Journal of Earth Science, Astronomy and Space
Vol. 2 No. 1 ISSN 2673-0480 (Online)

Received: 5 November 2019
Revised: 2 December 2019
Accepted: 9 December 2019

การศึกษากระบวนการหมักแบบต่อเนื่องเพื่อเพิ่มผลผลิตของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ แลกโทส และกาแลกโทส โดยใช้ *Lactobacillus* sp เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

Study of Continuous Fermentation Process to Increase the Production of Exopolysaccharide, Lactose and Galactose by Using Lactobacillus Sp as Starter

อดุลย์สมาน สุขแก้ว[1*]
Adulsman Sukkaew[1]
[1] สาขาเทคโนโลยีพลังงานทดแทน คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[*] adulsman.s@yru.ac.th

บทคัดย่อ

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยใช้แบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus sp.* ในอาหารแลกโทส ที่มีการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง และการเพิ่มอัตราการเจือจาง จะช่วยเพิ่มปริมาณของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ แลกโทส และกาแลกโทส โดยใช้อัตราการเจือจางที่ 0.2 – 1.2 ต่อชั่วโมง ส่งผลให้ปริมาณผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารตั้งต้น ของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น ที่ชั่วโมงที่ 92 อัตราการเจือจางที่ 0.6 ต่อชั่วโมง สามารถเพิ่มผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงสุด ถึง 0.2 กรัม เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ต่อกรัม กาแลกโทส การเติมคาร์บอนอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น และได้ปริมาณของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงตามไปด้วย

คำสำคัญ: เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์, *Lactobacillus sp.*, กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

Abstract

The exopolysaccharides production was produced by lactic acid bacteria from *Lactobacillus* sp. in lactose medium, That has continuous culture. The dilution Increasing rate was increased of exopolysaccharides, lactose and galactose by the dilution rate of 0.2 - 1.2 per hour, resulting in the product's yield per substrate of the exopolysaccharide increased in 92 hours, the dilution rate at 0.6 per hour can be increase the maximum of expopolysaccharide output to 0.2 grams exopolysaccharides Per gram galactose. Continuous carbon addition causing was resulted of the growth rate to increase Which results in high exopolysaccharide as well

Keywords: exopolysaccharide, *Lactobacillus sp*, Continuous Fermentation Process

บทนำ

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ หรือ EPS จากจุลินทรีย์ (microbial polysaccharide) เป็นจุลินทรีย์สร้างหรือผลิตขึ้นในขณะที่มีการเจริญ และขับออกมาภายนอกผนังเซลล์ มีลักษณะเป็นเมือก (slime) หรือยังคงติดอยู่กับผนังเซลล์ในลักษณะแคปซูล โพลีแซคคาไรด์ เป็นโพลิเมอร์ชีวภาพที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารในรูปของสารเพิ่มความคงตัว สารเพิ่มลักษณะเนื้อสัมผัส ช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัส และลักษณะที่ปรากฏของอาหารหลายชนิด ESP สามารถผลิตได้จากพืช สาหร่าย และจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีความหลากหลาย และยังสามารถควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต เพื่อให้ได้ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณสูงได้(Meng, et al., 2019) การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์ เป็นการอาศัยกระบวนการหมักในอาหาร และเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต พบว่าผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ จะมีชนิดหรือความหลากหลาย และลักษณะเฉพาะตัวมากกว่าโพลีแซคคาไรด์จากพืช หรือสาหร่าย โดยที่ความหลากหลายจะขึ้นกับชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ มีน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบถึง 200 ชนิด (Yamamoto, et al., 1995) ปัจจุบันเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีการผลิตในทางการค้ามีหลายชนิด เช่น แซนแทน (xanthan) แจลแลน (gellan) และเด็กซ์แทรน (dextran) เป็นต้น เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่นำมาใช้กับอาหาร ได้แก่ แซนแทนกัม (xanthan gum) จาก *Xanthomonas campestris* และเจนแลนกัม (gellan gum) จาก *Pseudomonas elodea* แต่มีข้อจำกัดในการผลิต เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในพืช (plant pathogen) และในการใช้ในอาหารต้องมีการระบุไว้ในฉลากด้วย .(Almalki, 2019)

ดั้งนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus* sp. เพื่อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ปลอดภัย และสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมพลังงาน สิ่งแวดล้อม และอุตสาหกรรมอาหารได้ เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยใช้แบคทีเรียแลกติกจาก *Lactobacillus* sp.

2 เพื่อศึกษาผลของอัตราการเจือจางต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยใช้แบคทีเรียแลกติกจาก *Lactobacillus* sp.

Journal of Earth Science, Astronomy and Space
Vol. 2 No. 1 ISSN 2673-0480 (Online)

วิธีดำเนินการวิจัย

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ดัดแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการแทนที่สารประกอบกลูโคส ด้วยแลกโทสอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องประกอบด้วย แลกโทส 20 กรัม ยีสต์ไนโตรเจนเบส (ปราศจากกรดอะมิโน และแอมโมเนียม) 5 กรัม K_2HPO_4 2 กรัม, $MgSO_4.7\ H_2O$ 0.1 กรัม, $MgSO_4.4\ H_2O$ 0.005 กรัม แอมโมเนียมซิเตรท 2 กรัม โซเดียมอะซิเตรท 5 กรัม ปรับพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 6 ด้วย KOH หลังจากนั้นฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ รอให้เย็น แล้วบรรจุตามความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าต้องการใช้เป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 15 กรัม/ลิตร เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการหมัก (15 ลิตร) โดยฆ่าเชื้อ ในตอนสุดท้ายแยกสารละลายแลกโทสออกมา 1.5 ลิตร ความเข้มข้นของแลกโทส 20 กรัม /ลิตร และสารละลายจะเหลืออยู่ 13.5 ลิตร สารอาหารนั้นจะรวมกันกับ สาร Antifoam (Bevaloid, Rhodia 15 ml) ในน้ำกลั่นที่ปราศจากออกซิเจน จำนวน 20 ลิตร (ฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที) อาหารเลี้ยงเชื้อต้องทำให้เย็นก่อน โดยการแช่ในอ่างน้ำ บางครั้งก็มีการสูญเสียอาหารเลี้ยงเชื้อจากการถ่ายไปยังภาชนะอื่น หลังจากฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งสามารถที่จะสร้างใหม่ได้ โดยเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยวิธีที่ปลอดเชื้อ (Chen, et al., 2019)

การเตรียมหัวชื้อเริ่มต้น

กระบวนการหมัก (ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10) โดยเพาะเลี้ยงเหมือนสภาวะจริง บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดลูกชมพู่ จำนวน 150 มิลลิลิตร เติมเชื้อ *Lactobacillus sp.* จำนวน 1 มิลลิลิตร และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่า ที่ความเร็วรอบ 100 rpm (Vinogradov, et al., 2015)

สภาวะที่ใช้ในการหมักแบบต่อเนื่อง

การหมักแบบต่อเนื่อง มีการติดตั้ง พีเอช และตัวควบคุมอุณหภูมิ ใช้ระบบการกวน ภาชนะที่ใช้ในการหมักเป็นภาชนะแก้ว (ขนาด 2.0 ลิตร) ใช้เครื่องวัดระดับติดตั้งไว้เพื่อป้องกันการล้น การป้อนอาหารหมักเข้าสู่ถังหมัก โดยผ่านปั๊มในอัตราการไหลที่ต้องการในการทดลอง จะป้อนไนโตรเจนอย่างต่อเนื่อง กระบวนการหมักในครั้งแรกจะใช้การหมักแบบกะ เพื่อเป็นการสะสมมวลเซลล์ ก่อนที่จะศึกษาการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm และพีเอชเท่ากับ 6 โดยปรับพีเอชด้วย KOH ที่ความเข้มข้น 2 N ในการหมักแต่ละอัตราการเจือจางจะทำไปเรื่อย ๆ 4- 5 ครั้ง จนได้รับมวลเซลล์คงที่ แล้วเก็บตัวอย่าง (30 มิลลิลิตร) เพื่อวิเคราะห์มวลเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลภายนอกเซลล์ และทำการเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง (Haiping, et al., 2019; Gaignard, et al., 2019)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต และการผลิต EPS เวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงมวลเซลล์, แลกโทสที่เหลือ, EPS, แลกเทส และกาแลกโทสในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.2 ต่อชั่วโมง มวลเซลล์จะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ และสูงสุดในชั่วโมงที่ 68 ส่วน EPS ก็เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เช่นกัน และสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 เนื่องจาก EPS จะผลิตออกมาในขณะที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตนั้นเอง หลังจากนั้น ผลผลิต EPS ก็ลดต่ำลง เรื่อย ๆ และต่ำสุดในชั่วโมงที่ 68 เนื่องจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะอยู่ในระยะ stationary phase ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ กับอัตราการสูญเสียมวลเซลล์อยู่ในอัตราเดียวกัน ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง ส่วนแลกโทสที่เหลือก็จะลดลงเช่นเดียวกัน เนื่องจากจุลินทรีย์จะใช้แลกโทสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต และสร้าง EPS

ผลของอัตราการเจือจางในมวลเซลล์, แลกโทสที่เหลือ, EPS, แลกเทส และกาแลกโทสในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่ามวลเซลล์เพิ่มสูงขึ้น และสูงสุดในช่วงอัตราการเจือจางที่ 0.5-0.7 ต่อชั่วโมง ส่วนปริมาณ EPS ก็จะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงอัตราการเจือจางนี้เช่นกัน แต่ในขณะเดียวกันอัตราการเจือจางที่สูงกว่า 0.6 ต่อชั่วโมงจะทำให้ มวลเซลล์, EPS, แลกเทส กาแลกโทส จะลดต่ำลง เนื่องจากที่อัตราการเจือจางต่ำ จะมีความเข้มข้นของสารอาหารสูงทำให้จุลินทรีย์นั้น เจริญเติบโตได้น้อย และผลผลิต EPS ที่ได้มีปริมาณต่ำ เนื่องจากสารอาหารอาจ จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ เมื่ออัตราการเจือจางสูงขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารลดลง จุลินทรีย์ก็สามารถนำสารอาหารมาใช้ได้มากขึ้น มีการเจริญเติบโตสูงขึ้น ผลผลิตที่ได้ก็สูงขึ้นด้วย แต่เมื่ออัตราการเจือจางสูงเกินไป ก็ทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารต่ำเกินไป ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์นั้นเจริญเติบโตช้า ให้ผลผลิตของ EPS ช้า และปริมาณน้อย ส่วนแลกโทสที่ใช้เป็นสารตั้งต้น จะเหลือในปริมาณสูงขึ้น เนื่องมาจากในการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus sp.* จะทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง คือมีการไหลเข้าออกของสารอาหารภายในถังหมักตลอดเวลา การหมักแบบนี้ เป็นการเติมวัตถุดิบ และสารอาหารเข้าไปในถังหมักอย่างต่อเนื่อง และในขณะเดียวกันก็มีการแยกเอาอาหารเหลว ที่มีผลิตภัณฑ์ละลายอยู่ออกมาตลอดเวลา โดยมีการควบคุมอัตราการเติมสารอาหารเข้า และนำอาหารออกจากถังหมักในอัตราที่เท่ากัน และที่อัตราการเจือจางที่ 0.6 ต่อชั่วโมง จะให้ปริมาณผลผลิตของ EPS สูงสุด เนื่องจากอัตราการเจือจางที่ 0.6 ต่อชั่วโมง เป็นอัตราการเจือจางที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ คือมีสารอาหารไม่มาก หรือน้อยเกินไปจุลินทรีย์จึงใช้สารอาหารได้สูง ทำให้เจริญเติบโตสูงขึ้น และปริมาณผลผลิตของ EPS ก็สูงตามไปด้วย ผลของอัตราการเจือจางในผลผลิตต่อจำนวนเซลล์ ผลผลิตต่อสับสเตรท ปริมาณผลผลิต และผลผลิตจำเพาะของ EPS พบว่าผลผลิตต่อจำนวนเซลล์ ปริมาณผลผลิต จะเพิ่มขึ้น

เรื่อย ๆ และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่อัตราการเจือจางที่ 0.2 ต่อชั่วโมง หลังจากนั้นก็จะลดลงเรื่อย ๆ ส่วนอัตราผลผลิตจำเพาะ และผลผลิตต่อสับเตรตจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ และสูงสุดที่อัตราการเจือจางที่ 0.6 ต่อชั่วโมง

สรุปผลการวิจัย

เมื่อเพาะเลี้ยง *Lactobacillus sp* ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง เมื่อใช้อาหารกึ่งดัดแปลง สามารถเพิ่มผลผลิตของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ แลกโทส และกาแลกโทส และเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามผลผลิตของแลกเทส และกาแลกโทสจะลดลงที่อัตราการเจือจางที่มากกว่า 0.2 ต่อชั่วโมง และอัตราการเจือจางที่ 0.6 ต่อชั่วโมง จะสามารถเพิ่มผลผลิตต่อซับสเตรตของเอ็กโซลีแซคคาไรด์ แลกเทส กาแลกโทสได้สูงสุด นอกจากนี้พบว่า เมื่ออัตราการเจือจางสูงเกินไปจะไปยับยั้งผลผลิตของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ กาแลกเทส กาแลกโทสได้เช่นกัน การเติมแหล่งคาร์บอนเข้าไปใหม่ตลอดเวลาจะช่วยเพิ่มการสร้าง EPS และอัตราการเจริญเติบโตให้สูงขึ้นได้ แม้ว่าจะใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่ดี แต่ก็ไม่สามารถที่จะยืนยันได้ว่าการเติมแหล่งคาร์บอนเข้าไปใหม่ตลอดเวลา จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการสร้างแลกเทส และกาแลกโทส ได้จากการศึกษา สามารถยืนยันได้ว่า ผลผลิตของเอ็กโซลีแซคคาไรด์ แลกเทส กาแลกโทส ทั้ง 3 ชนิดเป็นสารเมทาบอไลซ์ที่ผลิตขึ้นพร้อม ๆ กับการเจริญเติบโต

เอกสารอ้างอิง

Almalki, M. A. (2019). “ Exopolysaccharide production by a new Lactobacillus lactis isolated from the fermented milk and its antioxidant properties”, ***Journal of King Saud University - Science.*** 412(5), 245-251.

Chen, S., Huang, H., & Huang, G. (2019). “ Extraction, derivatization and antioxidant activity of cucumber polysaccharide” , ***International Journal of Biological Macromolecules****. 25 (140)*. 1047-1053.

Gaignard, C., Laroche, C., Pierre, G., Dubessay, P., Delattre, C., Gardarin, C., . and Michaud, P. (2019). “ Screening of marine microalgae: Investigation of new exopolysaccharide producers” ***Algal Research****. 2(44)*, 101-107.

Haiping, L., Pei, Z., Shuhai, Z., Dengyun, Z., Herong, F., Yi, S., and Xinqian, W. (2019). “ Protective effect of polysaccharides from Pholiota

nameko on *Lactobacillus casei* ATCC 334 subjected to freeze-drying", ***LWT***. *65(115)*, 108-113.

Meng, X., Dobruchowska, J. M., Gerwig, G. J., Kamerling, J. P., & Dijkhuizen, L. (2015). " Synthesis of oligo- and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase at high concentrations of sucrose", ***Carbohydrate Research***. *122(414*), 85-92.

Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Cornelissen, A., & van Sinderen, D. (2015). " Structural investigation of cell wall polysaccharides of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus 17", ***Carbohydrate Research***. *16(413)*, 93-99.

Yamamoto, Y., Nunome, T., Yamauchi, R., Kato, K., & Sone, Y. (1995). " Structure of an exocellular polysaccharide of *Lactobacillus helveticus* TN-4, a spontaneous mutant strain of *Lactobacillus helveticus* TY1-2", ***Carbohydrate Research***. *275*(2), 319-332.