ 1 และ 2



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

1.3.2 กระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ สำหรับกระบวนการผลิตกรดโพรพิโอนิกด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Propionibacterium* อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากผลผลิตที่ได้มีปริมาณน้อยโดยมีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

Woskow และ Glatz (1991) รายงานผลการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้กลูโคสและแลคโตสจากหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้เชื้อ *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 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 มิลลิกรัม ธาตุโคบอลต์ 0.75 มิลลิกรัม และ 5,6 ไดเมทิลเบนซิมิดสโซล 0.3 มิลลิกรัม เป็นปริมาณแร่ธาตุที่จำเป็น นอกเหนือจากแหล่งไนโตรเจน ฟอสเฟต และแมกนีเซียม ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของซูโครสที่ปริมาณ 30 ถึง 170 กรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลให้เกิดการยับยั้งจากซัสเตรตและสำหรับการผลิตเพื่อให้ได้กรดโพรพิโอนิกนั้นต้องทำในสภาวะที่ไม่มีอากาศ 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) ศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพเพื่อเปลี่ยนเอมิเซลลูโลสเป็นกรดโพรพิโอนิก ในการศึกษาใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ส่วนที่ได้จากการย่อยเอมิเซลลูโลส 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 จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *P. acidipropionici*

Martinez-Campos และ Torre (2002) ทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ในสภาพการหมักแบบกึ่งกะ มีการเติมกลูโคสและแลคเตต ซึ่งกลูโคสและ แลคเตตจะถูกใช้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน การใช้กลูโคสและแลคเตตร่วมกันจะเพิ่มอัตราการผลิตโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต (P/A) และยังเป็น การเพิ่มส่วนของธาตุคาร์บอนสำหรับที่จะนำไปใช้ในการผลิตชีวมวล ผลผลิตของโพรพิโอเนตต่ออะซิเตตเท่ากับ 7.6 เมื่อใช้แลคเตตและกลูโคสผสมกันที่อัตราส่วน 4 โมลาร์ อัตราส่วนโพรพิโอเนตต่ออะซิเตต เท่ากับ 1.34 เมื่อใช้แลคเตตอย่างเดียว และ 1.85 เมื่อใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียว

Suwannakham และ Yang (2005) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4875 เปรียบเทียบระหว่างการใช้เซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงใน ถังหมักแบบ fibrous bed ให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 71.8 ± 0.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าการผลิตกรดโพรพิโอนิกโดยใช้เซลล์อิสระถึงร้อยละ 20-59

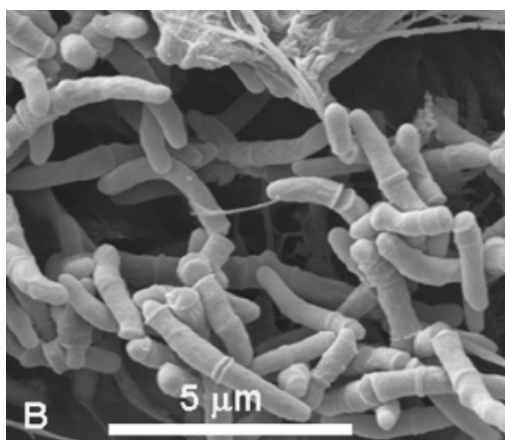
วรัญญา (2550) ศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเซลล์ของเชื้อ *P. freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงในน้ำล้างซากไก่ พบว่ามีการผลิตกรดโพรพิโอนิกออกมามากกว่าในเซลล์ (1.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่าในเซลล์ (1.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ปริมาณกรดโพรพิโอนิกผลิตได้ในอาหาร 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 ซึ่งในกระบวนการหมักจะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ทำให้เกิดลักษณะรูพรุนในเนือเนยแข็ง แบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์อะไมเลส มีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ รูปร่างกลม ท่อนยาว อาจพบในลักษณะเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่ มีการเจริญแบบแพคิลเททิฟแอนแอโรบ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิก ชักซินิก 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

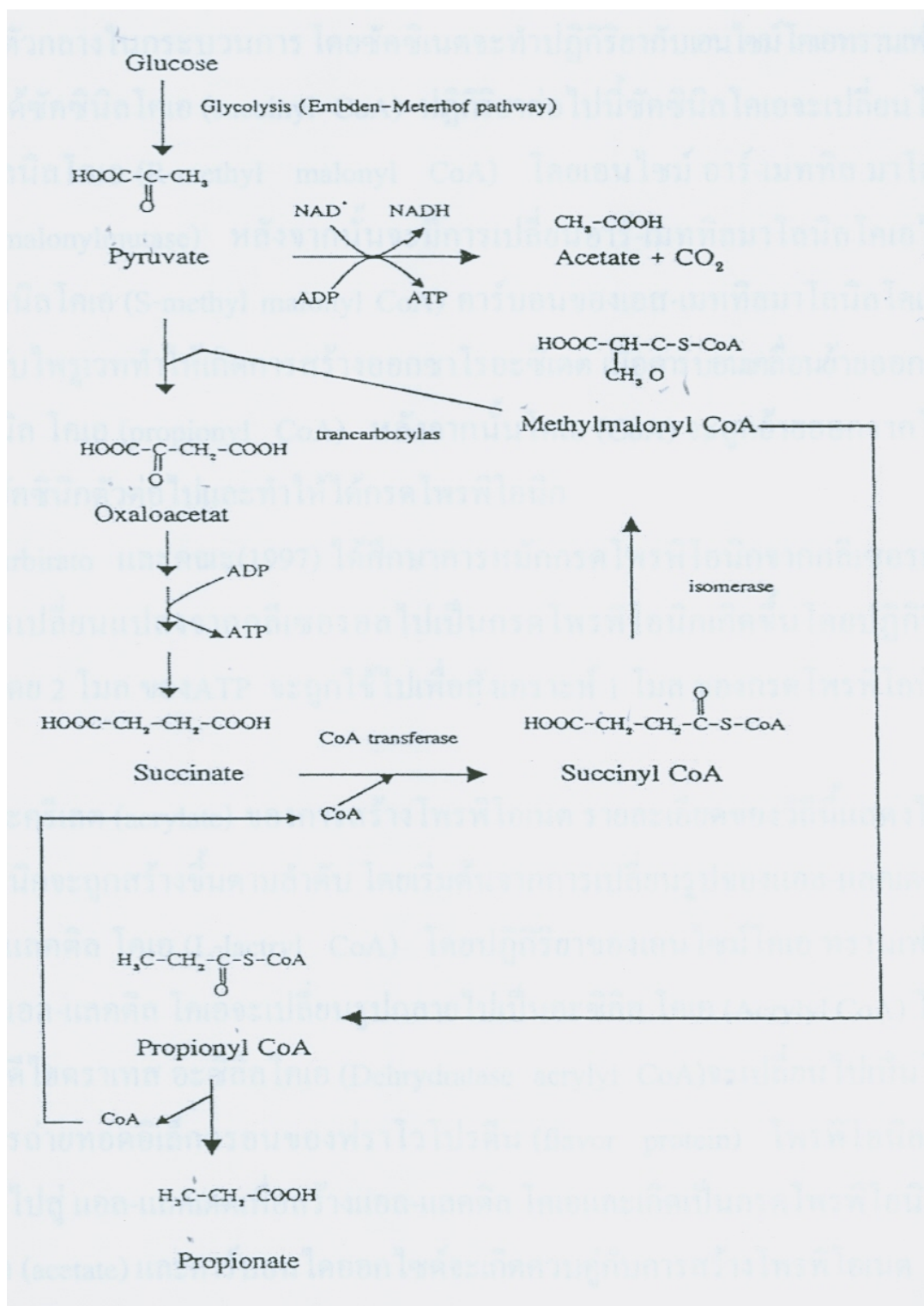
สปีชีส์	สายพันธุ์อ้างอิง	กรดโพรพิโอนิก (70 ชั่วโมง) กรัมต่อลิตร	พีเอช
<i>P. acidipropionici</i>	ATCC 4965	9.8	4.65
	CNRZ 287	7.5	4.67
	CNRZ 721	2.0	5.67
	CNRZ 733	0.0	4.40
<i>P. thoenii</i>	ATCC 4871	8.0	4.62
<i>P. jensenii</i>	ATCC 4870	0.0	5.82
	CNRZ 83	2.0	5.10
	ATCC 4867	0.0	5.10
	CNRZ 731	0.0	4.11
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>eudenreichii</i>	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
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	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 วิธีการเกิดกรดโพรพิโอนิก

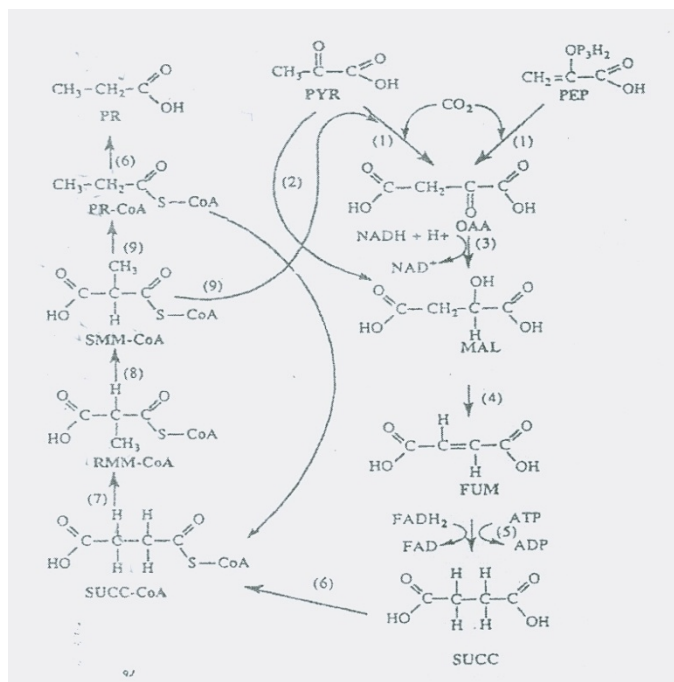
การผลิตกรดโพรพิโอนิกเกิดขึ้นได้หลายวิธี ซึ่งคาร์บอนจากแหล่งต่างๆจะถูกใช้ในการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Propionibacterium* โดยเริ่มจากสารตัวกลางที่สำคัญคือ ไพรูเวท ออกซาโรอะซิเตต มาเลท ซักซิเนต และโพรพิโอเนต ตามลำดับ ที่ได้มาจากกลูโคส แสดงดังรูปที่ 1.4 (Daniel, 1995) หรือ แลคเตต แสดงดังรูปที่ 1.4 การสร้างซักซิเนตและโพรพิโอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ แสดงดังรูปที่ 1.5 โดยเริ่มต้นจากการสร้างออกซาโลอะซิเตตด้วยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้กับไพรูเวทหรือให้กับฟอสโฟอินอลไพรูเวท (PEP) และถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอล-มาเลท (L-malate) โดยการทำงานของเอนไซม์มาลิกดีไฮโดรจิเนส (malic dehydrogenase) ซึ่งกรดมาลิกที่ได้จะถูกดึงน้ำออกโดยเอนไซม์ฟูมาเรส (fumarase) ทำให้ได้กรดฟูมาริก (fumaric acid) ปฏิกริยานี้ผันกลับได้ จากนั้นกรดฟูมาริกจะถูกเปลี่ยนให้เป็นซักซิเนตโดยเอนไซม์ฟูมาเรตรีดักซ์เตส (fumarate reductase) ซึ่งซักซิเนตจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในกระบวนการ โดยทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โคเอธรานเฟอเรส (CoA transferase) ได้ซักซินิลโคเอ (succinyl CoA) ปฏิกริยาต่อไปซักซินิลโคเอจะเปลี่ยนเป็นอาร์-เมทิล มาโลนิลโคเอ (R-methyl malonyl CoA) โดยเอนไซม์อาร์-เมทิล มาโลนิลมิวเตส (R-methyl malonylmutease) หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนอาร์-เมทิลมาโลนิลโคเอไปเป็นเอส-เมทิลมาโลนิลโคเอ (S-methyl malonyl CoA) ซึ่งคาร์บอนของเอส-เมทิลมาโลนิลโคเอจะถูกย้ายออกไปรวมกับไพรูเวท ทำให้เกิดการสร้างออกซาโลอะซิเตต เมื่อคาร์บอนเคลื่อนย้ายออกไปจะทำให้ได้โพรพิโอนิลโคเอ (propionyl CoA) จากนั้นโคเอ (CoA) จะถูกย้ายออกจากโมเลกุลเพื่อนำไปใช้กับซักซินิกตัวต่อไป ทำให้ได้กรดโพรพิโอนิกออกมาในที่สุด

วิธีอะครีเลต (Acrylate) ของการสร้างโพรพิโอเนต รายละเอียดของวิธีนี้แสดงดังรูปที่ 1.6 กรดโพรพิโอนิกจะถูกสร้างขึ้นตามลำดับ เริ่มต้นจากการเปลี่ยนรูปของแอล-แลกเตต (L-lactate) ไปเป็นแอล-แลกทิล โคเอ (L-lactyl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์โคเอ ทรานเฟอเรส (CoA transferase) จากนั้นแอล-แลกทิล โคเอ จะเปลี่ยนรูปไปเป็น อะครีลิล โคเอ (Acrylyl CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีไฮเดรราเทส อะครีลิล โคเอ (dehydratase acrylyl CoA) และเปลี่ยนเป็นโพรพิโอนิลโคเอ โดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของฟลาโวโปรตีน (flavor protein) ซึ่งโพรพิโอนิลโคเอจะย้ายโมเลกุลโคเอไปให้แอล-แลกเตตเพื่อสร้างแอล-แลกทิล โคเอ และเกิดเป็นกรดโพรพิโอนิกอิสระ สำหรับการสร้างอะซิเตตและคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดควบคู่ไปกับการสร้างโพรพิโอเนต วิธีการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยเชื้อ *P. acidipropionici* แสดงดังรูปที่ 1.7 วิธีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการย่อยแป้งและเซลลูโลส แสดงดังรูปที่ 1.8



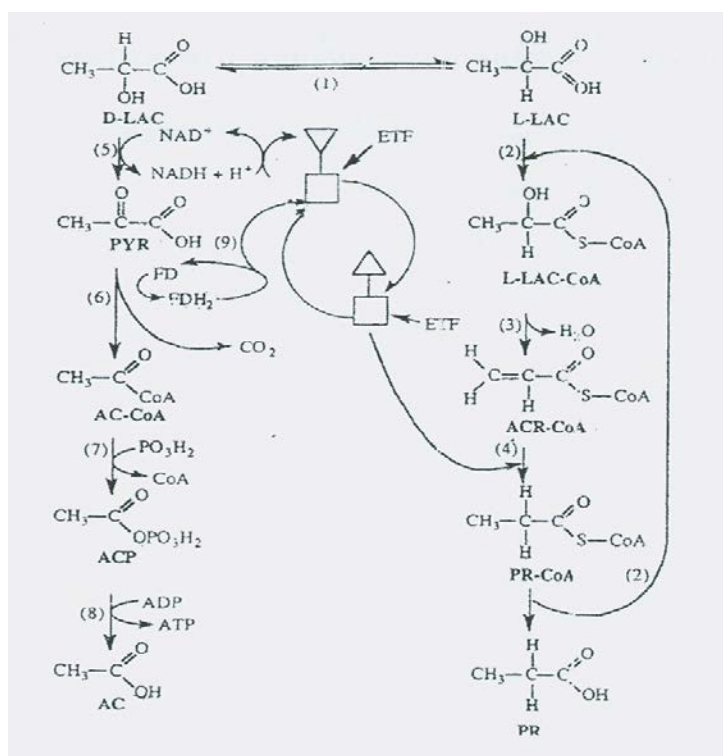
รูปที่ 1.4 วิธีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการหมักกลูโคสโดยเชื้อ *Propionibacterium*

ที่มา : Daniel (1995)



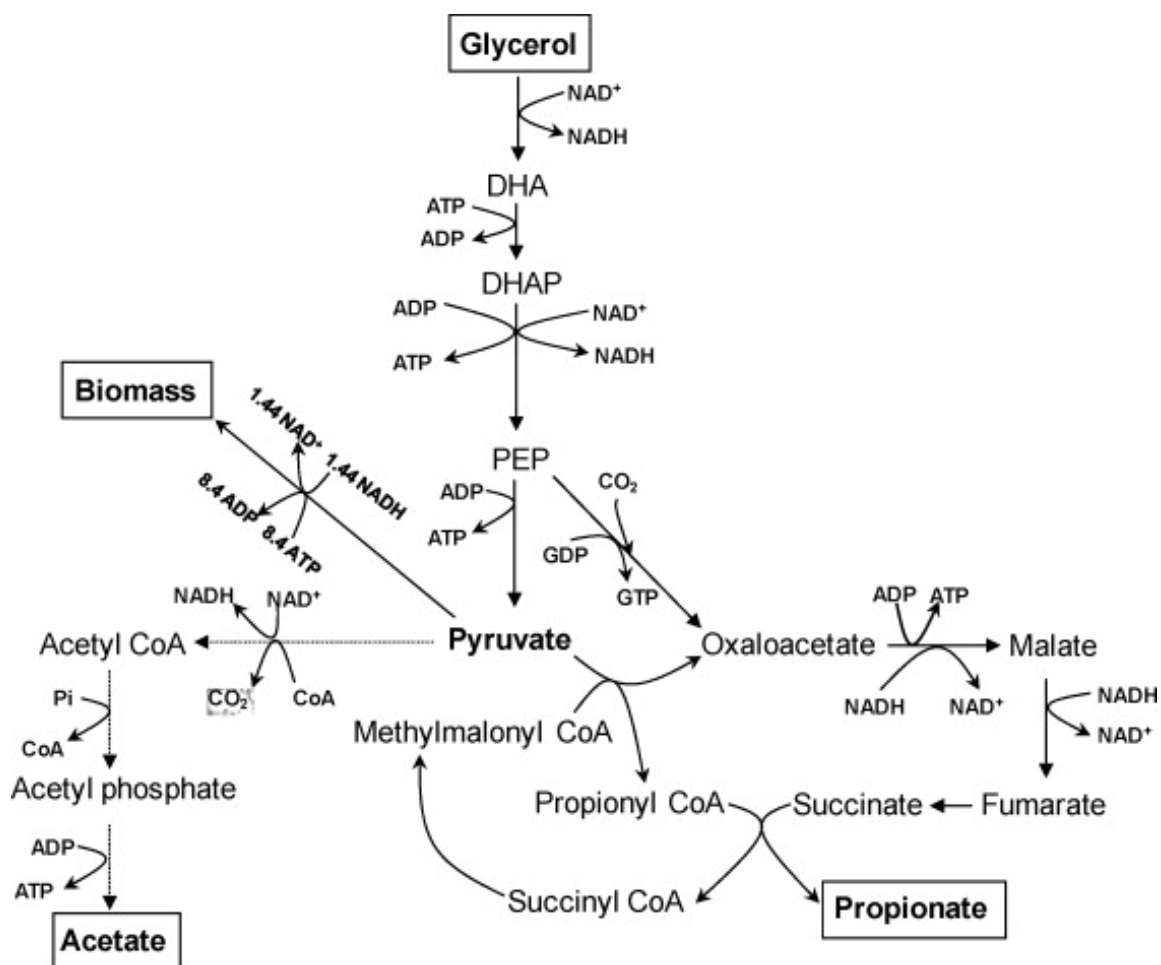
รูปที่ 1.5 การสร้างซัคซิเนตและไพรูฟิอเนตโดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

ที่มา : Daniel (1995)

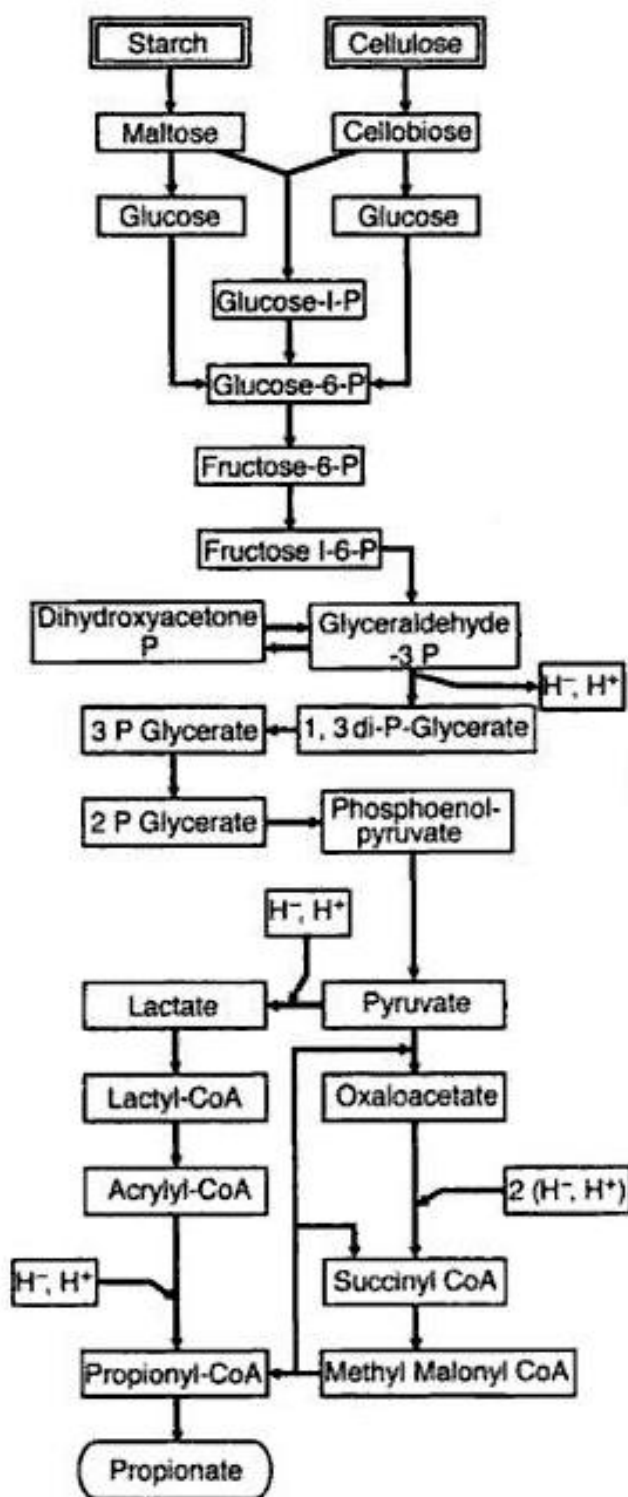


รูปที่ 1.6 วิถีอะครีเลตของการสร้างไพรูฟิอเนต

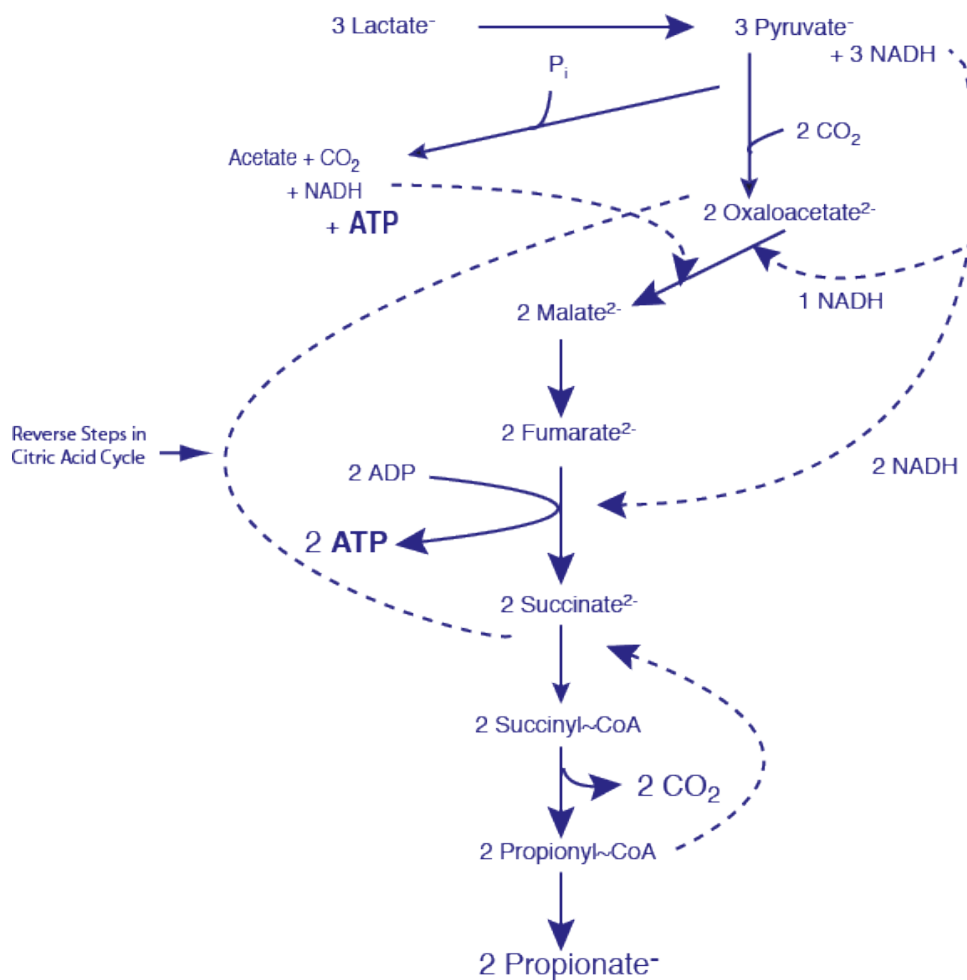
ที่มา : Daniel (1995)



รูปที่ 1.7 วิธีการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอลโดยเชื้อ *P. acidipropionici*
ที่มา : An Zhang และ Shang-Tian Yang (2009)



รูปที่ 1.8 วิธีการเกิดกรดโพรพิโอนิกจากการย่อยแป้งและเซลลูโลส
ที่มา : ดัดแปลงจาก J.P.F D'Mello (2000)



รูปที่ 1.9 วิธีการเกิดโพรพิโอเนตจากแลกเตต

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

มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการเกิดกรดโพรพิโอนิก ดังนี้

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

Zhang และ Yang (2009) ศึกษาการหมักกรดโพรพิโอนิกจากกลีเซอรอล พบว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงจากกลีเซอรอลไปเป็นกรดโพรพิโอนิก เริ่มจากโมลของกลีเซอรอลเปลี่ยนเป็นไพรูเวท โดยสร้าง NADH 2 โมเลกุล จากนั้นผ่านวิธีการสังเคราะห์กรดโพรพิโอนิก โดยจะมีการเปลี่ยน NADH เป็น NAD⁺ และยังคงรักษาสสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ไว้

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 พบว่ามีค่าน้อยกว่าการใช้กลูโคสมาก ดังนั้นการหมักโดยใช้กลีเซอรอลสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกที่มีความบริสุทธิ์สูงที่ซึ่งอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกรดอะซิติกเท่ากับ 22.4 ของกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์ ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่สูงที่สุดที่ได้จากการหมักกลีเซอรอล คือ ประมาณ 106 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเป็น 2.5 เท่าของความเข้มข้นมากที่สุดของ การรายงานก่อนหน้านี้ (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 และหลังจากการหมักชั่วโม่งที่ 133 ที่มีการใช้กากน้ำตาลเป็นซับสเตรต ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.77 ได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 8.23 ± 0.12 กรัมต่อลิตร และผลได้เท่ากับ 0.455 ± 0.002 กรัมต่อกรัม การผลิตกรดโพรพิโอนิกและชีวมวลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสในทุกกรณี อัตราการผลิตที่ดีที่สุด คือ การใช้แลคเตต มีค่า 0.113 กรัมต่อลิตรชั่วโม่ง 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 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร *P. acidipropionici* ATCC 4965 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุดเท่ากับ 11.53 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 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 และทรีปติเคสชอยบรอต พบว่าจะได้ปริมาณกรดสูงสุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดและทรีปติเคสชอยบรอตเติมลงไปในเวย์ปริมาณ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

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

1.6.3 แหล่งเกลือแร่

Quesada-Chanto และคณะ (1994) รายงานว่าเหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ *P. shermanii* โดยปริมาณ $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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 เมื่อใช้แลคเตต เป็นสารที่ใช้ในการหมักซึ่งมีพีเอชเริ่มต้น 6.6 จะได้ปริมาณกรดโพรพิโอนิกสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอช เริ่มต้นที่ 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 พบว่าค่า พีเอช เริ่มต้น 6.87 ให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

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

1.6.6 อุณหภูมิ

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

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

ซัสเตรตสูงสุด 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 32 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการให้ผลผลิตกรดโพรพิโอนิกมากที่สุด

1.6.7 การให้อากาศ

Menon และ Shemin (1967) ศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. shermanii* ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ อัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกจะต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

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 ใบก้นบิต (ภาคกลาง), สี่พัน (เพชรบุรี), เครือหมาน้อย (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ), เปล้าเลือด (แม่ฮ่องสอน), อะกามินเยะ (มลายู-นราธิวาส) กรุงเขมาเป็นไม้เถาที่เลื้อยไปตามต้นไม้อื่น ไม่มีมือเกาะ มีคุณสมบัติพิเศษคือเมื่อนำมาขยี้กับน้ำแล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เกิดลักษณะเป็นเจลหรือวุ้น เนื่องจากมีเพคตินเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก (สัมภาษณ์ คำผุย. 2533 ; เทียนศักดิ์ และคณะ. 2545 ; พิเชษฐ เทบำรุง. 2546) การกระจายพันธุ์ในประเทศไทยพบที่สามารถพบอยู่ทั่วไปแทบทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้พบที่มีการกระจายพันธุ์ที่ประเทศอินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย แอฟริกา และอเมริกา สภาพที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ ริมแม่น้ำลำธาร ในป่าผลัดใบ ตั้งแต่

พื้นที่ราบระดับน้ำทะเลจนถึงพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,100 เมตร (ราชบัณฑิตยสถาน. 2538 ; พิเชษฐ เทบำรุง. 2546 ; กษพรณ วงค์เจริญ. 2548) มีอนุกรมวิธานดังนี้ (สัมภาษณ์ คำผุย. 2533)

Kingdom Plantae
 Division Anthophyta
 Class Dicotyledonae
 Order Ranales
 Family Menispermaceae
 Genus Cissampelos
 Species pareira



รูปที่ 1.7 กรุงเขมา

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

1.7.2 ลักษณะพฤกษศาสตร์

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

ราก เป็นรากที่มีลักษณะอวบใหญ่ สีน้ำตาล มีหน้าที่สะสมอาหาร

ใบ มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปกลม รูปหัวใจหรือรูปไต ก้านปิด 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 โค่นติดกันเป็นรูปถ้วย ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยง ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของกลีบเลี้ยงเกสรเพศ ผู้มีดเดี่ยวยาวกว่ากลีบเลี้ยง อับเรณูติดกันเป็นรูปจาน ดอกเพศเมียออกเป็นช่อที่ง่ามใบ ช่อดอกยาวประมาณ 10-18 เซนติเมตร ก้านดอกสั้นมาก ใบประดับรูปกลม หรือรูปไข่ ช่อแน่นเหลื่อมกันแน่นไม่ร่วง ปลายเป็นติ่งหนาม มีขน กลีบเลี้ยง 1 กลีบ รูปขอบขนานแกมรูปไข่ กลีบดอก 1 กลีบ ออกตรงข้ามกับกลีบเลี้ยง และสั้นกว่า

ผล ผลสดเป็นแบบ drupe ค่อนข้างกลม เมื่อสุกจะมีสีแดง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.2 เซนติเมตร มีขน

เมล็ด เป็นเมล็ดเดี่ยว เล็ก แข็ง รูปไข่ หรือเป็นรูปเกือบกลม ผิวขรุขระ

1.7.3 การใช้ประโยชน์จากกรงเขมา

สรรพคุณของกรงเขมาในตำรายาไทยมีมากมาย เนื่องจากทุกส่วนของกรงเขมาสามารถนำมาใช้เป็นยา รักษาโรคและช่วยบำรุงร่างกาย ได้แก่

ราก สรรพคุณในการแก้ไข้ แก้ดีริ้ว ดีชัน เป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงอวัยวะเพศให้แข็งแรง แก้ลม โลหิตกำเริบ แก้โรคตา ขับปัสสาวะ แก้อาการบวม น้ำ แก้ทางเดินปัสสาวะอักเสบกระเพาะปัสสาวะอักเสบ แก้กระหายน้ำ แก้ไข้ใน แก้ปวดท้อง แก้โรคฝีดาษ บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย เป็นยาระบาย แก่ท้องร่วง ในรากมีสารสำคัญ พวกอัลคาลอยด์ในปริมาณสูง (พะยอม ต้นตีวัฒน์. 2521; วุฒิ ธรรมเวช. 2540)

เถา สรรพคุณในการดับพิษไข้ทุกชนิด บำรุงโลหิตสตรีให้สมบูรณ์ แก่ระดูพิการ

ใบ สรรพคุณในการใช้ทาแก้โรคผิวหนัง แก้หิด รักษา укут ปอกแผล ฝี แก่ร้อนใน ใบจะมีสารพวกเพคติน (พะยอม ต้นตีวัฒน์. 2521 ; ชยันต์ และคณะ. 2542)

นอกจากนั้นมีการนำใบกรงเขมาบรีโศก โดยนำใบที่เจริญเต็มที่มาขยี้กับน้ำสะอาด กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวขึ้น แล้วปล่อยให้เจลดหรือที่เรียกว่า วุ้น หนาน้อยจึงนำมารับประทาน (จิรศักดิ์ ศรีสมศักดิ์ และ ธนากร อัมปะเทศ. 2543)

1.7.4 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการสกัดเพคตินจากใบbrugema

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 คำฟู (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 และสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.1 สภาวะที่ใช้การสกัดคืออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที พบว่าการใช้สารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.1 ทำให้ได้ปริมาณเพคตินมากที่สุดเนื่องจากเป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพโดยจะไปไฮโดรไลส์โปรตีนเพคตินให้เป็นเพคตินที่ละลายน้ำได้ และพบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่นได้เพคตินมีคุณภาพมากที่สุดโดยคุณภาพของเพคตินวัดจากปริมาณเมทิลเอสเทอร์ และกรดกาแลคทูโรนิกในเพคติน และพบว่าเพคตินที่สกัดจากใบหมาน้อยเป็นเพคตินชนิดที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำ

จิราภรณ์ สังข์ผุด (2549) ศึกษาการผลิตเพคตินผงจากbrugemaด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และกรดซิตริกร้อยละ 7 ใช้อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย 1:40 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพคตินประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ สกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ฟอกสีด้วยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 0.2 ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 จากนั้นอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณเพคตินเท่ากับร้อยละ 21.65 ± 0.18 และ 48.48 ± 0.35 (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับพบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่น มีปริมาณกรดกาแลคทูโรนิกสูงสุด (ร้อยละ 76.45 ± 0.13) มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 8.08 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำ

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

ลักษณะอ่อนนุ่ม แต่การสกัดที่ พีเอช 2 จะเกิดเจลได้ช้าแต่เจลมีความแข็งแรงกว่า ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีของ เพคติน

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

1.8 เวย์ (whey)

เวย์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตเนยแข็งหรือการแยกเคซีนจากนมสด เวย์มีลักษณะเป็นของเหลวใสมีสีค่อนข้างขาวอมเหลือง (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) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งชนิดแข็ง เช่น เชดดาร์ (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) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตกตะกอนนม โดยการเติมกรดหรือเกลือแร่ลงไปโดยตรงในการผลิตเนยแข็งชนิดอ่อน เช่น คอทเทจ (Cottage) เป็นต้น มีค่าความเป็นกรดประมาณร้อยละ 0.40-0.60 และมีค่าพีเอชระหว่าง 4.0-5.0 (Kosikowski. 1977) สรุปองค์ประกอบที่แตกต่างของเวย์ทั้งสองชนิดดังตารางที่ 1.3

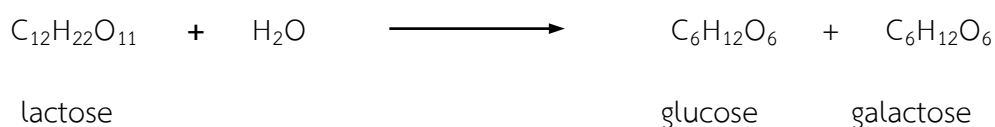
ตารางที่ 1.3 องค์ประกอบโดยประมาณของสวิตเวย์และแอซิดเวย์

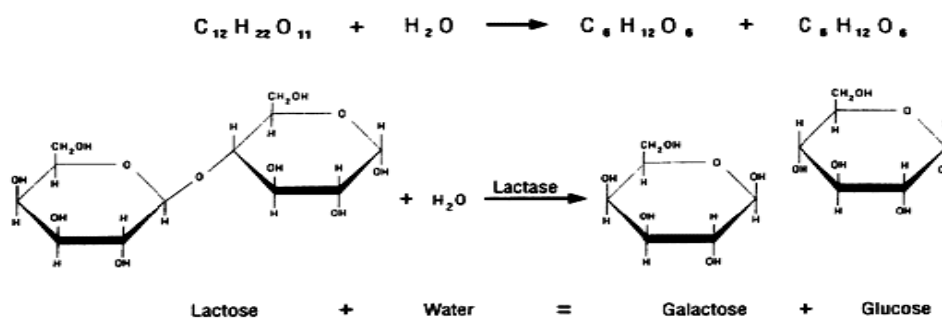
องค์ประกอบ (ร้อยละ)	สวิตเวย์		แอซิดเวย์	
	เขตดา	เกาดา	แลคติกแอซิด (คอกเทล)	ไฮโดรคลอริก/ ซัลฟิวริก แอซิด เวย์ (เคซีน)
ปริมาณของแข็ง	6.00	5.50	6.00	6.30
น้ำ	94.00	94.50	94.00	93.70
ไขมัน	0.06	0.05	0.05	0.05
โปรตีน	0.80	0.68	0.80	0.80
เถ้า(เกลือแร่)	0.50	0.45	0.67	0.80
น้ำตาลแลคโตส	4.49	4.18	3.63	4.50
กรดแลคติก	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





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 แต่ละลายในสารละลายเกลือเจือจางสามารถตกตะกอนได้ด้วยเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตและเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในแง่การให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลว (วรรณา ตั้งเจริญชัย, 2532) ส่วนแอลฟาแลคทอลบูมิน มีอยู่ประมาณร้อยละ 15-20 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนได้เมื่อถูกความร้อน ส่วนที่เหลือ คือ ซีรัมอัลบูมิน อิมูโนโกลบูลิน เอนไซม์ต่างๆ และโปรตีนอื่นๆ

1.8.3 การใช้ประโยชน์จากเวย์

ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง พบว่าจะมีน้ำเวย์ซึ่งเป็นผลพลอยจากการผลิตนั้นเป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปเวย์จะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง ถ้าเปรียบเทียบค่า BOD ระหว่างน้ำเสียที่ปล่อยลงแม่น้ำลำคลองควรบำบัดน้ำจมนี้อาจมีค่า BOD เหลือประมาณ 20 แต่เวย์มีค่า BOD อยู่ระหว่าง 4000-4800 ซึ่งก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม (Scott, 1986) ดังนั้นการนำน้ำเวย์ที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งมาใช้ประโยชน์จึงน่าจะเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มคุณค่าให้กับน้ำเวย์และลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียได้ ดังนั้นนักวิจัยจึงได้ศึกษาหาทางนำเวย์มาใช้ประโยชน์มีรายงานดังนี้

Arasaratnam และคณะ (1996) ศึกษาการนำเวย์มาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดแลคติกโดยใช้เชื้อ *L. delbrueckii* โดยเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรที่ช่วงเวลาที่ 36 และยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร พบว่ากรดแลคติกที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างได้คือ 40 กรัมต่อลิตร ภายใน 84 ชั่วโมง

Bogdanova (1974) ได้ศึกษาการนำเวย์มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโดยการนำเวย์มาพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 95-97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 35-40

องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหมუნเหวี่ยงเอาเฉพาะส่วนใสมาเติมหัวเชื้อ *L. acidophilus* 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* พบว่าสามารถ เปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 94.37) 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

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

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องเขย่าของ บริษัท Gallenkamp

เครื่องอบร้อนของ บริษัท Binder

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

ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

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

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

โถดูดความชื้น

ปิกเกอร์ (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

ลวดเลี้ยงเชื้อ (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 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

แลคโตส (lactose)

ยีสต์สกัด (yeast extract)

เอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

โซเดียมแอลจีเนต (sodium alginate) ของบริษัท Carlo Erba^R

เพคตินจากส้ม(citrus pectin)ของบริษัท Sigma^R

เพคตินจากแอปเปิ้ล (apples pectin)ของบริษัท Fluka^R

เพคตินจากบริษัท Himedia^R

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 แยกไขมันโดยกรองด้วย กระดาษกรองGlass fiber (GC-50) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จะได้น้ำเวย์ที่พร้อมใช้ในการทดลอง

1.11 การสกัดเพคตินจากใบกรูงเขมา (ประยุกต์จาก พิเชษฐ เทบำรุง. 2546)

ใบกรูงเขมาใช้ในงานวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขต สกลนคร 199 หมู่ 3 ถ.พังโคน-วาริชภูมิ อ.พังโคน จ.สกลนคร 47160

1.11.1 การเตรียมตัวอย่างใบกรูงเขมา

นำใบกรูงเขมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (blender) แล้วชั่ง 10 กรัม นำมาเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองเอาสารละลายทิ้งไป นำใบหรือน้ำย่อยที่ได้จากการกรองมาเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาใบหรือน้ำย่อยแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสให้แห้งสนิท

1.11.2 ขั้นตอนการสกัดเพคตินจากไบโหมำน้อย

นำไบโหมำน้อยที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้ว ซึ่ง 5 กรัม ใส่ปิกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร นำไปสกัดเพคตินแบบร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นกรองแยกเอากากของไบโหมำน้อยออกจนหมด แล้วนำสารละลายที่ได้จากการกรอง มาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum evaporator) ให้เหลือ 1 ใน 3 ส่วนของสารละลาย จากนั้นนำมาตกตะกอนเพคตินโดยเติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนของสารละลายเพคตินต่อสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 1:2 โดยปริมาตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง กรองแยกเอาตะกอนเพคติน แล้วล้างตะกอนเพคตินด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 4-5 ครั้ง หลังจากนั้นอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บดเป็นผงร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh ซึ่งน้ำหนักของเพคตินที่ได้แล้วนำไปคำนวณหาร้อยละของปริมาณเพคติน

1.12 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

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

1.12.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 ใช้หลอดเชื้อแล้วลาก (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 หลอดลงในอาหารเหลว 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 ทริปติเคสชอยบรอต 0.25 กรัมต่อลิตร ไดโพลเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร และ แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ปรับพีเอชให้ได้ $6.5 (\pm 0.1)$ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

อาหารที่ใช้ในอาหารหมักในระดับฟลาสก์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตร (ร้อยละ 70) 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 เพื่อล้างแคลเซียมไอออนที่มากเกินไปและตัวเซลล์ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้ม จะได้เม็ดเจลเซลล์ตรึงที่ได้ไปใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก

1.15 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาเพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับฟลาสก์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965

- ศึกษาความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา ร้อยละ 3, 4 และ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- ศึกษาปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ร้อยละ 3, 5 และ 7 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
- ศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสายยาง 0.89, 1.52 และ 2.02 มิลลิเมตร

จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาเพาะเลี้ยงในอาหารทางนมปริมาตร 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

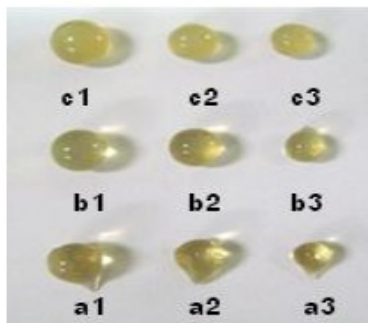
นำน้ำหมักมาวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิก น้ำตาลแลคโตสที่เหลือ และวัดค่าพีเอช โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกด้วยเครื่อง HPLC (high-performance liquid chromatography) ใช้คอลัมน์ Inertsil C8-3 เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.7 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (Deionize water) และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (ประยุกต์จากญานี สัตะนันท์. 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 จากนั้นนำเซลล์ตรึงมาหมักในอาหารทางนมปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะตั้งนิ่ง เป็นเวลา 432 ชั่วโมง เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวัดปริมาณกรดโพรพิโอนิก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 คือ ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมาร้อยละ 4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสายยาง 1.52 มิลลิเมตร และพบว่าเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เท่ากับ 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 จึงทำให้ความสามารถในการผลิตกรดโพรพิโอนิกลดลง และพบว่าการใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรุงเขมา

ความเข้มข้นร้อยละ 4 สามารถผลิตกรดโพธิ์ฟอนิกได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ และเม็ดเจลมีความคงตัวไม่เปลี่ยนรูปในระหว่างการทดลอง ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับการนำมาตรึงเซลล์



รูปที่ 1.9 แสดงผลการตรึงเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเข็มที่ความเข้มข้นต่างๆ (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) พบว่าการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อการเพิ่มการผลิตกรด และ เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นจนถึงร้อยละ 5 สามารถผลิตกรดโพธิ์ฟอนิกได้สูงสุด อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากกว่าร้อยละ 5 ไม่ส่งผลให้การผลิตกรดโพธิ์ฟอนิกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากข้อจำกัด (substrate limitation) เนื่องจากเซลล์ภายในเม็ดเจลเกิดการแย่งอาหารเพื่อนำไปใช้สำหรับการเจริญและการผลิตกรดโพธิ์ฟอนิก

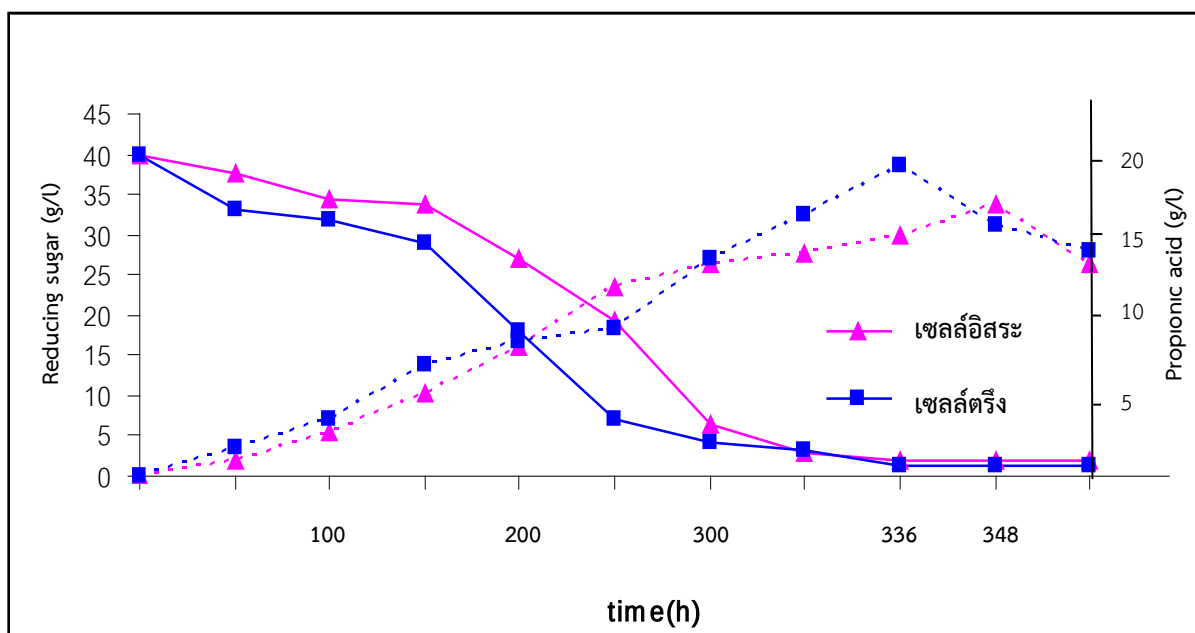
สำหรับผลการศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 0.89, 1.52 และ 2.02 มิลลิเมตร ซึ่งขนาดของสายยางมีผลต่อขนาดของเม็ดเจล พบว่าการใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยาง 2.02 มิลลิเมตร ทำให้เกิดเม็ดเจลขนาดใหญ่ (รูปที่ 1.9) ไม่ส่งผลให้การผลิตกรดโพธิ์ฟอนิกเพิ่มมากขึ้น แต่ในขณะที่การใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของสายยางที่มีขนาดเล็กทำให้เกิดเม็ดเจลขนาดเล็ก (รูปที่ 1.9) ทำให้เม็ดเจลมีพื้นที่ผิวมากขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลของสารอาหารสามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้เร็วกว่าเม็ดเจลที่มีขนาดใหญ่

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)

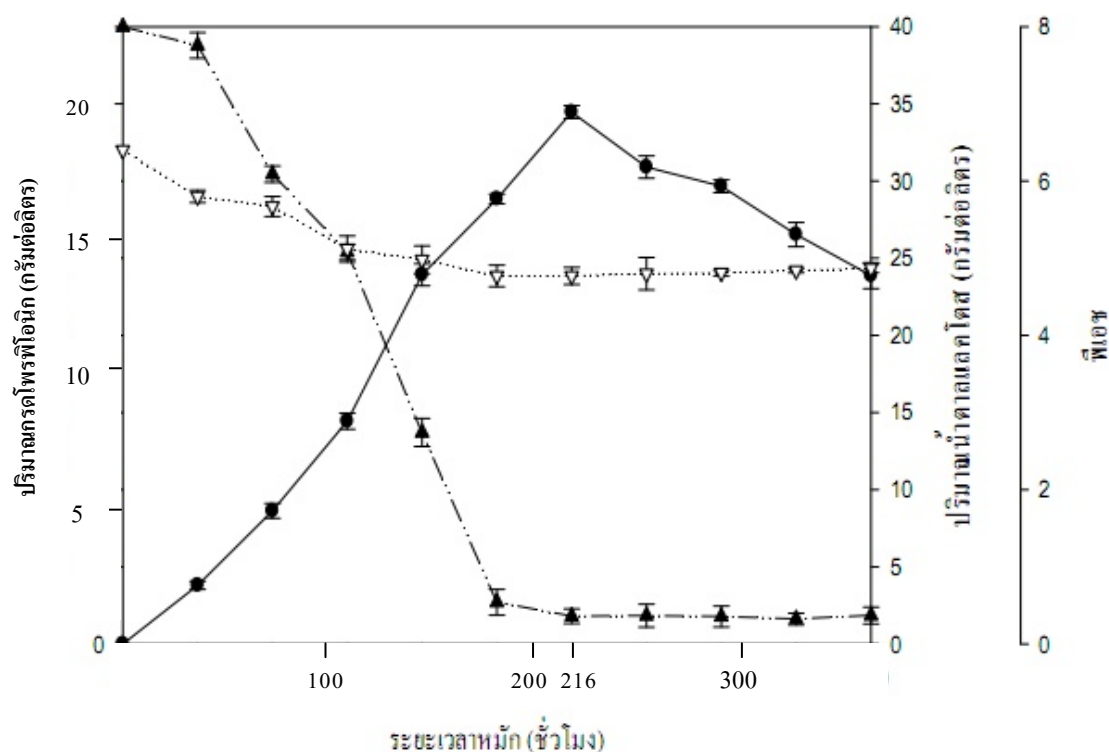
เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกกับเซลล์อิสระของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ในอาหารหางนม ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนี้ ระยะเวลาในการหมัก 432 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าเซลล์อิสระสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้เท่ากับ 16.88 กรัมต่อลิตร ที่เวลา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



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

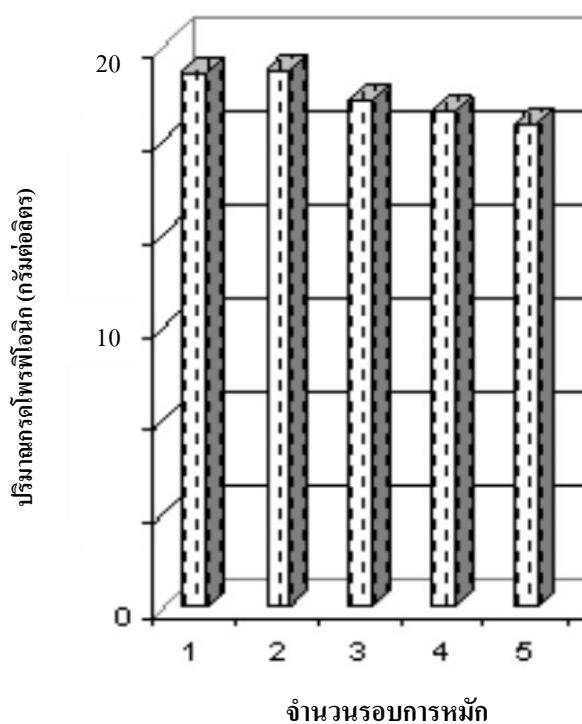
1.17.2 ศึกษาศักยภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารพอลิเมอร์จากใบกรูเมมาโดยการนำกลับมาใช้ใหม่ (cell recycle) เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อทำการศึกษาการผลิตกรดโพรพิโอนิกจากเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยสารสกัดพอลิเมอร์จากใบกรูเมมาในถังหมักขนาด 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 แสดงปริมาณกรดไพรูวอิกที่ผลิตโดยเชื้อ *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 ชั่วโมงของการหมักน้ำตาลแลคโตสมีการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดไพรูวอิกตึกเพิ่มขึ้นสูงสุด หลังจากนั้นการผลิตกรดไพรูวอิกจะค่อยๆ ลดลง และปริมาณน้ำตาลแลคโตสเหลือน้อยมากจนเกือบหมด) หลังจากทุกๆ รอบการหมักที่ 216 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเวย์ที่ใช้ในการหมัก และทำซ้ำโดยใช้อาหารเวย์ใหม่หลังจากล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ พบว่าสามารถผลิตกรดไพรูวอิกได้สูงสุด 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 และเมื่อพิจารณาการผลิตกรดไพรูวอิก พบว่าอัตราการผลิตกรดไพรูวอิกลดลงเรื่อยๆ เมื่อจำนวนรอบในการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากเซลล์อาจเกิดการเสื่อมสภาพ (cell degeneration) เซลล์อ่อนแอ (inactivated cells) และความเสื่อมสภาพของเม็ดเจล ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดไพรูวอิกลดลง



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

ตารางที่ 1.5 แสดงจำนวนรอบของการหมักกรดไพรูวอิก อัตราการผลิต และผลได้ของเชื้อ *P. acidipropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึง ด้วยสารสกัดเพคตินหยาบจากใบกรุงเขมา โดยการนำกลับมาใช้ซ้ำ

จำนวนรอบ การหมัก	ปริมาณกรดแลกติก (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

1.18 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบ เพคตินจากใบกรงเขมา (*Cissampelos pareira* L.) ในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์และการผลิตกรดโพรพิโอนิก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ คือ ใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.52 มิลลิเมตร โดยใช้สารสกัดหยาบเพคตินจากใบกรงเขมาร้อยละ 4 และใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่า *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 20.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระซึ่งสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ 19.24 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 216 เช่นกัน และเมื่อศึกษาการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ พบว่าสามารถนำเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำได้ 5 รอบการหมัก

เอกสารอ้างอิง

- กขพรรณ วงศ์เจริญ. 2548. “การศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณสารเพคติน และสารอัลคาลอยด์ใน
 กรุงเขมา (*Cissampelos pareira* L.).” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- จิรศักดิ์ ศรีสมศักดิ์ และธนากร อัมมะเทา. 2543. “การหาปริมาณเพคตินจากใบหมาน้อย.” ปัญหา พิเศษ
 สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- จิราภรณ์ สังข์ผุด. 2549. “การผลิตและคุณสมบัติของเพคตินผงที่สกัดจากกรุงเขมา.” วิทยานิพนธ์วิทยาศา
 สตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร (วิทยาศาสตร์การอาหาร) มหาวิทยาลัย วไลยลักษณ์ .
- ชยันต์ พิเชียรสุนทร, แม้นมาส ชวลิต และวิเชียร จีรวงส์. 2542. คำอธิบายตำราพระโอสถพระนารายณ์.
 กรุงเทพฯ : อมรินทร์.
- ญานี ลีตะนันท์. 2541. “การสกัดและการทำกรดแลกติกให้บริสุทธิ์จากน้ำหมัก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร
 มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ
 ทหารลาดกระบัง.
- ณรงค์ ศิริขันธ์. 2546. “ การสกัดและการหาลักษณะเฉพาะของเพคตินที่ได้จากกากฝรั่ง.วิทยานิพนธ์วิทยาศา
 สตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ติยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์. 2549. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ
Lactococcus lactis IO-1โดยวิธีTaguchi.” ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.
- เทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอกาส, วรรณภา กาญจนมยุร และปิยะเนตร ศรีธาราธิคุณ. 2545. การวิเคราะห์ ปริมาณ
 เพคตินในใบหมาน้อยด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- น้ำทิพย์ นาเชียงใต้ และยุวภา ทศบุต. 2550. “ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อคุณภาพของเพคตินที่ สกัดได้
 จากใบหมาน้อย.” ปริญญาวิทยาศาสตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะทรัพยากรธรรมชาติและ
 อุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร.
- พยอม ต้นดีวัฒน์. 2521. สมุนไพร. กรุงเทพฯ : สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย.
- พิเชษฐ เทบารุง. 2546. “การหาปริมาณเพคตินและคุณภาพของเพคตินจากใบหมาน้อย.” วิทยานิพนธ์
 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

พิพัฒน์ ไทรทอง. 2548. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอสตาแซนทิน.” ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

มาริษา ไชยโอสถ. 2549. “การสกัดเพกตินจากของเหลือทิ้งของขนุน.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา.

มัทนียา จงนิตยกาล. 2545. “การบำบัดน้ำทิ้งขั้นต้นของโรงงานนมด้วยแบคทีเรียแลคติก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2538. อนุกรมวิธานพืช อักษร ก. กรุงเทพฯ : เพื่อนพิมพ์.

วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2532. เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการนมและผลิตภัณฑ์นม. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

วุฒิ ธรรมเวช. 2540. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ: รวมสาส์น (1977) จำกัด.

ศิริประภา มั่นตรง. 2550. “การเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนต.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิริวรรณ ศรีสรณัฏฐ์ สมใจ ศิริโชค และเทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอภาส. 2533. รายงานการวิจัย การศึกษาแนวทางการสกัดเพกตินจากใบหมาน้อยและใบบัวโคก. มหาสารคาม : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม.

สมใจ ศิริโชค. 2544. จุลชีวอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.

สัมภาษณ์ คำผุย. 2533. “การสกัดเพกตินจากใบหมาน้อย.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2544. เทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตร- ศาสตร์.

อาทิตย์ ธาณี. 2548. “การผลิตกรดแลคติกจากกลูโคส ไฮโลส และสารสกัดจากขานอ้อยโดย *Lactococcus lactis* IO-1.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

- An Zhang, Shang-Tian Yang.(2009) “Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*” , **Journal of Biochemistry**. G Model PRBI-8706; Article in press ,No of Pages 6.
- Arasaratnam, V. Senthuran, A. and Balasubramaniam, K. 1996. “Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*.” **Enzyme and Microbial Technology**. 19 : 482-486.
- Barbirato,F.,Chedaille,D. and Bories, A.1997. “Propionic acid fermentation from glycerol : comparison with conventional substrates”. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 47:441-446.
- Bogdanova, G.J. 1974. New whole products of improve quality (in Russian). Moscow : Pishcevaya Promishlennost.
- Bunchanan, R.L. and Ayres, J.C. 1976. “Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999”. **Journal of Food Protection**. 49 : 128 – 132.
- Chen man, Y.B.,L. S. Wei and A.L. Nelson. 1988. **Inactivation of lipoxygenase in Whole Soybean by pH Adjustment**. Food Science and Technology in Industrial development V.1 Proceeding of Food Conference.
- Colomban, A., Roger, L. and Boyaval, P. 1993. “Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling”. **Biotechnology and Bioengineering**. 42 : 1091 – 1098.
- Daniel, R.1995. Microbial Physiology and Metabolism. Wm.C. Brown Communication,Inc.
- Filya,i. sucu, e. and karabulut, a.2004. “The effect of *Propionibacterium acidipropionici* , with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages”. **Journal of Applied Microbiology**. Volume 97, Number 4, October 2004 , pp. 818-826 (9)
- Fitzpatrick, J.J., Murphy, C., Mota, F.M. and Pauli, T. 2003. “Impurity and cost considerations for nutrient supplementation of whey permeate fermentations to produce lactic acid for biodegradable plastics.” **International Dairy Journal**. 13 : 575 – 580.
- Goswami, V. and Srivastava, A.K. 2000. “Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*” . **Journal Biochemical Engineering**. 4 : 121-128.

- Himmi, E.H., Bories, A., Boussaid, A. and Hassami, L. 2000. "propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* ". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 53 : 435 – 440.
- J.P.F. D'Mello.2000. **Farm Animal Metabolism and Nutrition** .Biotechnology Department, The Scottish Agricultural College,Edinburgh,UK :P. 438.
- Jefferson,C. Susan, Luciana, José, Ashok and Carlos. 2008. Batch Fermentation Model of Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* in Different Carbon Sources. **Journal of Applied Biochem Biotechnology** , 151:333–341
- Liu, KeShun. 1997. **Soybean: chemistry, technology, and utilization**. New York: Chapman & Hall: 25-94.
- Lewis, V. and Yang, S. 1992. "propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* : effect of growth substrate".**Applied Microbiology and Biotechnology**. 37 : 437-442.
- Moss,M.O, and J.E. Smith. **Industrial Application of Microbiology**. London :Surney university Press, 1977, 105-149
- Martinez-Campos, R. and Torre, M. 2002. "Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose" . **Biotechnology Letters**. 24 : 427-431.
- Olbrich, H. Die Melasse. Berlin : Institut fur Garungsgewerbe, 1956
- Paik, H.D. and Glatz, B.A. 1994. "Propionic acid production by immobilized cells of a propionate tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*" . **Applied Microbiology and Biotechnology**. 42 : 22-27.
- Panesar P. S., Kennedy J. F., Knill C. J. and Kosseva. M. R. 2007. "Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L(+) lactic acid production from whey." **Applied Microbiology Biotechnology**. 74 : 35–42.
- Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. **Industrial Microbiology**. 3th ed. Mc Graw Hill Co, Inc., New York. P. 50.
- Quesada-Chanto, A., Afschar, A.S. and Wagner, F. 1994. "Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose" . **Applied Microbiology and Biotechnology**. 42 : 16-21.

- Rickert, D.A., Charles, E.G., Bonita, A.G. 1998. "Improved organic acid production by calcium alginate immobilized propionibacteria". **Enzyme and Microbial Technology**. 22 : 409-414.
- Racker, M.O., Bern, C.J., Johnson, L.A. and Glatz, B.A. 1992. "Preservative of high moisture Maize by various propionate treatments". **Cereal Chemists**. 69 : 66 – 69.
- Ramsay , J.A., Hassan,M.C. and Ramsay,B.A. 1998. "Biological conversion of hemicelluloses to propionic acid". **Enzyme and Microbial Technology**. 22 : 292 – 295.
- Suwannakham, S. and Yang, S. 2005. "Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor". **Biotechnology and Bioengineering**. 91 : 325-337.
- Schuppert ,B., Schink ,B. and Trosch, W.1992. "Batch and continuous production of propionic acid from whey permeate by *Propionibacterium acidipropionici* in a three-electrode amperometric culture system". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 37:549-553.
- Tyree, R.W., Clausen, E.C. and Gaddy, J.L. 1991. "The production of propionic acid from sugars by fermentation through lactic acid as an intermediate". **Journal of Chemists Technology and Biotechnology**. 50 : 157-166.
- Tomoaki K., Kazuhiro ,T. Masahito, H. Eri, N. Hiroyosh, D. Takaaki, T. Masayuki, T.2008. "Production of Extracellular Bifidogenic Growth Stimulator (BGS) from *Propionibacterium shermanii* Using a Bioreactor System with a Microfiltration Module and an On-line Controller for Lactic Acid Concentration". **Journal of Bioscience and bioengineering** Vol. 105, No. 3, 184–191.
- Vandegraft, E.E., Hesseltine, C.W. and Shotwell, O.L. 1975. "Grain preservative : Effect on Aflatoxin and ochratoxin production". **Cereal Chemists**. 52 : 79-84.
- Vandana Goswami , A.K. Srivastava . (2000) "Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*." **Biochemical Engineering Journal** 4 Pages 121-128.
- Woskow, S.A. and Glatz, B.A. 1991. "Propionic acid production by a propionic acid-tolerant of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation". **Applied Environment Microbiology**. 57 : 281-288.
- White, J. 1954 **Yeast Technology**. London : Chapman and Hall.

Yang, S., Zhu, H. and Li, Y. 1994. "Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor" . **Biotechnology and Bioengineering**. 43 : 1124-1130.