



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

โครงการ
การพัฒนากลเลี้ยง Lactic acid bacteria
ที่ความเข้มข้นสูงโดยเทคนิคการควบคุมเมตาบอลิซึม

*Development of the cultivation of high cell density of
lactic acid bacteria : Application of metabolic control.*

โดย นาย สมชาย เชื้อวชิรินทร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๔๒



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

โครงการ

การพัฒนาการเลี้ยง Lactic acid bacteria

ที่ความเข้มข้นสูงโดยเทคนิคการควบคุมเมตาบอลิซึม

*Development of the cultivation of high cell density of
lactic acid bacteria : Application of metabolic control*

โดย นาย สมชาย เข็มวัชรินทร์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ธันวาคม พ. ศ. ๒๕๔๒

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ (ไทย)	2
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	4
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	6
บทนำ	11
วิธีการทดลอง	15
ผลการทดลอง	20
บทสรุปและวิจารณ์ผลการศึกษารวมโครงการโดยรวม	37
หนังสืออ้างอิง	43
ตารางแสดงและรูปประกอบผลการทดลอง	46
ผลงานที่ได้จากการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย	80
ภาคผนวก	82

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์จากคณะศึกษาศาสตร์ (สทศ.) และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่มีส่วนสนับสนุนงบประมาณช่วยเหลือให้การทํารวบรวมข้อมูลครั้งนี้เกิดขึ้นได้และสามารถเผยแพร่ไปได้อย่างดี และขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดลที่มีให้การสนับสนุนในด้านสถานที่ ตลอดจนอุปกรณ์เครื่องมืออิเล็กทรอนิกส์ต่างๆ นอกจากนี้ขอขอบคุณส่วนต่างๆ ที่ช่วยให้ได้รายละเอียดรายละเอียดอย่าง งามถึง งามทั้งทางภาคใต้ของภาคใต้ในโครงการนี้ น.ส.ศรวิทย์ คณิศพิกุล และ น.ส.สุกัญญา มณีเมธีกร ซึ่งมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งที่ส่งผลงานวิจัยภายใต้การดูแลของอาจารย์จิต วัฒนคุณ การให้คำปรึกษาที่มีประโยชน์กับนางสาว กุลกานต์ ศาสตราจารยย์ ภรรยา ผู้วิจัย เป็นวิทยาทาน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาต่างๆ สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณที่มีส่วนร่วมวิจัยในโครงการนี้จนได้จบเล่มและมีส่วนร่วมผลักดันให้โครงการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคใต้ที่เกี่ยวเนื่องกับงานวิจัยในครั้งนี้ ให้คงยึดเหนี่ยวแน่นเป็นแรงผลักดันให้โครงการนี้ประสบความสำเร็จเป็นความสำเร็จของประเทศไทยโดยรวมและมีบทบาทและส่วนที่มีส่วนต่อส่วนต่อส่วนต่อส่วนต่อ

The results showed that higher cell density (upto 4.0×10^{10} cfu/mL) could be obtained by fed-batch technique while the level of lactic acid concentration could be controlled by limitation of glucose supply. The fed-batch study indicated that continuous feeding of both sugar and protein is required for high cell density cultivation of *L. acidophilus*. Further study of fed-batch cultivation at high cell density indicated that the sterilization of proteinaceous source at high concentration cause growth inhibitory compounds according to Maillard reaction. The Maillard reaction compound results in the level off of the cell density at the final stage of cell cultivation and must be avoided as possible in order to extend more cell growth.

Conclusion:

According to this study, the suitable medium formulation and preparation method as well as optimal process for production of *Lactobacillus acidophilus* at high cell density was established. In comparison with conventional batch production process, the developed process could yield significantly higher cell concentrations (more than 20 times). New technology found in this study could be also adapted for high cell density cultivation of other lactic acid bacteria and would be applicable to the production in industrial sectors.

Suggestions:

Further study in protein utilization of specific peptide and it utilization as growth promotor as well as more works relate with technical knowledge of protein preparation which could reduce the Maillard reaction products would be very beneficial to improve the cell yield and overall process productivity.

Keywords:

probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, high cell density, protein utilization, fed-batch cultivation

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: PDF/33/2540

ชื่อโครงการ: การพัฒนาการเลี้ยง Lactic acid bacteria ที่ความเข้มข้นสูง (โดยเทคนิคการควบคุมเมตาบอลิซึม)

ผู้วิจัย: นายสมชาย เชื้อวชิรวัณท์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จ. มหิดล

นักวิจัยที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์ ดร. สมเดช ภูมิรัตน์ คณบดีวิทยาศาสตร์ จ. มหิดล

E-mail ของผู้วิจัย: scscv@mahachulalongkornrajavidyalaya.ac.th

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย: 1 สิงหาคม พ.ศ. 2540 - 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2542

วัตถุประสงค์ของโครงการ:

เพื่อพัฒนาเทคนิคสำหรับการเลี้ยง Lactic acid bacteria ที่ระดับความเข้มข้นสูง และเผยแพร่เทคโนโลยีนี้ในรูปแบบการตีพิมพ์ผลงานวิชาการในระหว่างทั้งในและต่างประเทศ ตลอดจนการวิจัยร่วมกับภาคธุรกิจและเอกชนเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิต Probiotics ภายในประเทศ

ขอบเขตการวิจัย:

ในการศึกษาโดยใช้เชื้อ Lactic acid bacteria สายพันธุ์ *Lactobacillus casei* ซึ่งมีคุณสมบัติสำหรับการใช้ผลิต Probiotics การพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงจุลินทรีย์นี้ให้มีความเข้มข้นสูงจะเน้นแนวทางการศึกษาถึงอิทธิพลของอาหาร สารอาหารเสริม และเทคนิคการเลี้ยงที่มีผลต่อการสร้างกรด Lactic (ซึ่งมีผลกับประสิทธิภาพของตัวเชื้อเอง) เพื่อที่จะควบคุมการสร้างกรด Lactic และลดอิทธิพลของกรด Lactic ที่หมกหมักในการศึกษาจะเริ่มที่การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยง โดยศึกษาถึงอิทธิพลของชนิดของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ตลอดจนแหล่งอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ที่สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโต และการสร้างกรด Lactic ได้ นอกจากนี้ยังจะมีการศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยของสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การให้ออกซิเจนที่มีส่วนในการลดการสร้างกรด Lactic เมื่อได้สูตรอาหาร และสภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงซึ่งจะทำการศึกษาถึงการประยุกต์ใช้เทคนิคการเลี้ยงแบบ *fed-batch* เพื่อใช้ในการควบคุมการให้น้ำตาลแก่เชื้อจุลินทรีย์เพื่อหาความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิคดังกล่าวในการควบคุมการสร้างกรด Lactic และเก็บเชื้อที่ความเข้มข้นสูงได้

ผลการวิจัย:

การศึกษาดังกล่าวและสภาวะที่เหมาะสมจะต้องให้เงื่อนไขการใช้แหล่งอาหารโปรตีนจากแหล่งอาหารน้ำปลาสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนควบคู่ไปกับสารให้ออกซิเจนซึ่งใช้ในการศึกษาสามารถลดการสร้างกรด Lactic ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดของโปรตีนเป็นปัจจัยที่สำคัญในการกำหนดประสิทธิภาพของการใช้โปรตีนนั้น การศึกษาถึงแหล่งโปรตีนชนิดต่างๆ ทำให้สามารถพัฒนาการใช้โปรตีนจากแหล่งที่มีราคาถูก คือ fish meal soluble และน้ำ whey เพื่อหาใช้ทดแทนโปรตีนราคาสูงที่ใช้อยู่ในสูตรอาหารมาตรฐาน คือ

yeast extract, meat extract และ tryptone อย่างไรก็ตาม ในการใช้แหล่งโปรตีนเพียงอย่าง เดียวพบว่ามีโปรตีนเป็นส่วนมากที่ไม่สามารถถูกใช้ได้ การใช้โปรตีนให้มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องมีการใช้น้ำพาลควมอยู่ไปด้วย โดยต้องมีการควบคุมการสังกรด lacto ในการนี้พบว่า การใช้เทคนิค fed-batch ในการเลี้ยงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมความเข้มข้นโปรตีนที่ ระดับต่ำและสามารถใช้ควบคุมการสังกรด lacto ได้ การศึกษาการเลี้ยงแบบ fed-batch ซึ่งให้ เห็นว่าการให้อาหารแบบ exponential โดยมีการเติมแหล่งอาหารประเภทโปรตีน และน้ำตาลไป ตลอดการเลี้ยงสามารถผลิตเชื้อที่มีชีวิตได้ความเข้มข้นสูงถึง 4.3×10^{11} cells/ml ซึ่งมากกว่าการ เลี้ยงแบบธรรมดาโดยเทคนิค batch ธรรมดาถึงกว่า 20 เท่า อย่างไรก็ตามในการเลี้ยงเชื้อที่ ความเข้มข้นสูงซึ่งต้องใช้โปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงพบปัญหาคือการขาดเชื้อสายกับเซลล์โปรตีน ที่ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดมลพิษจากปฏิกิริยา Maillard ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต ของเชื้อ และทำให้เกิดข้อจำกัดของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นสูงกว่าที่เป็นอยู่ได้

วิจารณ์และสรุปผล

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาทำให้สามารถพัฒนากระบวนการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* ที่ความเข้มข้นสูง โดยสามารถปรับปรุงได้ทั้งสูตรอาหารที่ราคาถูก ตลอดจนกระบวนการเลี้ยงเชื้อโดยการใช้เทคนิค fed batch กระบวนการที่พัฒนาขึ้นนี้ช่วยให้เห็น ถึงประสิทธิภาพที่สุกว่าเทคนิคการเลี้ยงเชื้อแบบปกติอย่างเห็นได้ชัด และองค์ความรู้ที่ พัฒนาขึ้นนี้มีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่คนละชนิดกัน ได้อีกได้และน่าที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับกระบวนการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมให้ดียิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมพื้นฐานในรายละเอียดเกี่ยวกับชนิดและแหล่งของโปรตีนที่จำเป็น ในการเจริญเติบโตของเชื้อ ตลอดจนการศึกษาในแง่การปรับปรุงกระบวนการหมักโปรตีนที่ ความเข้มข้นสูงที่สามารถลดการเกิดปฏิกิริยา Maillard ได้จะมีความสำคัญและจะสามารถช่วย เพิ่มศักยภาพของกระบวนการเลี้ยงเชื้อในรุ่น lactic acid bacteria ที่ความเข้มข้นสูงได้เป็น อย่างมาก

Keywords: probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, high cell density, protein utilization, fed-batch cultivation.

Abstract

- Project Code:** PDI/T3/2540
- Project Title:** Development of the cultivation of high cell density of lactic acid bacteria: Application of metabolic control
- Investigators:** Dr. Somchai Chauvatcharin
Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University.
- E-mail address:** scsavi@mahidol.ac.th
- Project period:** 2 years (August 1, 1997 - July 31, 1999)
- Objective:** To develop novel technology of lactic acid bacteria cultivation at high cell density and publicize the research works in international journals as well as conduct co-research works with related governmental and private sectors.

Methodology:

Lactic acid bacteria used in this study was *Lactobacillus acidophilus*, the strain of probiotics use. In order to obtain high cell density and viability in production of lactic acid bacteria, the inhibitory effect of produced lactic acid have to be minimized. In this research, the work was emphasized on studies in effect of several parameters such as medium components, culture conditions and cultivation techniques on cell physiology and find proper nutrient sources as well as optimal cultivation techniques to control the metabolism of lactic acid production and promote cell growth at high cell density. Firstly, the effect of physical condition (e.g. aeration) and utilization of several proteinaceous sources on the growth yield and lactic acid were investigated for their applicability and suitability in promoting cell growth while reduces the lactic formation. Secondly, fed-batch techniques was studied for their potential in reducing lactic acid formation by controlling of sugar supply. Finally, optimal process for high cell density cultivation was established.

Results and Discussion:

According to the result of studying of effect of aeration and protein utilization on cell physiology, it was found that using protein source such as yeast extract as alternative carbon source, high cell growth of *Lactobacillus acidophilus* (upto 8×10^7 cfu/ml) could be obtained proportionally to amount of protein addition while the lactic acid level was low (< 0.5 g/L under aeration condition). The improvement of cell growth was considered to be due to less inhibition effect of lactic acid compared with the cultivation using glucose as carbon source where the lactic acid concentration was more than 4.5 g/L. It was also found that fish soluble extract as alternative protein source which was pre-digested by acid provided 1.5 times higher growth yield than that obtained from yeast extract, base on equal total nitrogen. However the analyses of protein indicated that protein consumption was less efficient compare with that of glucose (only upto 15 % of total nitrogen). So fed-batch cultivation of glucose and protein source was further investigated in order to improve the cell production yield.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การพัฒนาการเลี้ยง Lactic acid bacteria ที่ความเข้มข้นสูงใหม่เทคนิคการควบคุมเมตาบอลิซึม
(ภาษาอังกฤษ) :Development of the cultivation of high cell density of lactic acid bacteria : Application of metabolic control.
2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
นายสมชาย เชื้อวัชรินทร์
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล
ถนนพระรามที่ 6 กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 246-0063 ต่อ 2718 โทรสาร 246-3026
e-mail: scscv@meddof.mh.th
3. สาขาวิชาที่ทำการศึกษา วิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ (Biochemical Engineering)
4. งบประมาณทั้งโครงการ 2 ล้านบาทต่อปี
5. ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี
6. ความสำคัญและที่มาของปัญหา
จุลินทรีย์กรดแลกติก (lactic acid bacteria) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ได้รับการยอมรับในความปลอดภัย (Generally Recognised as Safe , GRAS) โดยได้ถูกใช้กันอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารและปัจจุบันในรูปแบบของสารเสริมชีวิต (Probiotics) ซึ่งถูกใช้ในอุตสาหกรรมเชื้อรา ลักโต และเป็นอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์กันอย่างแพร่หลาย ประเทศไทยมีอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมีความจำเป็นในการใช้พันธุ์จุลินทรีย์กรดแลกติกเป็นจำนวนมาก ทั้งในอาหารหมักหมด และนมถั่วเหลือง รวมไปถึงการใช้เป็นสารเสริมชีวิตในการเลี้ยงสัตว์ได้แก่ ไก่, โค, สุกร, และสัตว์น้ำเช่น กุ้งและปลา เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งมีการตกค้างในผลิตภัณฑ์ แบ่งไว้ได้ตามประเทศไทยมีวิสาหกิจเทคโนโลยีพื้นฐานที่สำคัญในการผลิตเชื้อจุลินทรีย์กรดแลกติก ซึ่งก็คือ เคมดิวการมีทกซ์เซลล์ lactic acid bacteria ที่ความเข้มข้นสูง ในการเลี้ยงจุลินทรีย์กรดแลกติกที่ความเข้มข้นสูง จำเป็นที่จะต้องหลีกเลี่ยงข้อผิดพลาดอันเนื่องมาจากการควบคุมเมตาบอลิซึมที่เข้มงวด ซึ่งแนวทางหนึ่งที่สามารถทำได้ โดยการควบคุมเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เพื่อที่จะให้เชื้อผลิตกรดแลกติกได้อย่าง การศึกษาการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเชื้อโดยแนวทางใหม่นี้จะเป็นองค์

ความรู้ใหม่ทางพิษวิทยา และมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตจุลินทรีย์โปรไบโอติก ในระดับอุตสาหกรรมในประเทศไทย

7. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเทคนิคสำหรับการเลี้ยง Lactic acid bacteria ให้ได้ระดับความเข้มข้นสูง และแยกพบเทคโนโลยีใหม่ในรูปแบบการดีฟีนฟรอนวิทยาการทั้งในระดับประเทศ ตลอดจนการวิจัยร่วมกับเอกชนเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิต Probiotics ภายในประเทศ

8. ระเบียบวิธีวิจัย

ในการเลี้ยง Lactic acid bacteria โดยทั่วไปจะมีปัญหาที่สำคัญคือ Lactic acid ที่ถูกสร้างขึ้นจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เองซึ่งมีผลทำให้ได้ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่ต่ำ จากการศึกษาจากงานต่างๆ เพื่อหาแนวทางที่เหมาะสมในได้ในการผลิตโดยปัญหาที่สามารถสรุปได้ 3 แนวทางใหญ่ๆ คือ

1. การใช้กระบวนการแยก Lactic acid ออกมาตลอดเวลาให้ได้ระดับความเข้มข้นที่มีผลไม่รบกวนการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
2. การควบคุมสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิและสภาวะแวดล้อมเพื่อควบคุมความเข้มข้นของจุลินทรีย์ให้ผลิต Lactic acid ออกมาในปริมาณที่น้อย

สำหรับแนวทางแรกนั้นจนถึงปัจจุบันได้มีกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มได้ศึกษาและหากระบวนการต่างๆ เช่น Electrodialysis, Resin adsorption และ Solvent Extraction เป็นต้น เกี่ยวกับการแยก Lactic acid ออกมาตลอดเวลาเพื่อให้จุลินทรีย์ได้เจริญเติบโตและผลิต Lactic Acid ต่อไปได้ โดยเทคนิคนี้ถูกนำมาเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิต Lactic Acid และในขณะเดียวกันได้ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่สูงขึ้นในระดับหนึ่ง

ในแนวทางที่สองนั้น แม้จะมีผู้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสภาวะต่างๆ ของกระบวนการแยก Lactic acid ที่เกี่ยวข้องกับ Lactic acid bacteria มาเป็นเวลานานแล้ว แต่การที่จะประยุกต์ใช้ข้อมูลวิจัยพื้นฐานเหล่านี้กับการควบคุมและหาวิธีที่เหมาะสมเพื่อการผลิตจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นสูงยังไม่มีการกล่าวถึงการค้นคว้าวิจัย

ในงานวิจัยนี้ในส่วนแรกจะเน้นศึกษาแนวทางที่ 2 เป็นอันดับแรกโดยหาหาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรด Lactic acid ในขณะเดียวกันเพิ่ม growth yield และความเข้มข้นของจุลินทรีย์ อย่างใดก็ตามเนื่องจากเชื้ออาจมีการสร้าง Lactic acid บางส่วนดังนั้นจึงควรมีการประยุกต์ใช้แนวทางที่ 1 คือการให้กระบวนการแยก Lactic acid ความรู้ไม่เพียงพอที่จะเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และพารามิเตอร์อื่นของเชื้อที่สูงที่สุด

9. แผนการดำเนินงานและขอบเขตการวิจัยตลอดโครงการ

เชื้อที่ใช้ในการศึกษาจะเป็นเชื้อ *Lactic acid bacteria* ในกลุ่ม *Lactobacillus* คือ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งใช้ในการผลิต Probiotics ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการวิจัยเพื่อศึกษาถึงข้อบ่งชี้พื้นฐานของเชื้อในกลุ่มนี้บ้างแล้ว

แผนการดำเนินงาน

เดือนที่ 1-6

9.1 ศึกษาการให้อากาศในระดับต่ำเพื่อการกระตุ้น oxidative phosphorylation ของ lactic acid bacteria

การศึกษากำหนดในระดับ flask และ Lab Scale fermenter (ขนาด 5 ลิตร)

ในระดับ shake flask จะทำ preliminary test ใน flask ที่ volume ต่างๆ กัน (ซึ่งมีความสามารถในการให้อากาศต่างกัน) เพื่อข้อมูลของการเติมอากาศต่ออัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์, Growth yield และการสร้าง lactic acid

เดือนที่ 7-12

9.2.1 ศึกษาการใช้สูตรอาหารทดแทนการใช้น้ำตาล

จะศึกษาการใช้แหล่ง C-source ชนิดต่างๆ เพื่อทดแทนการใช้น้ำตาล glucose ให้นักทดลองทำการประเมินผลเบื้องต้น โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบการใช้น้ำตาลซึ่งจาก catabolic pathway ของเชื้อจุลินทรีย์ การสร้าง lactic acid นั้นเกิดจาก Catabolism ของน้ำตาลเป็นหลัก ดังนั้นการใช้ C-source จากแหล่งอื่นแทนน้ำตาลจึงมีแนวโน้มที่จะสามารถทดแทนการสร้าง Lactic acid ในขณะเดียวกันเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ ในการวิจัยครั้งนี้จะศึกษาอัตราส่วนของแต่ละโปรตีนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและการสร้าง Lactic acid ของจุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษาตลอดจนการทดลองโปรตีนที่เหมาะสมในการใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรม

เดือนที่ 13-24

9.2.2 ศึกษาการควบคุมระดับความเข้มข้นของเฝ้าฟาล์วให้เหมาะสม

การศึกษากำหนดใน Lab scale fermenter ที่สามารถควบคุมและจะมีการใช้เทคนิค Fed-Batch ในการควบคุมระดับความเข้มข้นของเฝ้าฟาล์วโดยเทคนิคในการให้น้ำตาลจะเป็นแบบคงที่ และ exponential feed นอกจากนี้ในช่วงการทดลองในระดับ Lab Scale Fermenter จะใช้น้ำเทคนิคการวัดค่าต่างๆ ของระบบมาประยุกต์ใช้และวิเคราะห์ถึงความเป็นไปได้ที่จะนำค่าต่างๆ เหล่านี้มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อของเชื้อจุลินทรีย์และความคงตัวของเชื้อได้แก่ ค่า dissolved oxygen เพื่อควบคุมการให้อากาศ, ค่า pH และ pump feed rate เพื่อควบคุม pH ใช้ในการปรับสภาวะของจุลินทรีย์ในการเลี้ยงกรดและสามารถใช้ประกอบการศึกษาแนวโน้มการใช้น้ำตาลที่เหมาะสมได้ ตลอดจนค่าความเข้มข้นเฝ้าฟาล์วจะสามารถนำไปใช้คำนวณอัตราการให้อาหารที่เหมาะสมในเทคนิค Fed Batch

2. " Utilization of complex proteinaceous sources for high cell density cultivation of *Lactobacillus acidophilus*"

นำเสนอที่การประชุม "The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1998 and The 11th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology" ระหว่างวันที่ 15-18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2542 จังหวัดภูเก็ต

3. " Process Development for High Cell Density Cultivation of *Lactobacillus acidophilus* for Probiotics" นำเสนอที่ประชุม " International Conference on Asian Network on Microbial Researches" ระหว่างวันที่

29 พฤศจิกายน - 1 ธันวาคม พ.ศ. 2542 จังหวัดเชียงใหม่

11.2 การตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

จากผลงานการศึกษาค้นคว้าวิจัยเป็นผลงานทางวิชาการที่ส่งไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติจำนวน 2 หัวเรื่อง คือ

1. Utilization of fish waste protein for cell production of *Lactobacillus acidophilus* for probiotics use

อยู่ระหว่างการนำเสนอก่อนการ World Journal of Microbiology & Biotechnology เพื่อพิจารณาขอตีพิมพ์

2. Application of fed-batch technique for high cell density cultivation of *Lactobacillus acidophilus*

กำลังจัดเตรียมเพื่อไปเสนอต่อวารสาร Biotechnology letter หรือ Applied microbiology and Biotechnology

11.3 ความร่วมมือกับองค์กรอื่นทั้งภาครัฐและเอกชนในการเผยแพร่เทคโนโลยี

ได้มีการเผยแพร่เทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการเลี้ยงและผลิตจุลินทรีย์ โยเกิร์ตภาครัฐ และเอกชน ในรูปแบบของการทำวิจัยร่วม เพื่อขยายผล คือ

-การทำวิจัยร่วมกับบุคลากรจากศูนย์พันธุวิศวกรรมศาสตร์ และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

-การพัฒนาและวิจัยร่วมกับบริษัทเอกชนสำหรับการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตโยเกิร์ตเชิงพาณิชย์ การผลิตที่สำคัญกระบวนการผลิตโยเกิร์ต

1. บทนำ

เป็นที่ทราบกันดีอย่างดีว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม lactic acid bacteria (LAB) จัดว่าเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย (Generally Recognized as Safe: GRAS) โดยได้ถูกนำมาบริโภคมานานนับศตวรรษ มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารได้ผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย เช่น เนยแข็ง, โยเกิร์ตและนมเปรี้ยว, เนื้อสัตว์หมัก และไมเกร็ดเก็นดั้น ทั้งนี้เนื่องมาจากคุณสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ การผลิตกรดแลคติก (lactic acid) ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ การผลิตสารจำเพาะที่มีผลต่อลักษณะและรสชาติของอาหารหลายชนิด การผลิตกรดที่จุลินทรีย์ผลิตได้ยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ สำหรับการปรับปรุงรสชาติและลักษณะของอาหารประเภทเนื้อและผักผลไม้ต่างๆ นอกจากนี้จุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactic acid bacteria ยังมีชีวิตสามารถนำไปใช้เป็นสารเสริมชีวิต (probiotics) (1) เป็นส่วนผสมของอาหารของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งจุลินทรีย์มีชีวิตที่เติมไปในอาหารจะก่อให้เกิดประโยชน์แก่สุขภาพของมนุษย์และสัตว์ที่บริโภคอาหาร ที่ยังเพิ่มคุณค่าของอาหาร โดยจุลินทรีย์บางประเภทสามารถสร้างวิตามินบีได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังช่วยย่อยสลายสารอาหารโดยใช้น้ำย่อย amylase, protease, pectinase, cellulase, lactase และอื่นๆที่สร้างขึ้น จุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactic acid bacteria ยังช่วยรักษาสมดุลภายในระบบทางเดินอาหารโดยไปครอบครองพื้นที่ที่มีของดื้อได้ เพื่อไม่ให้จุลินทรีย์ที่มีก่อโรคสามารถเกาะได้ ทั้งยังกระตุ้นให้เกิดหรือเพิ่มภูมิคุ้มกันแก่ชนิดภายใน ซึ่งเป็นแบบไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific gut mucosomodulators) ผลของจุลินทรีย์สามารถสร้างสารต้านแบคทีเรีย (Bacteriocin) ซึ่งมีฤทธิ์ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ได้ การประยุกต์ใช้กันสัตว์หลายชนิด ได้แก่ โค, สุกร, ไก่ ผลของกรดไขมันต่างๆพบว่าสามารถนำสารเสริมชีวิต (probiotics) นี้มาทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ (Antibiotics) เพื่อลดปัญหาสุขภาพทั้งที่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคได้ คุณสมบัติดังกล่าวของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactic acid bacteria สำหรับการประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมชีวิต ทำให้มีการศึกษาวิจัยกันแพร่หลายในยุโรป อเมริกา และญี่ปุ่น พร้อมทั้งมีการนำมาประยุกต์ใช้กับมนุษย์และการเลี้ยงสัตว์หลายอย่าง

จากข้อสังเกตข้างต้นอาจกล่าวได้ว่า กระบวนการเลี้ยงเชื้อ Lactic acid bacteria มีความสำคัญ และช่วยสนับสนุนอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร, ยา ตลอดจนอุตสาหกรรมทางการแพทย์ เป็นต้น สำหรับประเทศไทยเทคโนโลยีนี้มีบทบาทอย่างมากในเรื่องเชื้อ Lactic acid bacteria ถึงแม้ได้มีการพัฒนาและมีการนำมาใช้ในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมอย่างเต็มที่ การพัฒนาเทคโนโลยีขั้นพื้นฐานในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactic acid bacteria ที่ความเข้มข้นสูงจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนากระบวนการผลิตต่างๆ ได้แก่ กระบวนการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับอุตสาหกรรมอาหารหมักของชนิดต่างๆ และอุตสาหกรรมนมเปรี้ยว และโยเกิร์ต ซึ่งกำลังได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นจากผู้บริโภค ตลอดจนกระบวนการผลิตเชื้อจุลินทรีย์สำหรับนำไปเป็นสารเสริมชีวิตในอาหารสัตว์ในเชิงพาณิชย์ ซึ่งจากการสำรวจ (2) พบว่าปริมาณการนำเข้าสารเสริมชีวิตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ

โดยเพิ่มปีละครั้งปี 2534 ถึงปี 2538 เพิ่มขึ้นจาก 42 คันเป็น 100 คัน ถ้าประเมินจากสาม ข้อการทำให้สามหัวขั้วบนเพื่อหาสมการปฏิบัติที่ควรใช้ทั้งหมดจะประมาณได้เท่ากับ 1460 คัน ในปี 2538 ดังนั้นโอกาสที่จะผลิตสามหัวขั้วบนที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเดินรถหัวขั้วจะมี สถานภาพและศักยภาพที่เป็นไปได้มาก ทั้งยังมีผลดีต่อเศรษฐกิจของประเทศทั้งการที่มีมูลค่า และมูลค่าของผลิตภัณฑ์ตลอดจนการลดการนำเข้าทั้งผลิตวัตถุดิบปฏิบัติหัวขั้วและสารเสริม ปฏิบัติหัวขั้วจากต่างประเทศ

ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ในนม Lactic acid bacteria โดยทั่วไปมีปัญหาที่สำคัญที่หาได้ไม่ ได้ความเข้มข้นของเชื้อที่สูงเนื่องจากกรดอินทรีย์ที่ผลิตสาร (โดยมีการแตกตัวเป็นกรด) ที่ขึ้น ลงขึ้นมาจากไขมันและคาร์โบไฮเดรตในสภาพเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำสูงจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต ของเชื้อเอง (3-5) การแก้ปัญหาที่หาได้โดยแนวทางทางการใช้กระบวนการแยกสารกรด ผลิตภัณฑ์กรดออกจากให้ไว้ระดับความเข้มข้นที่มีผลโดยต่อการกันถึงการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ที่สำคัญและแนวทางนี้ จนไปถึงจุดนี้ได้มีกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มได้ศึกษาและประยุกต์ใช้เทคนิค ต่างๆ เช่น Electrodeposition (6), Resin adsorption (7) และ Solvent Extraction (8) เป็นต้นเพื่อ การแยกสารกรดออกจากผลิตภัณฑ์เพื่อให้จุลินทรีย์ในเจริญเติบโตต่อไปได้ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ในระดับหนึ่ง ซึ่งเทคนิคนี้ได้ถูกใช้สำหรับเพิ่มผลผลิตในกระบวนการผลิตกรดแลกติก ในอีก แนวทางหนึ่งที่มีความเป็นไปได้คือการควบคุมเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจาก ภาวในปริมาณที่น้อยจะมีผู้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของผลผลิตของจุลินทรีย์ของกระบวนการ เมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับ Lactic acid bacteria มาเป็นเวลานานแล้ว (9) แต่การประยุกต์ใช้ข้อ มูลวิจัยพื้นฐานเหล่านี้กับการควบคุมเมตาบอลิซึมเพื่อลดการสร้างกรดแลกติกและเพิ่มความ เจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตชีวมวล (biomass) ของเชื้อยังไม่มีปรากฏงานการค้นคว้าที่ ชัดเจน แนวทางในการควบคุมเมตาบอลิซึมเพื่อลดการสร้างกรดแลกติก สามารถกระทำได้โดยการใช้ สิ่งกีดขวางและปัจจัยอื่นต่อไป

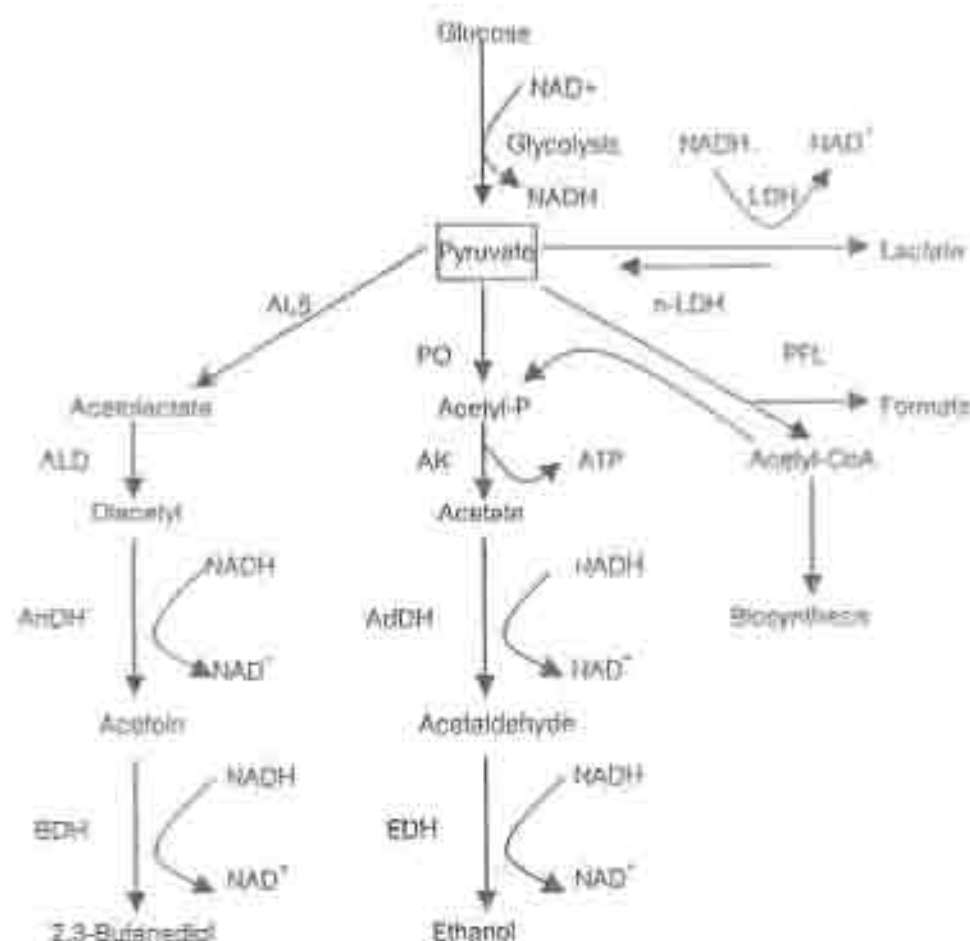
ผลของสภาวะแวดล้อมต่อเมตาบอลิซึม

สภาวะแวดล้อมทางกายภาพ เช่น pH (เบสเป็น) และปริมาณออกซิเจนที่จะสามารถอยู่ในสภาพนั้น มี ผลอย่างมากต่อการเจริญเติบโตและเมตาบอลิซึมของเชื้อ (10-11) พบว่าในบางสายพันธุ์ใน สภาวะที่มีสภาวะจะมีการสร้าง acetoin เกิดขึ้นโดยกลไก pyruvate decarboxylase และจะทำให้มี อัตราการเกิด proton motive force และการสร้าง ATP สูงกว่าเมื่อไม่มีสภาวะ ทั้งนี้เพราะเกิด การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ NADH oxidase ซึ่งจะมีการนำ NAD^+ ไปรูป NADH กลับมา ใช้ได้มากขึ้น ทำให้ได้ growth yield ที่สูงขึ้น กรณีที่มีการเติมอากาศให้เฉพาะตัวก็มีการสร้าง กรดแลกติกลดลง เนื่องจากระดับ NADH ลดลง

ปัจจัยของแหล่งอาหารต่อเมตาบอลิซึม

Lactic acid bacteria นี้พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงาน จุลินทรีย์กลุ่มนี้อาศัยการถ่ายเทอิเล็กตรอนแบบ Substrate-level phosphorylation โดยใช้วิถีทาง เมตาบอลิซึมในการใช้น้ำตาล เปลี่ยนไปเป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่แต่ละสายพันธุ์มีอยู่ นอกจากนี้อาจมีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ โดยส่วนใหญ่มีการรวมการ TCA หรือ Krebs cycle ที่ไม่สมบูรณ์ และขาดความสามารถในการสังเคราะห์กรดอะมิโน หรือวิตามินบางชนิดขึ้นมาใหม่ ดังนั้นจึงมีความต้องการสารอาหารหลายชนิด และมักจะมีเจริญได้ดีในสภาพเชิงซ้อน (complex medium) ซึ่งจะต้องมีองค์ประกอบของน้ำตาล วิตามิน นิวคลีโอไทด์จากภายนอก ปิศาจมีความ ต้องการกรดอะมิโนในเพียงบางชนิดเท่านั้นในการเจริญเติบโต ในขณะที่ lactic acid bacteria บาง ชนิดมีความต้องการกรดอะมิโนถึง 14 ชนิด เช่น *Lactobacillus helveticus* และยังพบว่ากลุ่ม เอนไซม์ proteases และ peptidases ในแต่ละสายพันธุ์ก็ยังคงมีความแตกต่างกัน ดังนั้นความ สามารถในการใช้แหล่งโปรตีนจึงแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

รูปแบบการเปลี่ยนไปได้ในกระบวนการย่อยสลาย pyruvate ในแบคทีเรียแลคติก (Tseng and Mohnville, 1993 (12))



คำอธิบาย: LDH, lactate dehydrogenase; nLDH, NAD-dependent lactate dehydrogenase; ALD, acetaldehyde dehydrogenase; PFL, pyruvate formate lyase; POH, pyruvate oxidase; EDH, ethanol dehydrogenase; ALS, D-lactobacillus synthase; ALA, D-lactobacillus decarboxylase; AdDH, acetaldehyde dehydrogenase; BDH, 2,3-butanediol dehydrogenase; PO, pyruvate oxidase; AK, acetate kinase; PTC, phosphotransacetylase (Tseng and Mohnville, 1992a)

ในทางทฤษฎีการใช้น้ำตาล Hoxose ของ lactic acid bacteria จะใช้ pyruvate เป็นตัวกลาง (intermediate) ก่อนที่จะเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกโดยเมตาบอลิซึมเหล่านี้เกิดขึ้นเพื่อศึกษาสมมูลระหว่างตัวแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนพวก NAD^+/NADH และ $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ทั้งนี้ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญ ผลิผลาน ATP ที่ได้นี้มาจากกระบวนการ fermentation ใน glycolysis เบื้องต้น และในขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาล hoxose ไปเป็น pyruvate และการเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น pyruvate จำเป็นต้องใช้ตัวรับอิเล็กตรอน NAD^+ ได้ NADH ดังนั้นการเปลี่ยนรูป NADH กลับไปเป็น NAD^+ เพื่อนำไปใช้ใหม่ และเพื่อผลักดันให้เกิดการสร้าง ATP ขึ้นเรื่อยๆ จึงมีความจำเป็น ซึ่งการนำ NAD^+ กลับมาใช้ใหม่ จะเกิดขึ้นควบคู่กับ การเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น lactate หรือ end-product ใดๆ (ดู pathway ของการเกิด pyruvate) รวมทั้งกลไกการใช้ NADH โดย NADH oxidase ในสภาวะที่มี oxygen อีกด้วย

จากที่กล่าวมาข้างต้น ในด้านการประยุกต์ใช้เพื่อการควบคุมการสร้าง lactate และ ความต้องการใช้แหล่งโปรตีนเชิงซ้อน ซึ่งนอกจากจะมีโครงสร้างโมเลกุลต่างๆ ไขมันที่จำเป็น รวมไปถึงน้ำตาลกลูโคส ความรู้เกี่ยวกับทางชีวเคมีในการเกิดจุลินทรีย์ Lactic acid bacteria อาจจะมีผลในการควบคุมการสร้าง lactate ได้ โดยการให้แหล่งอาหารที่เหมาะสมในโคแวกซ์ เป็นการกระตุ้นกระบวนการสังเคราะห์ ซึ่งต้องใช้เวลาและเป็นการเกิดจากกระบวนการ Glycolysis ซึ่งสามารถเป็นแหล่ง pyruvate ได้เช่นกัน นอกจากนี้แหล่งที่อยู่ในแหล่งโปรตีนเชิงซ้อนยังสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงาน ATP ควบคู่ไปกับการสมมูลของ NAD^+/NADH โดยการใช้ NADH oxidase อย่างมีวาระดีกว่าภาพ ให้การไหลของน้ำตาลไปเป็นกรด lactate ได้อย่าง การประยุกต์ใช้ของโคแวกซ์ ในการเกิดจุลินทรีย์

จากการศึกษาในวิธีแยกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากจุลินทรีย์ในโคแวกซ์ lactic acid bacteria พบว่าเมื่อมีการควบคุมการให้น้ำตาลแก่จุลินทรีย์จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณการไหล (flux) ของสารต่างๆ ในวิธีเมตาบอลิซึม และมีความสามารถในการใช้ ที่ชี้ให้เห็นว่า intermediate product เช่น alcohol และกรดไขมันที่มีจะปลดปล่อยจุลินทรีย์ถูกจำกัดปริมาณน้ำตาลที่ให้อีก เช่น Ethanol ในการเกิด *Saccharomyces cerevisiae* (13) และการผลิต acetate ในการเกิด *Escherichia coli* (14) ในการศึกษาเหล่านี้จะเน้นการศึกษาการประยุกต์ใช้ เทคนิค Feed-batch (15) ในการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลให้อยู่ในระดับต่ำ โดยมีเป้าหมายที่จะลดการไหลของน้ำตาลในวิธีเมตาบอลิซึมไปสู่การสร้างกรดแลคติก ทั้งนี้อาจมีการใช้ การศึกษาการเป็นแนวทางและมีการนำกลับมาใช้ของ NAD^+/NADH โดยผ่านปฏิกิริยาภาพ การใช้ น้ำตาลในการผลิตชีสแบบ Food-batch จะช่วยเสริมการใช้แหล่งโปรตีนเชิงซ้อนสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อไปพร้อมกันด้วยในส่วนของ การใช้เป็นแหล่งพลังงาน ATP สำหรับกระบวนการสังเคราะห์และการเจริญเติบโตของเชื้อ

2. วิธีการทดลอง

2.1. เชื้อที่ใช้ในการศึกษา คือเชื้อ Lactic acid bacteria สายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งได้ถูกคัดเลือกสำหรับการใช้เป็น Probiotics เชื้อที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจะถูกเก็บที่ -80°C โดยแช่แข็งที่แห้งใน สตูรอาหาร MRS เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ช่วง log phase) กับ glycerol ให้ได้ glycerol 30% ซึ่งเป็นส่วน cryoprotective agent อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อคือ 37°C

2.2. สตูรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้เป็นมาตรฐานคือ MRS-broth (10) ซึ่งเป็นสตูรอาหารสูตรสำเร็จและเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ Lactic acid bacteria ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้ น้ำ 1 ลิตร ดังนี้
tryptone 10g; meat extract 8g; yeast extract 4g; glucose 20 g; di-potassium hydrogen phosphate 2g; tween 80 1 g; di-ammonium hydrogen nitrate 2 g; sodium acetate 8g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.04g

สตูรอาหารสูตรอาหารอื่นที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อทำได้โดยการ modify สตูรอาหาร MRS โดยการแทนที่ส่วนผสมที่อยู่ใน MRS จำนวนหนึ่งโปรตีนชนิดต่างๆ คือ

- yeast extract
- การเปลี่ยนเป็นสตูรโดยกรด
- meat extract
- โปรตีนสกัดจากปลาช่อน (fish soluble protein-extract)
- โปรตีนสกัดจากปลาช่อนสตูรโดยกรด

โดยปริมาณความเข้มข้นของแหล่งโปรตีนจะแตกต่างกันตามการทดลอง

2.3. ปริมาณ cell ในสารละลาย

-วิธีวัด Optical Density โดยจะทำการวัดที่ absorbance ที่ 600 nm ซึ่งก่อนทำการวัดจะทำการเป็นแบค cell และล้างด้วยน้ำ หลังจากนั้นก็ทำการโยยางความเข้มข้นของ cell ซึ่งวัดให้ค่า absorbance อยู่ในช่วงที่เป็นความสัมพันธ์เส้นตรงคือ 0.2-0.8 ในการวัดจะใช้น้ำกลั่นเป็น blank

-วิธีวัด Viable Plate Count ซึ่งเป็นการหาจำนวน cell ที่มีชีวิตโดยทำ serial dilution นำเลี้ยงเชื้อโดยการใช้น้ำ agar เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำการ spread plate ใน MRS Agar plate และ incubate เชื้อที่ 37°C เป็นระยะเวลาประมาณ 2 วัน ก่อนทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณหา viable count (cfu/mL)

2.4. การกลั่นเชื้อ

ใช้สารเคมีโดยวิธี Gas Chromatography (GC 17 A, Shimadzu, Japan) โดยใช้ detector ชนิด Flame Ionization Detector (FID), Column ที่ใช้เป็น Column แก๊สความยาว 2 m เส้นผ่าศูนย์กลางกลางภายใน 2mm ที่มีสาร packing คือ 80/120 [CARBOWAX 20M] 80/120 (CARBOWAX 20M) จุดอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ในห้อง Column คือ 190°C Carrier gas ที่ใช้คือ Nitrogen Gas (Ultra High Purity Grade)

ในการวิเคราะห์ Lactic acid จะทำโดยการคำนวณความเข้มข้นจาก Standard Curve ของ Lactic acid โดยใช้ Butyric acid เป็น internal standard.

2.5. Total Sugar ทำการวิเคราะห์น้ำตาลในรูปแบบของ Total Sugar โดยใช้วิธี Phenol Sulfuric Test (17)

2.6. การเตรียมกากตัวเหลืองที่ย่อยด้วยกรด

นำกากกากเหลืองมาผสมกับน้ำในอัตราส่วน 200 g ต่อ น้ำ 700 ml เติมน้ำ Tannamyl เมลไธมิลและ potassium ที่ 100°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อย่อยและให้เป็นน้ำตาลแล้วปั่นแยกส่วนไลต์ที่มีน้ำตาลใสไปก่อน ทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง (การทำในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะสกัดน้ำตาลในอาหารเม็ดเชื้อซึ่งจะสามารถละลายไปเป็น lactic acid ได้) นำกากตัวเหลืองที่ผ่านขั้นตอนแล้วมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดไปแล้วมาทำการย่อยโดยใช้กรด HCl 0.17 M ในอัตราส่วนกากตัวเหลือง 50 g ผสมกรด 175 ml เติมน้ำกากตัวเหลืองในหม้อ Reflux เป็นระยะเวลา 3.5 และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งจะได้น้ำกากตัวเหลืองย่อยที่สามารถจะส่งๆ กัน ก่อนนำไปใช้จะมีการทำให้สารละลายกากตัวเหลืองย่อยเป็นกลางโดยการ Neutralize ให้ได้ pH 7 โดยใช้ 0.37 N NaOH หลังจากนั้นทำการปั่นแยกและกรองเอากากที่ความเร็ว 5000 rpm, 20 นาที นำเอาส่วนใสไปใช้เชื้อได้เลย

2.7. การย่อย meat extract ด้วยเอนไซม์

เตรียมสารละลาย meat extract 5 g ในน้ำกลั่น 80 ml นำไป autoclave ที่ 110°C 10 นาที วัตถุประสงค์ไม่ให้เกิดเอนไซม์ xolizyme (Novo Nordick, Denmark) 0.1 g ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 55°C เป็นระยะเวลา 17 และ 35 ชั่วโมงตามลำดับ

2.8. การย่อย Fish Soluble Protein Extract

ทำการย่อย Fish soluble Protein ในสภาพ slurry (มี moisture content 58.9%) โดยใช้กรด HCl 5 N ในอัตราส่วน Fish Soluble Protein 100 g ต่อกรด 100 ml ทำการเคี่ยวเป็นระยะเวลา 6 และ 10 ชั่วโมงตามลำดับ ทำสารละลายที่ใช้สำหรับการย่อยให้เป็นกลางโดยใช้ 10 N NaOH เป็นเบสแยกเอากาก Fish Soluble Protein ที่เหลืออยู่ และนำส่วนใสไปใช้เชื้อหรือ

2.9. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen, TN)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl ด้วย 1025 Kjeldahl system (Tecator, Sweden) โดยการย่อยตัวอย่างที่อยู่ในรูปของเหลวหรือผงด้วยกรด H_2SO_4 เติมน้ำที่อุณหภูมิ 430°C ได้แก๊สแอมโมเนีย นำแก๊สแอมโมเนียไปกลั่นเพื่อได้ก๊าซแอมโมเนียซึ่งจะถูกส่งโดยกรรตาเหลว จากนั้นทำการ measure ด้วยสารละลาย std. HCl ที่เข้มข้นปริมาณ 5 N อนึ่งในการวิเคราะห์ครั้งนี้จะทำการหา % free ammonia ซึ่งมีอยู่ในตัวอย่างก่อนทำการเผาไปวัดไนโตรเจนที่ไม่ใช่ free ammonia โดยใช้ตัวอย่างที่ไม่มีการย่อยเป็น blank

2.10. ปริมาณไนโตรเจนในกรดอะมิโน (amino nitrogen, AN)

วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค indirect formal titration (18) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เติมหิวด้วยน้ำ 1 ml (ซึ่งมี % solid ประมาณ 1% ถ้าจะยึกการปรับเบสมีขนาดเล็กหิวด้วยน้ำให้ตามความเหมาะสม) ลงใน beaker ซึ่งตั้งที่ความสะอาดปราศจากโปรตีนใดๆ
 2. ทดปริมาณน้ำให้ได้ 10 ml โดยใช้ไม้กลั่น ทวนให้เข้ากัน
 3. ปรับ pH ของตัวอย่างในข้อ 2 ให้ได้ pH = 7 (ถ้าหา Calibrate pH probe ที่ใช้เป็นอุปกรณ์ทำการวัด)
 4. เติมน้ำละลาย formaldehyde (33% pH 9.0) 10 ml ลงในสารละลายข้อ 3 ค่า pH จะลดลงจนคงที่
 5. ทำการ titration ด้วย 0.1 N NaOH จนสารละลายมีค่า pH = 9.0
 6. คำนวณค่า Amino nitrogen จากสูตร

$$\% \text{ w/v AN} = 1.0 (\text{Sample vol.}) \times 14 \times 0.100 \times (\text{Vol NaOH} \times 10/1000)$$
- หมายเหตุ วิธีนี้จะไม่สามารถบอกความแตกต่างในการวิเคราะห์ระหว่าง sample กับ control ได้

2.11. การเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการ

การเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการจะกระทำในห้องปฏิบัติการขนาด 5 litre (บริษัท Sioxette ประเทศฝรั่งเศส รุ่น Master) ซึ่งมีการวัดและความคุมค่า dissolved oxygen และ pH ของ broth อยู่ตลอดเวลาของกระบวนการในห้องปฏิบัติการ ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการจะควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- อุณหภูมิควบคุมที่ 37 °C
- pH ควบคุมที่ 8.5 โดยการเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 5 M
- ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในน้ำเลี้ยงเชื้อ (dissolved oxygen) จะควบคุมให้อยู่ในระดับสูงกว่า 10% saturation DOT โดยการเพิ่มอัตราการเติมอากาศ (aeration) ระหว่าง 0.5-2.0 vvm และการเพิ่มความเร็วรอบของใบกวนระหว่าง 50-900 rpm

การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ batch cultivation

ใช้ working volume เท่ากับ 3 litre และมีขั้นตอนเลี้ยงเชื้อโดยให้วันแรกจะเลี้ยงซึ่งที่เก็บที่ -50 °C ปริมาตร 1 ml ฉาบในขวดเชยที่มีอาหาร MRS ปริมาตร 100 ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 9 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำกลั่นเชื้อที่ได้มาถ่ายลงในถังปฏิกรณ์ที่มีอาหารชนิด MRS และ modified MRS (ซึ่งมีการใช้ digested fish soluble แทน yeast extract ในปริมาณ Total Nitrogen ที่เท่ากัน) ทำการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะควบคุมของอุณหภูมิ, pH และ dissolved จนกระทั่งถึงความเข้มข้นของเชื้อสูง (วัดจากค่าความทึบ OD 600) จะทำการเลี้ยงเชื้อจะมีการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อ (broth) ทุก ๆ 2 ชั่วโมง เพื่อการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผลิตและปริมาณกรดไขมันในน้ำเลี้ยงเชื้อในสารวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน น้ำเลี้ยงเชื้อจะมีการเก็บแยกเซลล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผลิตด้วยเครื่อง (Hatch Zoonitrogen, ประเทศเยอรมัน) model universal 16 R ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที

การเลี้ยงจุลินทรีย์โดยเทคนิค fed-batch

ในขั้นตอนแรกจะทำกาเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ batch ที่ปริมาณเริ่มต้น 2 ลิตร โดยให้สูตรอาหาร (ปริมาณต่อลิตร) tryptone 15 g, meat extract 12 g, glucose 5 g, di-potassium hydrogen phosphate 2 g, tween 80 2 ml, di-ammonium hydrogen citrate 5 g, sodium acetate 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.06 g, digested fish soluble (DFS) ปริมาณ Total Nitrogen เทียบเท่ากับ yeast extract ที่ 12 g เมื่อทำการเลี้ยงจนกระทั่งน้ำเลี้ยงที่ให้ในครั้งแรกเริ่มหมด (ที่การเลี้ยงประมาณชั่วโมงที่ 4) โดยสังเกตจากค่า pH และค่า dissolved oxygen ที่สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงจะเริ่มทำการ feed อาหารด้วยวิธีการเติมอาหารแบบ constant feeding หรือ exponential feeding ตามแต่ต้องการทดลอง การเติมอาหารทั้งหมดไปดินและน้ำจะจะใช้ peristaltic pump 2 เครื่อง (pump model 101 U/R, WATSON MARLOW INC. ประเทศอังกฤษ และ pump model SJ 1211, ATTO CORPORATION ประเทศญี่ปุ่น) การควบคุมอัตราการเติมอาหารจะควบคุมแบบ manual ที่ pump โดยช่วงซึ่งมีการทำ Calibration อัตราการ feed ก็คงที่น้ำ โดยจะมีการตรวจสอบค่าความถูกต้องของอัตรา feed โดยการตรวจสอบกับค่าไนโตรเจนของอาหารที่ใช้ feed โดยการชั่งโดยใช้เครื่องชั่งไฟฟ้า (model PT 3100, Sartorius, ประเทศเยอรมัน) ในการทำ fed-batch and exponential feeding จะมีการเติมโปรตีนและน้ำตามด้วยอัตราที่คำนวณจากสมการ

$$F = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot X_0 \cdot t^{1/\mu} \cdot V_0$$

โดย F=อัตราการ feed โปรตีน หรือ glucose solution

μ =ค่าอัตราการเจริญเติบโตเฉพาะ (specific growth rate) ที่ระบุกำหนดเพื่อ

ใช้ในการเพิ่มหรือลดอัตราการ feed

X_0 =ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น

V_0 =ปริมาตรเริ่มต้นของน้ำเลี้ยงเมื่อเริ่มทำการ feed

S_0 =ความเข้มข้นของน้ำตาลหรือโปรตีนเริ่มต้น

$Y_{X/S}$ =growth yield (ของเซลล์ต่อน้ำตาลหรือโปรตีนที่ใช้) คำนวณได้จากการทดลองสูตรอาหารที่ใช้ในการทำการทดลอง exponential feeding โดยทั่วไป ประกอบด้วย

- สารละลายน้ำตาล (glucose solution) ความเข้มข้น 330 g/L
- สารละลายโปรตีน (protein solution) ประกอบด้วยสารอาหารที่มีความเข้มข้น (g) ต่อ litre ดังนี้ tryptone, 230 ; meat extract, 230 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3.2 g ; $MgSO_4 \cdot H_2O$, 0.64 g ; tween-80, 15 ml และ digested fish soluble protein (DFS) ที่มีปริมาณ Total nitrogen เท่ากับ 15.3 g

ในการผ่านเชื้ออาหารสำหรับ feeding จะใช้สภาวะคือ 121°C , 15 นาที (กรณีในภาชนะ
ทดลองที่ทดสอบบิโอดีออก Membrane reaction จะใช้สภาวะ 110°C , 15 และ 10 นาที) โดยมี
การแยกการฆ่าเชื้อระหว่างสารละลายน้ำพาส และสารละลายโปรตีน

3. ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาการให้อาหารสัในระดับต่าง ๆ เพื่อการกระตุ้น oxidative phosphorylation ของ lactic acid bacteria

จากการศึกษาเบื้องต้นใน Fermentor พบว่าเชื้อ lactic acid bacteria ที่ใช้ศึกษา (สายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus*) มีการใช้ออกซิเจนอยู่ในระดับสูงคือ 100 mgO₂/Lb ที่ความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1 g/L ในช่วงการเจริญเติบโต log phase และอัตราการใช้ออกซิเจนนี้ลดลงเมื่อเพิ่ม c-source ที่ใช้คือน้ำตาลเข้มข้น ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า lactic acid bacteria ที่ใช้ในการศึกษามีเมตาบอลิซึมซึ่งสามารถให้ออกซิเจนได้ซึ่งน่าจะเป็น oxidative phosphorylation ตามที่มีรายงานก่อนหน้านี้สำหรับ lactic acid bacteria บางชนิด (19-22) จากผลการทดลองนี้จึงได้มีการศึกษาต่อเนื่องถึงอิทธิพลของการให้อาหารในระดับต่าง ๆ กับอัตราการเจริญเติบโตและเซลล์มวลการสร้าง lactic acid โดยการศึกษาเบื้องต้นซึ่งชื่อใน Table 1 ที่มีการรายงานและไม่เข้แก่เพื่อการให้อาหารที่ระดับสองกัน

จากการศึกษาโดยใช้ glucose เป็นแหล่ง c-source พบว่าอัตราการเติบโตสามารถเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้มีอาหารให้ออกซิเจนที่ไม่แตกต่างต่อการเจริญเติบโต ผลของการสร้าง lactic acid ของเชื้อ (รูปที่ 1,2) โดยกรณีที่ใช้ glucose เป็น c-source จะจะมีการสร้าง lactic acid ขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง ไปพร้อมๆ กับการเจริญเติบโต อย่างไรก็ดีตามในกรณีการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ yeast extract เป็นแหล่ง c-source หลักพบว่าการเติมอาหารตามมีผลทำให้ lactic acid แม้ว่าจะถูกสร้างขึ้นในช่วงแรกของการเจริญเติบโตก็มักจะถูกนำกลับไปใช้และมีความเข้มข้นลดลงในเวลาต่อมาในขณะที่เทียบกับการเจริญเติบโตของเชื้อมากขึ้นเมื่อเทียบกับกรณีที่ใช้ glucose เป็นแหล่ง c-source

การวิเคราะห์ผลปริมาณน้ำตาลรวม (Total Sugar) ซึ่งมีอยู่ใน yeast extract พบว่าช่วงเวลาที่ใช้ lactic acid ถูกใช้และผลผลิตจะเริ่มที่ช่วงเวลา Total sugar ถูกใช้ไปและผลผลิตในปริมาณที่คงที่ (รูปที่ 3) จึงมีสมมติฐานว่า Total sugar ส่วนที่เหลือเป็นน้ำตาลบางส่วนที่เหลืออยู่ซึ่งยังไม่สามารถใช้ได้และการสร้าง lactic acid ในช่วงแรกก็อาจมาจากการใช้ส่วนผสมส่วนที่ใช้ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับสถานการณ์ที่เลี้ยงเชื้อโดยใช้ yeast extract ในสภาวะที่มีการให้อาหารและไม่ให้อาหารพบว่าในการเลี้ยงที่ไม่มีการให้อาหารเพียงอย่างเดียว lactic acid ที่ถูกสร้างจะไม่ถูกใช้และจะมีความเข้มข้นจะไม่ลดลง (รูปที่ 2) ผลการทดลองนี้ได้รับการยืนยันโดยการทดลองที่ใช้ yeast extract ที่ความเข้มข้นสูงซึ่งจะมีการเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้อาหารเท่านั้น (รูปที่ 4,5) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่มีอาหารที่ต่ำกว่าในสภาวะที่ไม่มีอาหารและ lactic acid ที่สร้างขึ้นสามารถถูกนำกลับไปได้ซึ่งในกรณีที่มีการให้อาหารเท่านั้น

จากผลการทดลองที่กล่าวมาจึงมีการตั้งสมมติฐานว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้จะมีระบบเมตาบอลิซึมคล้ายคลึงกับเชื้อในกลุ่ม lactic acid bacteria ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (21-22) คือ เชื้อสามารถมีการใช้ NADH โดยเอนไซม์ NADH Oxidase และอิเล็กตรอนซึ่งเมตาบอลิซึมนี้จะถูกกระตุ้นในกรณีที่มีการให้อาหาร (ซึ่งในสภาวะที่ไม่มีอาหารพบเพียง NADH จะถูกใช้ใน

ปฏิกิริยาการสร้าง lactic acid) การเติมอากาศซึ่งน่าจะทำให้ระดับ NADH เป็นประโยชน์ลดลงและ เป็นสาเหตุต่อเนื่องทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาจากกรด lactic ไปยัง pyruvate ซึ่ง ใช้ NAD⁺ ในการ Coupling การใช้ NADH นอกจากจะมีส่วนทำให้เกิดการลดลงของปฏิกิริยา การสร้าง lactic acid แล้วยังมีส่วนเพิ่มการผลิต ATP ซึ่งน่าจะทำให้ได้ปริมาณ acid มากกว่า (รูปที่ 1)

3.2 การศึกษาการใช้สูตรอาหารอื่นเพื่อทดแทนการใช้น้ำตาลในสารเลี้ยงเชื้อ Lactic acid bacteria

ได้มีการศึกษาการใช้แหล่ง Carbon ชนิดต่างๆเป็นแหล่ง carbon พลัง และ glucose ในสูตรอาหาร MRS ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* จากผลการทดลองซึ่งสรุปโดย ตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า yeast extract เป็นแหล่ง carbon ที่ดีที่สุดที่ใช้ การเจริญเติบโตของ เชื้อได้ดีที่สุดขณะเดียวกันก็ทำให้เชื้อผลิต lactic acid ในปริมาณที่น้อยที่สุดด้วย (0.5 g/L)

ในการศึกษาใช้ glucose และกากน้ำตาล (molasses) ในการเลี้ยงเชื้อพบว่าได้จำนวน เชื้อที่นับได้ (viable count) ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับการใช้ yeast extract เป็นแหล่ง carbon ซึ่งเป็นเพราะในการศึกษาใช้กากน้ำตาล 2 ชนิดในการเลี้ยงเชื้อมีการสร้าง lactic acid ออกมาใน ปริมาณที่ค่อนข้างสูง (ประมาณ 8g/L) และมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเอง (3-5) ในขณะที่ เติบโตกับเมล็ดเบียร์ที่ผสมผล yeast count ของการเลี้ยงโดย molasses พยายามปริมาณน้อยกว่า glucose ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของ inhibitors ตัวอื่นๆ ได้แก่โลหะหนักบางชนิดที่มีอยู่ใน molasses ในการศึกษาการใช้ glycerol ในการเลี้ยงเชื้อผลแสดงให้เห็นว่าเชื้อใช้ glycerol ได้ใน ปริมาณที่น้อย

จากผลการทดลองสามารถวิเคราะห์ได้ว่าการใช้ yeast extract เป็นแหล่ง carbon นั้น สามารถใช้ได้กับแหล่ง carbon ในรูปของ free amino acids and peptides โดยผ่านกระบวนการ proteolytic activity (23-25) และสามารถเข้าสู่เมตาบอลิซึมของเซลล์ได้โดยผ่านกระบวนการ การใช้กรดอะมิโนและผ่าน TCA cycle (ที่ไม่สมบูรณ์) เมื่อเปรียบเทียบกับเมตาบอลิซึมการใช้น้ำตาล พบว่าการนำตาลจะเข้าสู่เมตาบอลิซึมผ่านกระบวนการ glycolysis ที่ซึ่งน้ำตาลส่วนใหญ่มักเปลี่ยนเป็น pyruvate และสามารถเปลี่ยนเป็น lactic acid ได้โดยตรง ดังนั้นการใช้ alcohol acids และ polypeptides จึงน่าจะเป็นการให้ทางที่ดีแก่เมตาบอลิซึมของเชื้อทำให้ลดการสร้าง lactic acid ได้ ซึ่งผลการทดลองได้ยืนยันสมมติฐานนี้

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองการใช้ yeast extract เป็นแหล่ง carbon ทั้งหมดในการ เลี้ยงเชื้อ ไม่สามารถที่จะยับยั้งการสร้าง lactic acid ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ใน yeast extract นั้นยังมีส่วนผสมของน้ำตาลในรูปของ total sugars และ amino acids บางตัว ที่สามารถเปลี่ยนเป็น pyruvate ซึ่งสามารถนำไปสร้างเป็น lactic acid ต่อไปได้

ผลสรุปที่พบว่า yeast extract เป็นแหล่ง carbon ที่เหมาะสมกับการเลี้ยงเชื้อนั้นได้มีการ ศึกษาผลโดยการเลี้ยงเชื้อโดยได้ปริมาณ yeast extract ที่มากขึ้น จากผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของเชื้อสามารถทำให้สูงขึ้นได้โดยการเลี้ยงที่ใช้ yeast extract มากขึ้น (รูปที่ 6 a-c) จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ซึ่งเป็นทั้งแหล่งอาหารในรูปแบบ carbon และ nitrogen)

ลดต้นทุนปริมาณ lactic acid ที่เชื้อสร้างขึ้นพบว่าโปรตีนในบางส่วนเท่านั้นที่ถูกใช้ไปและสามารถ
เข้มข้นสุดที่ประมาณ lactic acid มีปริมาณที่น้อยกว่า 0.5 g/L การเพิ่มความเข้มข้นและความปริมาณ
ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์กับปริมาณ yeast extract ที่ใช้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่เป็นลักษณะ (รูปที่
3-5-5)

จากการศึกษาโดยใช้ yeast extract ที่ความเข้มข้นสูงถึง 12% พบว่าสามารถปรับ/ปรับ
ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงถึง 10^{10} cfu/ml ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นที่มักใช้
ในอาหาร เป็นแหล่ง carbon (ในสูตรอาหาร MRS) 10 g/L

แม้ว่าการทดลองจะชี้ให้เห็นว่าการใช้ yeast extract เหมาะสมกับเชื้อ Lactobacillus
acidophilus และสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อในการเลี้ยงได้ แต่การใช้ yeast extract ก็ยังมี
เหมาะสมกับกระบวนการผลิตเชื้อ lactic acid bacteria ในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรม
ซึ่งต้นทุนของวัตถุดิบเป็นสิ่งสำคัญด้วย จึงได้มีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการลดอาหารอื่นๆ
ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคล้ายกับ yeast extract คือเป็นแหล่งโปรตีนที่มี amino acids และ
peptides และเป็นแหล่งอาหารที่ราคาถูกเป็นวัตถุดิบที่สามารถหาได้ง่ายในระยะเวลาทำการ
ศึกษาต่อ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาเชิงวิเคราะห์ทางด้านโครงสร้างและลักษณะของโปรตีนที่
เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อ lactic acid bacteria

3.3 การศึกษาอิทธิพลของแหล่งและลักษณะโปรตีนซึ่งใช้เป็นแหล่ง carbon แทนน้ำ ตาลในการเลี้ยงเชื้อ lactic acid bacteria

3.3.1 การใช้ขอสกัดเห็ดถั่งเช่าเป็นแหล่งโปรตีนทดแทน yeast extract

ได้มีการทดแทนน้ำเชื่อมที่เห็ดถั่งเช่าซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่ได้จากการย่อยจากเห็ดถั่งเช่าโดย
ใช้กรดอะมิโน amino acids มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* โดยขอสกัดเห็ดถั่งเช่า
ที่ให้ได้จากโรงงานเป็นชนิดที่ยังไม่ได้มีการปรุงรส และเนื่องจากในกระบวนการผลิตเห็ดถั่งเช่า
เห็ดถั่งเช่าใช้ กรดเกลือ (HCl) เข้มข้นจะได้ by-product คือเกลือไนเตรตที่ค่อนข้างสูง (10-
15%) จึงได้มีการทำ Electrodialysis เพื่แยแยกเกลือออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อได้สารสกัดเห็ดถั่งเช่า
เห็ดถั่งเช่าที่เกลือต่ำ (ED-SS)

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อโดยใช้ yeast extract (YE) 2% เป็นค่าควบคุมเปรียบเทียบกับและ
ใช้ 5% ED-SS, NED-SS (ขอสกัดเห็ดถั่งเช่าที่ไม่ได้ทำการแยกเกลือออก) ซึ่งมีปริมาณ Total
Nitrogen เท่ากันเท่ากับของกรณี YE2% นอกจากนี้ยังได้ทดลองเพิ่มปริมาณ Total Nitrogen
โดยเพิ่ม % ED-SS เป็น 10% ผลการทดลอง (รูปที่ 7) ชี้ให้เห็นว่าขอสกัดเห็ดถั่งเช่าสามารถนำมา
ใช้เป็นแหล่ง carbon ในการเลี้ยงเชื้อได้ อย่างไรก็ตามพบว่าในกรณีที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็น
ขอสกัดเห็ดถั่งเช่ามีอัตราการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับกรณีที่ใช้ Yeast Extract
เป็น carbon source ซึ่งอาจสันนิษฐานสาเหตุได้ 2 ประการคือ ประการแรก อาจจะมีสารยับยั้งบาง
ชนิดอยู่ในขอสกัดเห็ดถั่งเช่าและประการที่สองคือขอสกัดเห็ดถั่งเช่ามีปริมาณ vitamin ที่เหมาะสมกับ
การเจริญเติบโตของเชื้อในปริมาณน้อย จากการเติม 0.4% YE supplement ลงไปในอาหาร
เลี้ยงเชื้อซึ่งมีขอสกัดเห็ดถั่งเช่าที่ 10% อยู่ (รูปที่ 7) พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น แม้

ว่าจะมีลักษณะการถูกเก็บเกี่ยวในช่วงแรกๆของการเจริญเติบโต จึงอาจตั้งสมมติฐานได้ว่าในขณะ
ที่เมล็ดงอกจะมีปริมาณ vitamin ที่น้อยและอาจจะมีการยับยั้งบางชนิด ทางด้านอิทธิพลของ
ปริมาณ Total Nitrogen ที่ให้พบว่าเมื่อมีการเพิ่มปริมาณ Total Nitrogen (ซึ่งก็คือปริมาณ c-
source ในอีกนัยหนึ่ง) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื่อจะมีการเจริญเติบโตที่มากขึ้น โดยการเจริญ
เติบโตของเชื้อในกรณีที่ใช้เซลล์ตัวเหลืองที่ 10% จะเจริญดีกว่าที่ 5% ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเจริญ
เติบโตของเชื้อจะถูกจำกัดโดยปริมาณ c-source ที่ให้ไปกับเซลล์ตัวเหลือง

ทางด้านอิทธิพลของปริมาณเกลือต่อการเจริญเติบโตของเชื้อพบว่ากรณีที่ใช้เซลล์ตัว
เหลืองชนิดที่มีการแยกเกลือออกก่อนในระดับหนึ่งโดย Electrodialysis (ED-SS) การเจริญเติบโต
ของเชื้อจะดีกว่ากรณีที่ใช้เซลล์ตัวเหลืองชนิดไม่มีการแยกเกลือ (NED-SS) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงอิทธิ
พลของปริมาณเกลือต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต

ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับอิทธิพลของปริมาณเกลือต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ
โดยการทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน MRS ให้ปัจจัยที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน จากการ
ทดลอง พบว่าความเข้มข้นเกลือของเกลือที่มากขึ้นมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมากขึ้น
โดยเฉลี่ยที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2% เริ่มมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (รูปที่ 8) จากผลการ
ทดลองนี้ทำให้สามารถประมาณระดับความเข้มข้นเกลือที่เหมาะสมสำหรับสภาพแวดล้อมเชื้อในกรณี
ที่อาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีเกลือสะสมอยู่ซึ่งพบได้ในภาชนะแห้งโปรตีนที่ใช้มีการย่อยโดยกรดเกลือ

3.3.2) การปรับปรุงกระบวนการเตรียมเซลล์ตัวเหลืองสำหรับใช้ในแหล่ง c-source สำหรับ การเลี้ยงเชื้อ

จากทราบปริมาณเกลือที่ได้จากการสกัดจากตัวเหลืองมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ
จึงมีการศึกษาปรับปรุงกระบวนการเตรียมเซลล์ตัวเหลืองโดยใช้ความเข้มข้นของการเกลือที่น้อย
ลง (0.1% N HCl) ในการย่อยจากตัวเหลืองเพื่อจะได้ปริมาณเกลือที่น้อยลงหลังจากทำการ
Neutralize pH แล้วได้มีการกำหนดระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยที่ 3 ชม และ 8 ชม จากผลการเลี้ยง
เชื้อโดยใช้สารละลายจากตัวเหลืองย่อยที่ 3 และ 8 ชั่วโมง (SBH3, 8hr) เปรียบเทียบกับ YE
และเซลล์ตัวเหลือง (ที่ได้จากโรงงาน) ซึ่งในการทดลองนี้มีการปรับค่า Total Nitrogen ของแหล่ง
โปรตีนทั้งหมดให้เป็นปริมาณใกล้เคียงกัน (รูปที่ 9 a) จากผลการทดลอง (รูปที่ 9 b) แล้ว YE จะ
ยังเติบโตบนแหล่งโปรตีนที่ดีที่สุดในการเลี้ยงเชื้อ เชื้อสามารถเจริญในอาหารจากตัวเหลืองย่อยที่มี
ปริมาณเกลือต่ำ(0.4%)ได้ดีกว่าเซลล์ตัวเหลืองซึ่งมีปริมาณเกลือที่สูงกว่า(1.5%)และอาจมีสาร
ยับยั้ง นอกจากนั้นในการเปรียบเทียบระยะเวลาการสกัดจากตัวเหลืองที่ทำการย่อยที่ 3 ชม และ 8
ชม พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อในสารจากตัวเหลืองที่ทำการย่อยที่ 8 ชม จะดีกว่า 3 ชม (รูปที่ 9 a)
จากการวัดปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) พบว่าสารละลายที่ 8 ชั่วโมงมีอัตราส่วน
ของ free amino acid คือ Total Nitrogen (AN/TN) ที่มากกว่าสารละลายจากตัวเหลืองที่ 3 ชั่วโมงเล็กน้อย
ซึ่งอาจจะเป็นผลทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อดีขึ้นเนื่องจากใช้ free amino acid
และ peptide ที่สังเคราะห์ขึ้น

3.3.3) การศึกษาลักษณะโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่ง carbon แทนน้ำตาลในการเลี้ยงเชื้อ lactic acid bacteria.

จากผลการศึกษาในหัวข้อ 3.3.2 ที่ให้เห็นว่าปริมาณ free amino acid และความยาวของ peptide น่าจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* ที่ทำการศึกษานี้ จึงได้มีการทำการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมเพื่อค้นหาน้ำตาลชนิดอื่นที่แหล่ง c-source ที่เป็นแหล่งโปรตีนชนิดอื่นสามารถไปใช้ในการขยายพันธุ์โดยมีผลต่อการเพิ่มระดับ free amino acid ตลอดจนทำให้สาย peptide สั้นลง ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ yeast extract ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนแหล่งหนึ่งในสูตรอาหารของ MRS โดยปรารถนาให้เป็นแหล่ง c-source พลังงานและใช้ Kojic acid ซึ่งมีปฏิกิริยาไปรบกวน protease ในการย่อย yeast extract จากการปล่อย yeast extract ด้วยระยะเวลา 17 และ 35 ชั่วโมง และจากการนำ yeast extract ที่ถูกปล่อยไปใช้เป็นแหล่ง c-source หลักในการเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับ control ซึ่งใช้ yeast extract ซึ่งไม่ถูกปล่อย (โดยควบคุมปริมาณ Total nitrogen ให้เท่ากับ 3 กรัม, รูปที่ 10 b) พบว่ากรณีที่ใช้ yeast extract ซึ่งถูกปล่อยโดยระยะเวลา 17 ชั่วโมงเป็นแหล่ง c-source หลักเชื้อจะสามารถเจริญได้ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าสายเชื้ออื่น (รูปที่ 10 a) ผลการทดลองนี้ให้เห็นว่าเชื้อที่เลี้ยงจะสามารถใช้แหล่ง c-source ชนิดโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้น หรืออยู่ในลักษณะที่เป็น free amino acid ได้ดีกว่าในลักษณะโปรตีนสายยาว จากการวิเคราะห์มีระดับ free amino acid พบว่ามีปริมาณที่ค่อนข้างคงที่และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงหลังของการเจริญเติบโตซึ่งอาจจะเนื่องมาจากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนได้บางส่วนโดยเอนไซม์ ซึ่งเชื้ออาจมีคุณสมบัติตามการศึกษาของนักวิจัยกลุ่มอื่น (24) ต่างกับที่ศึกษาระดับของ free amino acid ไม่ให้ชัดเจนว่ามีเชื้อจะเจริญเติบโตได้ดีหรือไม่และไม่สามารถใช้แทนได้ ซึ่งให้เห็นว่าเชื้ออาจจะถูกจำกัดการเจริญเติบโตโดย amino acid บางชนิดซึ่งมีอยู่ในปริมาณที่จำกัด ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาในรายละเอียดสำหรับ amino acid ชนิดที่ถูกจำกัดในการใช้เพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการวิเคราะห์ปริมาณ amino acid ในแต่ละชนิดในการศึกษาต่อไป

3.3.4) การหาแหล่งโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการใช้เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ในกระบวนการผลิต

นอกจากการหาแหล่งโปรตีนที่ใช้ในการศึกษาถึงการใช้โปรตีนจากแหล่งน้ำดีจะเป็นแหล่งโปรตีนจากแหล่งที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* ที่ใช้ในการศึกษานี้แล้ว ยังพบว่าแหล่งโปรตีนประเภท fish soluble extract ซึ่งเป็น by-product ที่ได้จากอุตสาหกรรมปลากระป๋อง (โดยได้จากส่วนของเหลวที่เกิดขึ้นหลังจากการละลายปลาซึ่งจะนำไปทำให้งามขึ้น) เป็นแหล่งโปรตีนที่มีราคาถูกกว่าและน่าที่จะสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* ได้ เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง (80% w/w) และมีน้ำตาลสะสมในรูป Total sugar ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับกรดของกากตัวเหวี่ยง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของ fish soluble protein ชนิดนี้พบว่ามีอัตราส่วนของ free amino acid ต่อ Total Nitrogen ค่อนข้างต่ำซึ่งชี้ให้เห็นว่าแหล่งโปรตีนประเภทนี้เป็น

ประเภทที่มีสายยาวและอาจจะไม่เหมาะกับการนำไปใช้เลี้ยงเชื้อ *Lactic acid bacteria* ซึ่งต้องการใช้ free amino acids หรือสาร peptide ที่สั้นมากกว่า จึงได้มีการเตรียม fish soluble protein ที่มี free amino acid ที่มากขึ้นโดยใช้กระบวนการ acid hydrolysis ในการย่อย (จากการพิจารณาว่ากระบวนการย่อยโดยการใช้กรดน่าจะเหมาะสมมากกว่าการใช้เอนไซม์ เนื่องจากการย่อยโดยกรดจะได้โปรตีนที่มีความยาวต่ำกว่าการใช้เอนไซม์ ตลอดจนเป็นกระบวนการที่มีราคาถูกกว่า แม้ว่าจะอาจมีปริมาณกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น) ผลการศึกษาการย่อยพบว่าการใช้กรด HCl ที่ความเข้มข้น 2.5 N ในการย่อย fish soluble protein ที่อุณหภูมิ 100 °C สามารถเพิ่ม yield ของ free amino acid ได้ถึง 2.5 เท่า

จากผลการทดลอง (รูปที่ 11 a, b, c) การให้ fish soluble protein ชนิดที่ไม่ถูกย่อยและถูกย่อยที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่ง c-source หลักในการเลี้ยงเชื้อพบว่า fish soluble protein สามารถใช้เลี้ยงเชื้อได้เป็นอย่างดี แตกต่างไปจากการทดลองที่ให้เห็นว่าเชื้อสามารถใช้น้ำ fish soluble protein ที่ถูกย่อยได้ดีกว่า fish soluble protein ที่ไม่ถูกย่อยอย่างชัดเจนในการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของ fish soluble ที่ 2% และ 4% TN equivalent ของ YE แต่ในกรณีที่มีความเข้มข้น 8% TN equivalent ของ YE (รูปที่ 11 c) พบว่าการไม่มีการให้ fish soluble protein ที่ถูกย่อยแล้วเชื้อได้ช้ากว่าเนื่องจากความเข้มข้นของธาตุอาหารปริมาณสูง (4.65%) อาจมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *L. acidophilus* ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเราสามารถเพิ่มได้โดยการที่ละปริมาณ fish soluble protein ซึ่งเป็นผลที่สอดคล้องกับการศึกษาโดยการให้ yeast extract เป็นแหล่ง c-source จากการเปรียบเทียบ cell yield ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ให้ทำการศึกษามา ผลการเปรียบเทียบได้แสดงให้เห็นว่า TN เท่ากัน (จัดแสดงในตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่า fish soluble protein เป็นแหล่งโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมากที่สุด ซึ่งให้ค่าอัตราส่วนปริมาณ cell ต่อ Total Nitrogen (ปริมาณโปรตีน) สูงที่สุดถึง 11.72 แสดงดังตารางคือ yeast extract และกากยีสต์แห้งย่อยสามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าลักษณะของโปรตีนที่เป็นโปรตีนที่มี free amino acid มากกว่ามีสาย peptide ที่สั้น การใช้อัตราส่วน AN/TN อาจสามารถวัดแนวโน้มการเพิ่มของลักษณะของแหล่งโปรตีนที่เหมาะสมกับค่าเฉลี่ยที่ได้ในกรณีที่เป็นแหล่งโปรตีนชนิดเดียวกันแต่ในกรณีที่เป็นโปรตีนต่างชนิดกัน การใช้อัตราส่วน AN/TN อาจไม่เพียงพอในการบ่งชี้ เนื่องจากส่วนประกอบของ amino acid ที่เป็นส่วนประกอบหลักที่เชื้อจะนำไปใช้จะมีปริมาณที่แตกต่างกันในแหล่งโปรตีนต่างๆ ดังนั้นเราอาจสามารถวัดค่าอัตราส่วน AN/TN เป็นค่าเบื้องต้นในการกำหนดการเลือก แหล่งอาหารโปรตีนที่จะมีการศึกษาโดยการทดลองเลี้ยงเชื้อจริง หรือรวมทั้งก่อนการศึกษาถึงองค์ประกอบของ amino acid ที่อยู่ในโปรตีน เพื่อการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

3.3.5) การศึกษาคุณสมบัติและขนาดของสายเปปไทด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *L. acidophilus*

จากผลการทดลองที่แสดงว่า fish soluble protein ที่ถูกย่อยโดยการต้มแล้วสามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่ากรณีที่ไม่ต้มทำให้เห็นว่าอุณหภูมิของสายเปปไทด์ที่ต้มเหมาะสมสำหรับการใช้โดยจุลินทรีย์มากกว่าสายดิบ จากการศึกษาโดยการย่อย fish soluble protein เพื่อให้ได้ขนาดต่างๆ กัน (รูปที่ 12a) แล้วนำไปใช้เลี้ยง *L. acidophilus* โดยใช้ปริมาณ Total Nitrogen เท่ากันพบว่า fish soluble protein ที่ถูกย่อยโดยกรด SNHCl เป็นเวลา 30 นาที และมีค่า ANTN Ratio เท่ากับ 0.5 สามารถให้ค่า growth yield ที่มากที่สุด (รูปที่ 12b) ในขณะที่ fish soluble protein ที่ถูกย่อยนานเป็นวันจะให้ค่า growth yield ที่น้อยลง จากผลการทดลองนี้ทำให้เห็นว่าแหล่งอาหารโปรตีนที่เหมาะสมกับการเลี้ยง *L. acidophilus* ควรอยู่ในรูปเปปไทด์สายสั้นๆ แต่ไม่ควรอยู่ในรูป free amino acid จากค่า ANTN ratio ที่ 0.5 นอกเหนือจากสายเปปไทด์ที่มีอยู่เป็น ๕ หรือ ๗ peptide เป็นจำนวนมากกว่าการศึกษาที่แสดงก่อนหน้านี้ รายงานที่ว่าเชื้อส่วนใหญ่ในสกุล lactic acid bacteria มีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีนที่เกิดไม่สามารถย่อยเปปไทด์สายยาวได้และสามารถให้สายเปปไทด์ประมาณ ๕ หรือ ๗-peptide ให้มีประสิทธิภาพ (25-27) รวมถึงพืชประโยชน์ทางด้านการชะงักพัฒนาที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยง (28)

3.3.6) การศึกษาการใช้ fish soluble protein เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus*

ได้มีการนำ fish soluble protein ซึ่งได้จากการย่อยด้วยกรดแล้วได้ขนาดที่เหมาะสมมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนทั้งหมดในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* พบว่าการใช้แหล่งโปรตีนทั้งหมดจาก acid digested fish soluble protein เพียงแหล่งเดียวให้การเจริญเติบโตของ *L. acidophilus* เติบโตขึ้นอย่างมาก (รูปที่ 13) เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อโดยแหล่งโปรตีนประเภท yeast extract, meat extract และ tryptone ผสมอยู่ จากการศึกษานี้ทำให้มีผลสรุปได้ว่าในแหล่งโปรตีนชนิด fish soluble protein พลังงานจากสารอาหารที่จำเป็นต่อสภาพเจริญเติบโตของสารอาหารเหล่านี้มีอยู่ในแหล่งโปรตีนที่ได้จาก meat extract, tryptone และ yeast extract ซึ่งใช้เป็นอาหารเสริมควบคู่ในสูตรอาหารในการศึกษานี้ก่อนหน้านี้ได้มีการทดลองหาค่าสารอาหารที่ขาดใน acid digested fish soluble protein ซึ่งได้จากการต้มโปรตีนที่ได้จากแหล่ง casein, soy, วิตามินที่ 7 ชนิด ที่มีการงานว่ามีสารจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่ม lactic acid bacteria (29) ตลอดจน trace element อื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ strain โดยมีการเปรียบเทียบกับการเลี้ยงที่มีการเติมแหล่งอาหารโปรตีนเสริมจาก meat extract, tryptone และ yeast extract ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเติมกรดอะมิโนอิสระและวิตามินบี ๗ จะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* ให้มากขึ้นแต่เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแหล่งโปรตีนชนิดอื่นซึ่งใช้ meat extract, tryptone และ

yeast extract เติบโตแล้วยังมีการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่า meat (รูปที่ 13.14) โดยแหล่งโปรตีนเสริมที่สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของ *L. acidophilus* ความรู้ไปกับการเพิ่ม acid digested fish soluble protein อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดได้แก่ meat extract, tryptone และ yeast extract จากมากไปหาน้อยตามลำดับ (รูปที่ 13)

นอกจากนี้ยังได้มีการวิเคราะห์ปริมาณ amino acid ที่อยู่ในอาหารตลอดการเลี้ยงเชื้อ โดยเครื่องมือ amino acid analyzer (โดยความอนุเคราะห์ของ International Center for Biotechnology, Osaka University, Japan) เพื่อศึกษาและวิเคราะห์หาความเป็นไปได้ที่จะใช้อาหารจาก amino acid บางชนิดในระหว่างการเจริญเติบโต ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้ออาจมีการขาดแคลน amino acid ระหว่างการเจริญเติบโตประมาณ 3 ชนิด ในการเลี้ยงเชื้อมีการใช้ acid digested fish soluble protein และ/หรือ meat extract เป็นแหล่งโปรตีน โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 แหล่งจำนวน 1 ชนิด คือ tyrosine (รูปที่ 15) ซึ่ง amino acid ชนิดนี้อยู่ใน acid digested fish soluble protein ในปริมาณเล็กน้อยและมีปริมาณมากกว่าใน meat extract จึงได้มีการศึกษาเพิ่มเติม tyrosine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี acid digested fish soluble protein เพียงอย่างเดียว ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเมื่อขาด tyrosine จะช่วยให้เชื้อมีการเจริญเติบโตดีขึ้น แต่ก็ไม่เห็นแตกต่างกับกรณีที่มีการเติม meat extract เพิ่ม จากการการศึกษารหัสพันธุศาสตร์วิเคราะห์ได้พบว่ามีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* จำนวนมากกว่า 1 ชนิด ที่มีจำกัอยู่ใน acid digested fish soluble protein การวิเคราะห์ผลการศึกษารหัสพันธุศาสตร์ประกอบกับการศึกษารายงานเอกสารอ้างอิงจึงมีข้อสันนิษฐานที่ว่าสารอาหารที่มีอยู่ในแหล่งโปรตีนอื่นๆ ที่ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* น่าที่จะเป็นบีโอโพรตีนอื่นๆ ที่จำเพาะเจาะจง (30) ซึ่งการวิเคราะห์เปปไทด์ขนาดเล็กที่เหมาะสมจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคและเครื่องมือวิเคราะห์โปรตีนซึ่งมีแก่ HPLC และสายโปรตีนมาตรฐานต่างๆ จากการให้ข้อมูลที่มีอยู่ในการวิเคราะห์สายโปรตีนที่มีอยู่ในแหล่งอาหารโปรตีนจึงไม่สามารถได้ผลการวิเคราะห์ที่แน่นอนที่น่าพอใจได้ จึงมีความจำเป็นต้องปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์คัดกรองอุปกรณ์คือ HPLC Column ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์เปปไทด์สายสั้นๆ ต่อไป

3.3.7) การศึกษาหาแหล่งโปรตีนที่สามารถใช้ทดแทน meat extract, tryptone และ yeast extract สำหรับการสนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus*

จากการศึกษาเบื้องต้นนี้พบว่าการใช้แหล่งโปรตีนประเภท digested fish soluble เพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้สนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อได้และมีความจำเป็นที่จะต้องเติมแหล่งโปรตีนชนิดอื่นคือ meat extract หรือ tryptone หรือ yeast extract จึงจะสามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อได้โดยคาดว่าน่าจะมี growth factor สำหรับเชื้อประเภทสายโปรตีนขนาดเล็กอื่นๆ ที่สำคัญภายในแหล่งอาหารโปรตีนดังกล่าว อย่างไรก็ตามเพื่อประโยชน์ของการเลี้ยงเชื้อในระดับอุตสาหกรรมมีความจำเป็นที่จะต้องหาแหล่งโปรตีนราคาถูกมาทดแทน meat extract tryptone และ yeast extract ซึ่งมีราคาสูงและไม่เหมาะสมกับการใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรม จากการศึกษารวบรวมเกี่ยวกับการใช้แหล่งโปรตีนชนิดต่างๆ จากผลิตภัณฑ์นมที่

สามารถใช้ทดแทนเพื่อเป็นแหล่งอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าผลผลิตผลผลิตได้จากกระบวนการหมัก cheese คือ น้ำ Whey (จากโรงงานนมโครงการสวนจิตรลดา) นำมาใช้ทดแทนแหล่งโปรตีนราคาสูงใน MRS คือ meat extract, tryptone และ yeast extract ได้เป็นอย่างดีได้จากการทดลองการใช้ Whey แทนแหล่งโปรตีน meat extract tryptone และ yeast extract เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเทียบกับสภาพสูตร MRS ในการเลี้ยงเชื้อระดับ shake flask (โดยมีการเติม CaCO_3 เพื่อการ buffer ค่า pH และ medium ของอาหารเลี้ยง) พบว่าการใช้น้ำ Whey เพียงอย่างเดียวสามารถให้เชื้อได้ดี (4×10^8 cfu/ml) มากกว่ากรณีของ MRS (2×10^8 cfu/ml) (รูปที่ 17) และมากกว่ากรณีการใช้ skim milk เป็นแหล่งโปรตีนของเหลว การเติม digested Fish Soluble (DFS) เพิ่มเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Whey หรือ Skim milk พบว่าสามารถช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์เชื้อ viable cell ได้เป็นอย่างดีมาก โดยความเข้มข้นสูงสุดของเชื้อที่ได้โดยการใช้ DFS ร่วมกับน้ำ Whey มีความเข้มข้นถึง 1.0×10^{10} cfu/ml อย่างไรก็ดี ผลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่พบความแตกต่างในการเพิ่มจำนวนเชื้อ Whey เป็นแหล่งโปรตีนเชื้อมีการสักรวญ lactose ได้ความเข้มข้นที่สูง 20 g/l (รูปที่ 18) ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อสามารถใช้น้ำตาล lactose ที่มีอยู่มากใน whey สำหรับสักรวญ lactose ได้ การศึกษาเพิ่มเติมโดยการเติม DFS ที่ปริมาณต่างๆ ลงในน้ำ Whey พบว่า DFS ที่เพิ่มขึ้นสามารถเพิ่มค่าความเข้มข้นของ viable cell ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้เนื่องจากปริมาณ Total Nitrogen (T-N) ของน้ำ Whey มีค่อนข้างต่ำ (0.19% w/v) จึงได้ศึกษาทดลองใช้ Whey และน้ำเชื้อซึ่งมีปริมาณ T-N ที่สูงกว่า 1.41 % w/v)

ผลการนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสภาพแวดล้อมที่ได้อาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำ Whey และ Whey ที่มีปริมาณ T-N เท่ากันพบว่าน้ำ Whey สามารถให้ค่าความเข้มข้นเชื้อที่สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในกรณีที่ใช้ whey น้อย (รูปที่ 19) ทั้งนี้เนื่องจากพบว่าตัวคุณสมบัติของน้ำ whey น่าจะมีมากกว่าใน whey เติบโตผ่านกระบวนการ drying ยาวนานและสารอาหารที่มีประโยชน์บางชนิดอาจถูกทำลายไปในกระบวนการทำให้แห้ง ดังนั้นการใช้น้ำ whey สดจากโรงงานในการเลี้ยงเชื้อแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพที่ดีที่สุด อย่างไรก็ตามเนื่องจากปัญหามีปริมาณ TN ที่ค่อนข้างต่ำในน้ำ whey ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษากระบวนการทำความเข้าใจกับโปรตีนโดยสามารถใช้วิธีการ dialysis และวิธีการทำให้เข้มข้นโดยการระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ โดยปัจจัยที่สำคัญที่ควรต้องพิจารณาถึงกระบวนการวัดความเข้มข้นที่สูงที่มีผลต่อคุณภาพของสารอาหาร (ซึ่งควรค่าจะเป็นเป้าหมายที่จำเพาะบางชนิด) ที่มีอยู่ในน้ำ whey

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าน้ำ Whey สามารถนำมาใช้ทดแทนโปรตีนชนิด meat extract, tryptone และ yeast extract ได้อย่างสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพดีกว่าทั้งรากและผลใต้ (yeast) อย่างไรก็ตามเนื่องจากปัญหามีน้ำ whey มีลักษณะเป็นสารละลาย ดังนั้นการนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารในการเลี้ยงเชื้ออาหารที่กวนในระดับ fermenter จึงค่อนข้างจะมีปัญหาสำหรับการควบคุมการวัดค่าความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแบบ Optical Density ซึ่งอาจแก้ไขโดยการวัดปริมาณเชื้อที่เป็น (viable cell count) ซึ่งต้องใช้เวลานานและไม่สามารถนำมาใช้ติดตาม روندการเลี้ยงเชื้อได้รวดเร็ว นอกจากนี้ในน้ำ whey ก็มีส่วนของ

ส่วนใหญ่คือน้ำตาล Lactose ในสัดส่วน 70% ของ Total Solid ซึ่งอาจจะไม่สนับสนุนการควบคุม การสร้างกรด lactic ได้ ดังนั้นในขั้นตอนเลี้ยงด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีการตัดสินใจที่จะไม่มีการ ใช้น้ำ whey ในการทดลองในครั้งนี้ (fermentor และใช้โปรตีนจากแหล่ง meat extract, tryptone เพื่อความง่ายและสะดวกของการวัดความเข้มข้นเชื้อตลอดจนเพื่อให้มีประสิทธิภาพที่ดีในการ ควบคุมการสร้างกรด lactic

3.4. การศึกษาการเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะควบคุมในถังปฏิกรณ์และการประยุกต์ใช้ เทคนิก fed-batch เพื่อการเลี้ยงจุลินทรีย์ *L. acidophilus* ที่ความเข้มข้นสูง

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาในการใช้แหล่งโปรตีนเป็นแหล่ง complex carbon source ในการเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* พบว่าการใช้โพรทอนและประสิทธิภาพต่ำหรืออาจเป็นไปได้ในการเลี้ยง เชื้อที่มีการสร้างกรด Lactic น้อยและได้เชื้อที่มีความเข้มข้นสูงถึงประมาณ 1×10^{11} cfm/ml ใน การเลี้ยงโดยใช้ yeast extract 5% (มากกว่าความเข้มข้นโดยทฤษฎี MPR ประมาณ 10 เท่า) อย่างไรก็ตามพบว่าการปรับความโปรตีนที่ถูกใช้จริงจากปริมาณโปรตีนที่ให้ทั้งหมดคิดเป็นสัดส่วนที่ ต่ำกว่า 15% (รูปที่ 15) ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อในกลุ่ม Lactic acid bacteria ที่ความเข้มข้นสูงจึง ค่อนข้างจะเสี่ยงต่อปริมาณโปรตีนเป็นจำนวนมาก การใช้แหล่งโปรตีนให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น มีความจำเป็นต่อมีข้อมูลเกี่ยวกับสารเสริมการเจริญเติบโตซึ่งจากข้อมูลที่ไม่เพียงพอการศึกษาก่อน หน้าสารนั้นน่าจะเกิดเป็นภัยพิบัติหากครั้งใหญ่ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาในรายละเอียดใน อนาคตของสารเติมให้ที่ดีที่เหมาะสมต่อไปเพื่อจะสนับสนุนการใช้โปรตีนให้มีประสิทธิภาพขึ้น

ในอีกด้านหนึ่งการใช้แหล่ง carbon source ได้แบ่งไว้หลายประเภท glucose และ lactose แม้เชื้อจะมีประสิทธิภาพในการใช้สูง (หรือได้สมบูรณ์) ปัญหาการสร้าง lactic acid เป็นสิ่งที่ หลีกเลี่ยงไม่ได้ในกรณีที่มีการให้แหล่งน้ำตาลในปริมาณมากที่จะเกิดการสร้าง lactic acid คล่องตัวเร็วในปริมาณมากเช่นกัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ lactic acid โดย ทั่วๆ ไปพบว่ากระบวนการควบคุมการให้น้ำตาลโดยเทคนิคการเลี้ยงแบบ fed-batch เพื่อรักษาระดับ ความเข้มข้นของน้ำตาลในระดับในการเลี้ยงสามารถลดการสร้างกรดซึ่งได้แก่กรด acetic acid ได้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะประยุกต์ใช้เทคนิค fed-batch ในการควบคุมการไหลของน้ำตาลที่ เข้าสู่มหาหมักและ lactic acid bacteria โดยบังคับทิศทางของการไหลของน้ำตาลให้เป็นไป ในทิศทางที่ใช้ในการสร้าง cell ในขณะที่ไม่ให้เป็น lactic acid น้อยลงจึงได้มีการศึกษาถึงความ เป็นไปได้ที่จะประยุกต์ใช้เทคนิค fed-batch ในการเลี้ยงเชื้อ Lactic acid bacteria ที่ใช้ในการ ศึกษาได้แก่ *L. acidophilus* ที่ความเข้มข้นสูง โดยการศึกษาได้เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ (Fermentor) ที่มีการควบคุมสภาวะต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), อุณหภูมิ, การให้ ออกซิเจน, การหมุนและผสม ตลอดจนการให้อาหารโดยการ feed อย่างต่อเนื่องที่ระดับต่างๆ ซึ่ง ได้ทำการศึกษาลงต่อไปนี้

3.4.1) การศึกษาการเลี้ยงจุลินทรีย์ *L. acidophilus* ภายใต้สภาวะควบคุมในถังปฏิกรณ์ โดยการใช้แบบ batch

ในขั้นตอนแรกของการศึกษาได้ทำการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์โดยเทคนิค batch คือมีการให้อาหารเพียงครั้งเดียวในปริมาณมากตั้งแต่นั้นเพื่อการศึกษานี้การเลี้ยงโดยเทคนิค ๒๘-๒๘๘ ในการที่ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ที่มีการควบคุมสภาวะการเลี้ยงที่ต่ำกว่าการเลี้ยงในระดับ shake flask พบว่าการควบคุม pH ที่ระดับ ๕.๕ ลดการเน่าเสียมีส่วนช่วยในการเพิ่มการเจริญเติบโตเป็นอย่างดี (รูปที่ 20) แม้จะมีการสร้างกรด lactic นอกเหนือในระดับที่สูง (๗ g/L) มากกว่าการเลี้ยงในระดับ shake flask ทั้งนี้เนื่องมาจากการควบคุม pH ในระดับที่สูงกว่าค่า pKa ของกรด lactic มาก (pKa = 3.73) มีส่วนช่วยให้การแตกตัวของกรดและมีอิทธิพลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อย่างอ่อนแอ อย่างไรก็ตามการเลี้ยงจุลินทรีย์ในช่วงท้ายๆ ที่มีปริมาณกรดที่สูง พบว่าแม้จะมีการใช้เอนไซม์ไม่มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นจึงมีการตั้งสมมติฐานว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลสำหรับสร้างพลังงานในส่วน catabolic ในสภาวะที่มีการปล่อยกลูโคสออกสูง นอกจากนั้นในช่วงท้ายๆ ของการเลี้ยงที่เชื้อจะลดการเจริญเติบโตได้จนถึงที่มีความสอดคล้องกับในกรณีที่เกี่ยวข้องในระดับ shake flask คือกรด lactic ที่เริ่มสร้างในช่วงปลายของการเลี้ยงถูกนำกลับไปใช้และปริมาณที่ลดลง โดยช่วงเวลา lactate acid ถูกใช้จะเป็นช่วงเวลาสลายตัวกับที่น้ำตาลถูกใช้หมด อย่างไรก็ตามในช่วงนี้ไม่พบว่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น

3.4.2) การศึกษาการเลี้ยงจุลินทรีย์ *L. acidophilus* โดยเทคนิค fed-batch

ได้มีการทำการศึกษาการเลี้ยงจุลินทรีย์โดยเทคนิค fed-batch โดยในลำดับแรกได้ทำการเติมน้ำตาลด้วยอัตราคงที่ (ระหว่างชั่วโมงที่ 4-13) เพื่อการควบคุมระดับน้ำตาลให้ต่ำตลอดการเลี้ยงจากการเลี้ยงพบว่าเชื้อมีการเจริญโดยอัตราที่คงที่ตามอัตราการให้น้ำตาล (ชั่วโมงที่ 9-10) (รูปที่ 21) โดยลดการเติมน้ำตาลสามารถควบคุมระดับน้ำตาลที่ค่าความเข้มข้นใกล้เคียงได้ผลจนส่งผลถึงการจำกัด growth rate อย่างมีประสิทธิภาพ ในด้านการสร้าง lactate พบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 7 ปริมาณ lactate ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อจะมีการให้น้ำตาลลดลงอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 เป็นต้นไปแล้วจะมีการให้น้ำตาลอย่างคงที่โดยที่พบว่าเชื้อแทบไม่มีการเจริญเติบโต ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการให้แหล่งน้ำตาลเพียงอย่างเดียวไม่สามารถจะสนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์ได้ จึงได้มีการศึกษาการเติมน้ำตาลไปเรื่อยๆ กับการให้น้ำตาล ผลการเลี้ยงโดยมีการให้แหล่งน้ำตาลและโปรตีนควบคู่กันไปในการ feed อย่างต่อเนื่อง พบว่าสามารถยืดระยะเวลาการเจริญเติบโตออกไปจนกระทั่งสิ้นสุดการ feed ที่ชั่วโมงที่ 18 (มีการ feed อาหารในระหว่างชั่วโมงที่ 4-18) และเชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามอัตราการ feed แหล่งอาหาร (รูปที่ 22) ในการทดลองนี้พบว่า เชื้อมีการสร้างกรด lactic อย่างช้าๆ จนถึงชั่วโมงที่ 8 หลังจากนั้นความเข้มข้นกรด lactic ก็ลดลง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นกรด lactic ได้เพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 13 เมื่อมีการเพิ่มอัตราการ feed แหล่งอาหารลงในในการ

เลี้ยงบนสภาวะ ๒๐๐๐ อดลงอีกครั้งในชั่วโมงที่ 18 เมื่อหยุด feed อาหาร จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการควบคุมอัตราอาหาร feed อาหารที่เหมาะสมสามารถควบคุมอัตราเจริญเติบโต (๒๐๐๐ ได้ (ในระหว่างชั่วโมงที่ ๕-13) ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการยึดเชื้อที่ความเข้มข้นสูงไปพร้อมๆกับการควบคุมระดับความเข้มข้นของกรด lactic นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์จำนวน cell ที่มีชีวิต (viable cell count) พบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 มี viable cell count ที่สูงที่เมื่อวัดค่าความดัน (OD_{๖๐๐}) จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 19 (รูปที่ 22a) จึงสันนิษฐานได้ว่าเชื้อบางส่วนอาจมีการตายเนื่องจากการขาดสารอาหาร ดังนั้นการควบคุมอัตราอาหารให้อาหารจะครบที่จะกันเพื่อการควบคุมการสร้างกรด lactic จะช่วยกับช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตทาง viable count

เพื่อการวิเคราะห์การเพิ่มของ viable cell count ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลง feed แผลงโปรตีนจาก acid digested fish soluble (ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 3 เท่า) และ meat extract, tryptone เติบโตแยกต่างหาก (ระหว่างชั่วโมงที่ 7-12) จากภาพ feed น้ำตาลและโปรตีนในการทดลองก่อนหน้านี้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้น feed จนกระทั่งหยุดให้อาหาร โดยที่การหยุด feed อาหารที่ชั่วโมงที่ 16 (รูปที่ 23) และเมื่อมี viable count ที่สูงขึ้นมาถึงชั่วโมงที่ 12 (ในช่วงเวลาที่มีการ feed แผลงโปรตีนเสริม) จึงสรุปได้ว่าการ

การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อที่มีชีวิต (viable cell count) สามารถมีค่าไว้ได้โดยการ feed แผลงอาหารทั้งน้ำตาลและโปรตีน โดยที่พบว่าผลโปรตีนโปรตีนเสริมและการมีค่าสำคัญอย่างมากคือการเพิ่มของ viable count ผลการวิเคราะห์การสร้างกรดโดยเชื้อ *L. acidophilus* พบว่าการลด lactose ถูกสร้างในช่วงแรกของการเจริญเติบโตและลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 7 ในขณะที่ปริมาณกรด acetate ที่ถูกสร้างขึ้นไม่มีการลดลงอย่างใด และเป็นที่น่าสังเกตว่าการทดลองของกรด lactic มีความสัมพันธ์กับการ feed acid digested fish soluble protein ในระหว่างชั่วโมงที่ 7-12 (ภายหลังจากการหยุด feed เสริมของ acid fish soluble protein) จาการทดลอง ๒๐๐๐ ได้ถูกสร้างขึ้นอีกครั้ง ได้มีการทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเติบโตและผลของแผลงโปรตีนเสริมที่มีต่อการเพิ่มของ viable cell count และการลดลงของ lactose โดยการเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ ๒๐๐ เสริม (ในส่วน acid digested fish soluble protein ความเข้มข้น 10 เท่า) ของการทดลองในรูปที่ 22) ในช่วงชั่วโมงที่ 7-14 พบว่าเชื้อไม่ได้มีความเข้มข้นที่มากขึ้นกว่าเดิมและไม่มีการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาการเพิ่มของ viable cell count ได้จากการวิเคราะห์การทดลองวิธี ๒๐๐๐ digested fish soluble protein ความเข้มข้น 3 เท่า (รูปที่ 24) ซึ่งอาจสรุปได้ว่านอกจากการเพิ่มการ feed แผลงโปรตีนประเภท acid digested fish soluble protein แล้วจำเป็นต้องมีการใช้แหล่งโปรตีนประเภท meat extract, tryptone ซึ่งมี growth promoter อยู่ (จากผลการศึกษาก่อนหน้า) ซึ่งจะช่วยให้ yield ของ cell รวมถึงเพิ่มค่า viable cell count นอกจากนี้ทางด้านการสร้างกรด lactic พบว่าในการทดลองนี้เชื้อสร้างกรด lactic เติบโตอย่างชัดเจน (รูปที่ 24b) เมื่อเทียบกับการทดลองก่อนหน้านี้ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มสัดส่วนของ acid digested fish soluble protein ที่สูงขึ้น

เพื่อทราบปริมาณอาหารแห้งโปรตีนชนิดต่างๆ ในสัดส่วนที่เหมาะสมได้แก่การศึกษาสัดส่วนของแหล่งโปรตีนชนิด DFS กับ Meat extract และ Tryptone สำหรับ feed ที่ให้ประสิทธิภาพแก่ cell yield มากที่สุด (ค่าสัดส่วน cell ที่ได้ดีที่สุด DFS ที่ใช้สูงสุด) จากการทดลองการเลี้ยงในระดับ shake flask ทำให้สามารถได้สัดส่วนของ acid digested fish soluble protein (DFS) คือ meat extract และ tryptone ในสัดส่วน DFS : ME : TR เท่ากับ 1 : 1.4 : 1.5 (gTN) โดยมีผลอัตราส่วนของ ME : TR ไม่เท่ากับสูตรเดิมที่ใช้ในสูตรอาหารแบบ MRS (รูปที่ 25) อย่างไรก็ตามเนื่องจากใน DFS ที่ใช้อุณหภูมิปริมาณเกลือค่อนข้างสูง (ประมาณ 200 g/L ในกรณีของ DFS ที่ปล่อยด้วยกรด HCl 5 N) และจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเกลือเริ่มมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* ในระดับความเข้มข้นเกลือตั้งแต่ 10 g/L ซึ่งกรณีที่ใช้ DFS ที่ปล่อยด้วยกรด HCl 5 N จะมีเกลือที่ความเข้มข้นสูงที่สุดใน Broth หลังการ feed อาหาร อุณหภูมิประมาณ 50 g/L ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นสูง โดยที่ละมิกการ feed DFS ในปริมาณที่สูงจึงอาจพบมีอุปสรรคกันถึงการเจริญเติบโตโดยความเข้มข้นของเกลือที่สูงได้ จึงมีการศึกษาการปรับปริมาณกรดเกลือกับ fish soluble protein โดยใช้กรด HCl ที่ความเข้มข้น 2 N เพื่อที่จะลดความเข้มข้นเกลือสุดท้าย พบว่า DFS ที่ปล่อยด้วยกรด HCl 2 N ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง สามารถลดความเข้มข้นเกลือ (ความเข้มข้นเท่ากับ 110 g/L) ได้มีปริมาณเกลือที่น้อยกว่า DFS ที่ปล่อยด้วยกรด 5 N และมีค่า AN/TN เท่ากับ 0.29 (ต่ำกว่า DFS ที่ปล่อยด้วยกรด HCl 5 N ระยะเวลา 30 นาที ซึ่งมีค่า AN/TN เท่ากับ 0.44) แม้ว่าการทดลองโดยการเลี้ยงใน สบด จะพบว่าค่า cell yield ที่ได้จากการใช้ DFS ที่ปล่อยด้วยกรด HCl 2 N จะมีค่าต่ำกว่ากรณีของการใช้ DFS ที่ปล่อยด้วยกรด HCl 5 N ประมาณ 15 % เพิ่มไปจนกว่าที่ความเข้มข้นเชื้อที่สูงในช่วงแรกสุดท้ายของการเลี้ยง โดยการลดปริมาณเกลือโดยรวมเพื่อลดการยับยั้งจากเกลือจึงมีการนำ DFS ที่ปล่อยด้วยกรด 2 N มาใช้ในการทำ seed-batch เพิ่มเติมๆ ไปกับการใช้สัดส่วนของ DFS : ME : TR เท่ากับ 0.5:1.4:1.5 ซึ่ง ในกรณี Optimal Ratio จะใช้สัดส่วน DFS มากกว่าสัดส่วนนี้ 2 เท่า อย่างไรก็ตามจากการทดลอง Ratio อาหารนี้ยังให้ค่า cell yield ที่ไม่ต่ำจากการมี optimal ratio มากและเห็นว่าการลดปริมาณเกลือโดยรวมมากเกินไปจึงมีการทดลองใช้ค่า Ratio นี้ในการศึกษาต่อจากนี้

การมีอาหารใช้ DFS ที่ปล่อยด้วยกรด HCl 2 N ในการ feed ได้ทำการศึกษาใน feed อาหารที่มีอัตราต่างๆ เพื่อการศึกษาอิทธิพลของอัตราการใช้ feed อาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสร้างกรด lacto การศึกษาการเลี้ยงแบบการ feed อาหารที่ค่า $\mu = 0.4\text{-h}^{-1}$ พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง ให้ได้ความเข้มข้นเชื้อที่ OD_{600} เท่ากับ 31.8 ภายในเวลา 11 ชั่วโมง (รูปที่ 26) แสดงถึงความเข้มข้นเชื้อเป็น (viable count) ที่ค่อนข้างสูง (3.0×10^{11} cells/ml) ในเวลา 12 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของเชื้อได้หยุดลงอย่างรวดเร็วจนถึงต้นชั่วโมงที่ 12 แม้จะมีการ feed อาหารให้อย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 15 การวิเคราะห์ที่หาผลในถังหมักพบว่าสารที่เหลือนสะสมเพิ่มขึ้นถึงต้นชั่วโมงที่ 9 (รูปที่ 26b) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อน่าจะหยุดโตเนื่องจาก pH ของสื่อ ที่มีการสะสมในถังหมัก ผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณกรด lacto มีการ

ผลผลิตของเนื้อและขึ้นสูงจนถึงความเข้มข้นที่ 33 g/L (ที่ชั่วโมงที่ 8) จึงวิเคราะห์ว่าการ feed อาหารในอัตราที่เร็วเกินไปจะทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงเกินไปจนทำให้การควบคุมการ สร้างกรด lactic ทำได้ลำบากและมีการสร้างกรดที่สูงมากเกินไปและอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซึ่งจะลดความเข้มข้นหนึ่งของการตกตะกอน จากการรายงานการวิจัยนี้จะชี้ให้เห็นว่า กรด lactic ในสภาวะที่แตกต่างอยู่ในรูปไอออน (lactate) จะมีผลการยับยั้งที่น้อยกว่ากรดใน สภาวะที่ไม่แตกตัว (lactic acid) อย่างไรก็ดีตามระดับความเข้มข้นของ lactate 33 g/L อาจมีผล ยับยั้งการเจริญเติบโตได้เช่นกัน ผลการศึกษาอีกข้อหนึ่งของการยับยั้งการเจริญเติบโตของ lactate 33 ในการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อใน 500g ที่มีการเติม lactate 33 ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน ภาพเฟสของการเจริญเติบโตจนถึง log phase ยกเว้นความเข้มข้น lactate 33 ที่ความเข้มข้น 35 g/L มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* และมีแนวโน้มมากขึ้นที่ระดับความ เข้มข้น lactate 33 นวกร์นั้น ดังนั้นระดับความเข้มข้นของ lactate 33 ที่สูงถึง 35 g/L อาจเป็น สาเหตุของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ จึงมีการศึกษาการลดอัตราการใช้ feed อาหารให้ ชั่วคราวเพื่อชะลอการสร้างกรด lactate และกัควบคุมระยะเวลาการเจริญเติบโต ผลการทดลองจึงโดยการ feed อาหารที่ค่า μ ที่ต่ำลง ($\mu=0.5$) สามารถชะลอการสร้างกรด lactate ได้ อย่างไรก็ตามก็ไม่สามารถควบคุมการสร้างกรด lactate ได้สมบูรณ์โดยความเข้มข้นการขึ้นสูงสุดที่ 33 g/L ที่ 11 ชั่วโมง และเชื้อหยุดการเจริญเติบโตที่ 12 ชั่วโมงที่ค่าความเข้มข้น OD₆₀₀ เท่ากับ 35.7 (รูปที่ 27) การศึกษาการลดอัตราการใช้ feed อาหารมากยิ่งขึ้นในการทดลองของสัปดาห์นั้นสามารถควบคุมอัตรา การสร้างกรด lactate ได้ดีขึ้น (รูปที่ 28b) และเชื้อสามารถมีระยะเวลาการเจริญเติบโตได้นาน ขึ้น (รูปที่ 28a) อย่างไรก็ตามคาดว่าอัตราการเจริญเติบโตที่สูงสุดหรือที่เชื้อขึ้นจะมีค่าลดลงอย่างมากจากการ feed ที่ค่า μ ต่ำ นอกจากนั้นความเข้มข้นสูงสุดของเชื้อยังต่ำกว่าการฝึกการ feed ที่ μ สูง การที่ เชื้อหยุดการเจริญเติบโตในช่วงท้ายในการทดลองนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุการ feed อาหาร ตัวกักตุนที่ต่ำเกินไปในการที่มีช่วงกลางที่ชั่วโมงที่ 12 มีแนวโน้มต่อการเจริญเติบโต ซึ่งจำ เป็นที่ต้องแก้ไขโดยการฝึกการ feed อาหารมากขึ้นซึ่งก็จะต้องมีการระมัดระวังการเกิดปัญหา ของการสร้างกรดที่มากขึ้นตามมา อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ค่า μ_{max} ของการเติบโตของเชื้อ ความเข้มข้นเชื้อ (Y_{max}) ในการทดลองทั้งหมดก็ผ่านเกณฑ์ให้เห็นค่า Y_{max} ในช่วงแรกๆ ของการ เลี้ยงจะสูงที่สุดและลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลา (รูปที่ 29) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในช่วงกลางมีช่วง ท้ายของการเจริญเติบโตซึ่งมีการสร้างกรด lactate ที่ลดลงค่อนข้างมากเชื้อที่ได้มากขึ้น ซึ่งแ่ การวิเคราะห์นี้สัมพันธ์กับผลการทดลองก่อนหน้าและสอดคล้องกับรายงานการศึกษาโดยกลุ่ม วิจัยอื่นที่ในภาพเลี้ยงเชื้อสัปดาห์ที่ lactate acid สายพันธุ์ต่างๆโดยวิธี continuous culture พบว่า การควบคุม μ นั้นเชื้อก็ค่านี้นจะทำให้เชื้อสร้างกรด lactate ลดลง (31-33) จากผลการวิเคราะห์ อันนี้ทำให้สามารถพิจารณาได้ว่า การ feed อาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการลดการสร้างกรด lactate แต่ไม่ต่ำจนเกินไปจนมีผลการต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสามารถทำได้โดยมีแนวทางคือ ควรมีการใช้อัตราการใช้ feed ที่ค่อนข้างต่ำในช่วงแรกของการเลี้ยง (ชั่วโมงที่ 4 ถึง 9) ซึ่งเป็นช่วง ที่เชื้อมีกิจกรรมที่สูงในการสร้างกรด lactate และสามารถเพิ่มอัตราการใช้อาหารในช่วงกลางถึง

พืชของถั่วเขียวซึ่งจะมีการสร้างกรดไขมันโดยผลจากการทดสอบการใช้น้ำมันใหม่ในการให้
 อาหารโดยควบคุมอัตราการให้อาหารในช่วงต้น (ที่ค่า μ ของการ feed เท่ากับ 0.3 h^{-1}) และ
 มากขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ค่า μ ของการ feed เพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.3 h^{-1} ที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งให้เห็นว่า
 สามารถควบคุมการเสริมกรดไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ (โดยความเข้มข้นกรดไขมันลดลง
 อย่างมากจนถึงความเข้มข้น 8 g/L) อย่างไรก็ตามในช่วงท้ายของการเลี้ยงการเจริญเติบโตของ
 เชื้อไม่สามารถจะมีต่อไปได้เนื่องจากมีการให้อาหารในอัตราที่ค่อนข้างสูงอย่างค่อนเคือง (รูปที่ 30)
 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการลดการเจริญเติบโตของเชื้อในช่วงท้ายของการเลี้ยงน่าจะไม่ได้
 มาจากสาเหตุการขาดอาหาร (ผลของเอนไซม์ที่ผลิตมากขึ้นในช่วงท้ายชี้ให้เห็นถึงการให้
 อาหารที่เกินพอ) ดังนั้นสาเหตุสำคัญของการชะลอการเจริญเติบโตน่าจะมาจากสาเหตุ
 ชนิดอื่นซึ่งไม่ใช่กรดไขมัน ซึ่งในการทดลองสามารถควบคุมปริมาณได้ในระดับค่า 8 g/L หรือ
 ปริมาณน้อยกว่าช่วงท้ายของการเลี้ยงจากการคำนวณการสะสมจะมีผลในระดับความเข้มข้น 14
 g/L (ซึ่งระดับความเข้มข้นกรดไขมันนี้ต่ำกว่าช่วงการทดลองก่อนหน้านี้ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้
 ถึงระดับความเข้มข้นกรดไขมันที่ 30 g/L) และเมื่อพิจารณาถึงแหล่งสาร inhibitor จากอาหารที่
 feed เข้าไปและไม่ได้เกิดในระหว่างการเลี้ยงเชื้อเนื่องจากผลการวิเคราะห์กรด
 ชนิดต่างๆ โดย Gas Chromatography ไม่ได้ชี้ให้เห็นถึงผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่อาจมีผลต่อการ
 กับยั้งการเจริญเติบโต จากการวิเคราะห์ค่า growth yield ($Y_{X/TN}$ mg) ที่ใช้ในการทดลอง
 ช่วงหนึ่งที่ใช้ DFS ที่ปล่อยโดยกรด HCl 2 N พบว่าค่า yield มีค่าที่ต่ำกว่าผลการทดลองในการนี้
 ที่ใช้ DFS ที่ปล่อยโดยกรด HCl 5 N โดยเฉพาะกรณี X/TN ratio ซึ่งมีค่าลดลงน้อยกว่าครึ่งหนึ่ง
 จึงมีความเป็นไปได้ที่การเจริญเติบโตที่ช้าลงอาจจะเนื่องมาจากสาร inhibitor ที่มาจาก DFS
 กรณีที่ปล่อยโดยกรด 2 N ซึ่งอาจเกิดขึ้นระหว่างการกระบวนการย่อยที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการ
 การทดสอบการใช้ DFS 2 N และ DFS 5 N ในการเลี้ยงระดับ flask ไม่ได้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจน
 ว่า DFS 2 N จะมีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมากกว่า DFS 5 N และนอกจากนี้การ
 ทดสอบการใช้ DFS ที่ปล่อยโดยกรด HCl 5 N มาใช้แทน DFS ที่ปล่อยโดยกรด 2 N ในการ feed
 เลี้ยงเชื้อโดยทำการเตรียม DFS และ ME กับ TR ในสัดส่วนที่เท่ากันในการทดลองก่อนหน้านี้
 และใช้อัตราการ feed เท่ากัน ผลการทดลองชี้ให้เห็นมีสารยับยั้งอย่างชัดเจนซึ่งอาจจะ
 หยุดโตในระยะเวลาค่อนข้างรวดเร็วที่ชั่วโมงที่ 13 ที่ความเข้มข้นเชื้อในเบดที่ค่อนข้างต่ำ
 (OD เท่ากับ 25.8) (รูปที่ 31) จากการทดลองที่ได้จึงมีข้อสันนิษฐานว่า inhibitor ที่ยับยั้ง
 การเจริญเติบโตควรจะมีความเข้มข้นในแหล่งอาหารไม่พื้นที่ใช้ feed ที่มาจาก DFS ที่ปล่อย
 โดยกรด 2 N และ 5 N และวิเคราะห์เพิ่มเติมได้ว่า DFS ที่ปล่อยด้วยกรดอาจมีการทำปฏิกิริยา
 กับแหล่งอาหารตัวอื่นได้แก่ tryptone และ Meat extract ระหว่างการเตรียมอาหารทำให้เกิด
 inhibitor บางชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตสูง จากการดำเนินการศึกษามีความเป็นไปได้
 มากที่สุดที่สาร inhibitor น่าจะมาจากปฏิกิริยา Maillard ที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนและน้ำตาลที่
 อุณหภูมิสูงซึ่งปัจจัยที่เร่งปฏิกิริยาคือความเข้มข้นของโปรตีน ชนิดของโปรตีนก็เป็นการละเอียใน
 ลักษณะความเข้มข้นน้ำตาล pH อุณหภูมิ ตลอดจนระยะเวลาที่เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง การ

ศึกษาการใช้ปริมาณ DFS ที่น้อยลงผสมกับแหล่งโปรตีนชนิดอื่น (tryptone และ meat extract) ในสัดส่วนที่น้อยลงในการ feed พบว่าข้อดีสามารถที่จะประมวลผลการเจริญเติบโตได้มากขึ้นและได้ความหนาแน่นเชื้อที่สูงขึ้น (รูปที่ 32)

นอกจากนี้การศึกษาการใช้ปริมาณ meat extract และ tryptone ลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของปริมาณที่ใช้ค้นพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้มากขึ้นและได้ความหนาแน่นเชื้อตลอดจนการมีชีวิตรอด (viable cell count) ที่สูงขึ้น (รูปที่ 33) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า growth medium ที่พบในการเลี้ยงในระหว่างการทดลองช่วงทดลองที่จะมาจากปฏิกิริยา Maillard reaction ที่เกิดขึ้นระหว่างน้ำตาลและโปรตีนภายใน meat extract และ tryptone ในขณะที่ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิสูง

จากการทดลองที่กล่าวมาแล้วข้างสรุปได้ว่าในการเลี้ยงเชื้อ lactic acid bacteria ที่สามารถเติบโตสูงนั้นจะมีความจำเป็นที่จะต้องมีการให้แหล่งอาหารโปรตีนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ อย่างไรก็ตามการหาค่าที่เหมาะสมโดยการฆ่าเชื้อแหล่งโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูง และหาเชื้อ ที่มีความเหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ lactic acid bacteria ได้ โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวน่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา Maillard reaction ซึ่งมีมากมายอุณหภูมิที่สูงขึ้นและปริมาณน้ำตาลและโปรตีนที่สูงในปฏิกิริยา

จากการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยา Maillard (34) พบว่า ปฏิกิริยา Maillard ไม่ใช่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในขั้นตอนเดียวแต่ประกอบด้วยปฏิกิริยาหลายขั้นตอน เริ่มจากขั้นตอน Condensation ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่าง amino group กับ reducing sugar หลังจากขั้นตอนนี้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีการแตกตัวและจัดเรียงตัวในรูปแบบต่างๆ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ amadori , heyns compounds , pyrroles , oxazolinones , และสารกลุ่ม melanoidins เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดสีน้ำตาลเข้มขึ้น และยังมีรายงานถึงอิทธิพลของ Maillard ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (35-37) ส่วนในปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา Maillard ได้แก่

- ปริมาณของ carbonyl และ amino groups ที่มีในสารละลาย
- ค่า pH ในช่วงที่สูง
- อุณหภูมิที่สูง (จะเกิดมากในช่วง 100 - 140 °C)
- ค่า water activity
- เวลาที่เกิด ปฏิกิริยา
- อัตราของการให้ความร้อน
- ปริมาณ dicarbonyl และ browning intermediate ที่มีอยู่ในสารละลาย
- ปริมาณสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสารละลาย
- ปริมาณ phosphate ที่มีอยู่ในสารละลาย

เพื่อการแก้ไขปัญหาคำยั้งการเจริญเติบโตโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา Maillard จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปถึงการปรับปรุงกระบวนการที่สามารถผลิต

เกิดขึ้นจาก ปฏิกริยา Maillard ได้ ใต้แก่การใช้แหล่งโปรตีนที่มีน้ำตาล reducing ต่ำ, การลด
อุณหภูมิและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ (โดยไม่มีผลต่อความเสถียรของการเกิดCoagulation) , การ
แยกการฆ่าเชื้อแหล่งโปรตีนออกจาก species ชนิดต่าง ๆ (เช่น การลด cytosine, phosphate,
amino acid) ซึ่งจะมีผลต่อปฏิกริยาการเกิดปฏิกริยา Maillard ได้ (ซึ่งในการทดลอง wet-batch
ช่วงหลังมีการ sterile การ cytosine และ phosphate buffer พร้อมกับ meat extract และ
tryptone ที่ความเข้มข้นสูงกว่าการทดลองช่วงต้นๆมาขึ้นซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิด
การจับตัวและการเจริญเติบโตของเชื้อ) ความอหิวาต์ในการลดการเกิดปฏิกริยา Maillard อาจจะ
เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างมากต่อการลดเชื้อจุลินทรีย์ *L. acidophilus* ซึ่งรวมถึง ๒๐๐๐ cfu/
ตัวอย่าง จดบันทึกที่ความเข้มข้นเชื้อที่สูง ซึ่งมีความลดลงของความเข้มข้นโปรตีนที่สูงมาก และ
การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ เพื่อลดการเกิดปฏิกริยา Maillard จำเป็นต้องมีการดำเนินการต่อ เพื่อ
การขยายประสิทธิภาพของกระบวนการเลี้ยงเชื้อ lacto acid bacteria ต่อไป (ซึ่งผลการศึกษานี้
จะมีการทำรายงานและนำเสนอต่อ สภาฯ เพิ่มเติมในโอกาสต่อไป)

4. บทสรุปและวิจารณ์ผลการศึกษาของโครงการโดยรวม

จากผลการศึกษาทั้งหมดยังคงยืนยันว่าโครงการสามารถสรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ได้ดังต่อไปนี้

4.1. การศึกษาอิทธิพลของการให้อาหารต่อการเจริญเติบโตและการสร้างกรด lactic ของเชื้อ *L. acidophilus*

จากการศึกษาคูณลักษณะทางเชื้อพบว่า เชื้อที่ใช้ในการศึกษาคูณครั้งนี้ คือ *L. acidophilus* สามารถใช้ออกซิเจนได้ในระดับปริมาณที่ค่อนข้างสูง และในการศึกษาอิทธิพลของการให้อาหารภาค ในการเลี้ยงเชื้อพบว่า การให้อาหารภาคมีผลช่วยให้เชื้อมีการใช้กรด lactic ในช่วงหลัง (ในกรณีที่มีการจำกัดการให้น้ำตาล หรือ การใช้แหล่งโปรตีนเป็นแหล่ง complex medium source) แต่ในกรณีที่ปริมาณการให้น้ำตาลมาก การให้อาหารภาคไม่มีผลในการช่วยลดกรด lactic อย่างใด จากผลดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่า การใช้เทคนิคการเติมอาหารควบคู่ไปกับการจำกัดแหล่ง น้ำตาลสามารถลดการสร้างกรด lactic ได้ ในการศึกษานานหลังทั้งหมด จึงมีการเติมอากาศได้ เพื่อในการทดลอง

4.2. การศึกษาการใช้แหล่งอาหารคาร์บอนอื่น ๆ เพื่อทดแทนการใช้น้ำตาลในการเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาการใช้แหล่งอาหารคาร์บอนอื่น ๆ (ซึ่งได้แก่ glycerol, glycerol และ โปรตีนจาก yeast extract ในรูปแบบของ complex medium) พบว่าการใช้แหล่งอาหารโปรตีนเพื่อทดแทนน้ำตาลสามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของ *L. acidophilus* ได้ที่ความเข้มข้นสูงปานกลาง (2×10^8 cells/ml) ในกรณีที่ใช้ yeast extract ความเข้มข้น 2% (w/v) ในช่วงที่สามารถลดการสร้างกรด lactic acid ได้ดีกว่ามีประสิทธิภาพ (ผลจากการเปรียบเทียบที่ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งอาหารและการสร้างกรด lactic 8 g/l เปรียบเทียบกับ 0.5 g/l ในกรณีที่ใช้ yeast เป็นแหล่งอาหารทดแทน) การเพิ่มปริมาณแหล่งโปรตีนคือ yeast extract ช่วยทำให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อมากขึ้นถึงครึ่งส่วน อย่างไรก็ตามพบว่า yeast extract จะช่วยสนับสนุนการเจริญของเชื้อได้ดี แต่เนื่องจากการสกัดของ yeast extract จึงไม่เหมาะที่จะใช้ผลิตเชื้อในระดับอุตสาหกรรมจึงได้ใช้การศึกษาแหล่งโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่ราคาถูกและสามารถใช้ทดแทนแหล่งโปรตีนจาก yeast extract ได้ จากการศึกษาล้างโปรตีนสองชนิดจากถั่วเหลือง และ fish soluble protein พบว่า fish soluble มีคุณสมบัติที่สามารถให้ทดแทนการเติม yeast extract ได้ ในปริมาณ total nitrogen ที่เท่ากัน โดยการใช้ fish soluble มีข้อดีคือ มีส่วนผสมของน้ำตาล (total sugar) ที่น้อย เมื่อเทียบกับแหล่งโปรตีนจากถั่วเหลืองหรือจาก yeast extract ซึ่งการมีน้ำตาลน้อยเป็นผลต่อการสร้างกรด lactic ที่น้อยลง นอกจากนั้นการศึกษายังชี้ให้เห็นว่า โปรตีนที่ถูกย่อยให้มีขนาดเล็กที่เหมาะสม (มีขนาดในช่วง di-, tri-peptide) สามารถนำไปใช้โดยเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย fish soluble ที่ถูกย่อยโดยกรด HCl ที่ความเข้มข้น 5 N ที่อุณหภูมิสูงจนได้ digested fish soluble ที่มีสาย peptide ขนาดสั้นและอะมิโนอิสระเป็นส่วนใหญ่ สามารถนำไปใช้โดยเชื้อและสนับสนุนการเจริญของเชื้อและยังได้ค่า yield ที่ดีกว่าการใช้แหล่งโปรตีนจาก yeast extract ที่ปริมาณ total nitrogen ที่เท่ากันอีกด้วย อย่างไรก็ตาม การบวนการย่อย fish

soluble ด้วยกรด HCl จะทำให้ได้ by-product ตามมาคือ เกลือ NaCl ตามหลังการ Neutralization ซึ่งผลิตภัณฑ์ความเข้มข้นมากกว่า 2% (W/V) จะเริ่มมีผลยับยั้งการเจริญของ เชื้อ L. acidophilus ได้ สิ่งซึ่งมีการระมัดระวังในเรื่องความเข้มข้นกรดในการใช้ การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการปรับปรุงเทคนิคการย่อย fish soluble ด้วยกรด พบว่าสามารถใช้ digested fish solubles (DFS) ที่มีกรดที่ความเข้มข้นน้อยได้ โดยการให้กรดที่ความเข้มข้นน้อยลง (2 N HCl) ในการย่อยที่เวลาเพิ่มขึ้นแม้ว่าจะให้ค่า yield ที่ต่ำกว่าการให้กรดการใช้ 5 N HCl digested fish solubles ประมาณ 10% แต่สามารถออกผลได้ถึงครึ่งหนึ่ง การศึกษาการใช้ แบคทีเรีย ชนิด Kojibacterium ซึ่งเป็น species และ decomposers ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการย่อย fish soluble พบว่าต้อง ใช้เวลาในการย่อยที่นาน (มากกว่า 5 ชั่วโมง) และใช้ให้กับโปรตีนที่มีความเข้มข้นที่ไม่สูงจนเกินไป ดังนั้นในอนาคตอาจมีการศึกษาการใช้เทคนิคการผสมผสานการย่อยโดยการผสม เอนไซม์ซึ่งสามารถใช้ในการย่อยโปรตีนได้ค่อนข้างมีประสิทธิภาพ ในขณะก็ได้ by-product ที่มี ปริมาณกรดต่ำได้

แม้ว่า acid digested fish soluble จะชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้แทน yeast extract ใน สูตรอาหารได้ อย่างไรก็ดี DFS เติมกรดเพียงอย่างเดียวไม่สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้ จำเป็นต้องมีการเติมแหล่งโปรตีนเสริม เช่น tryptone, meat extract หรือ yeast extract ซึ่ง คาดว่าน่าจะมีสารสนับสนุนการเจริญเติบโต (growth promoting compound) อยู่ในกลุ่มแหล่ง โปรตีนดังกล่าว การวิเคราะห์ชนิดของสารสนับสนุนการเจริญเติบโตได้ดังสรุปว่า สารดังกล่าว อาจจะไม่ใช้สารในกลุ่ม vitamin, trace element หรือการละมีโนอีลประเภทตัว แต่จะอยู่ใน กลุ่มของ peptide ที่เฉพาะเจาะจงที่มีอิทธิพลในการสนับสนุนการเจริญของเชื้อได้ อย่างไรก็ดี ตามการพิจารณาเพียงชนิดและลักษณะของสาร (peptide ดังกล่าว ควรจะมีการดำเนินการย่อย ไปเพื่อยืนยันผลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาโปรตีนจากแหล่งอื่นที่สามารถใช้เสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้เช่นเดียวกับ meat extract หรือ tryptone หรือ yeast extract พบว่าน้ำ Whey จากโรงงาน ผลิตภัณฑ์สามารถให้สนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อ L. acidophilus ได้เป็นอย่างดี และสามารถให้แทนแหล่งโปรตีนจาก meat extract หรือ tryptone ได้อย่างสมบูรณ์ และการใช้แหล่ง อาหารจากน้ำ Whey ร่วมกับแหล่งโปรตีนของ DFS สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้ดีขึ้น เมื่อเทียบกับแหล่งโปรตีนจากของน้ำ whey เพียงอย่างเดียว การใช้ น้ำ Whey ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนแหล่งโปรตีนราคาถูกประเภท meat extract and tryptone ได้เป็นอย่างดี

การใช้แหล่งโปรตีนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แม้ว่าจะสามารถควบคุมการบูดเน่าของเชื้อ ได้ และสนับสนุนการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ดีทางผลการศึกษาพบว่าปริมาณโปรตีน ใน รูป total nitrogen) ที่ถูกใช้ในการเจริญเติบโตมีปริมาณน้อย (10% ในกรณีใช้ yeast extract เป็นแหล่งโปรตีน) ซึ่งคาดว่าน่าจะมีสาเหตุมาจากข้อจำกัดทางด้านขนาดโปรตีนที่เหมาะสม รวมทั้ง growth promoting compound บางชนิด ทำให้โปรตีนในปริมาณที่เหลือไม่สามารถถูกนำไป ใช้ได้เป็นปริมาณมาก การจะใช้โปรตีนเป็นแหล่ง complex carbon source เพียงอย่างเดียว จึง

ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ แนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการให้ยีสต์นั้นโปรตีนสามารถทำได้ โดย การกลั่นน้ำสาหร่ายทะเล carbon source สำหรับการผลิตเชื้อ แต่การกลั่นน้ำสาหร่ายทำได้โดยความระมัดระวังไม่ให้เกิดการสิ้นน้ำค่าค่าทำให้เกิดการสร้างกรดในปริมาณที่สูง และน้ำที่กลั่นสามารถกระทำได้โดยการใส่เทคนิค fed-batch ในการเติมอาหารเข้าถังปฏิกรณ์ที่มีการควบคุมสภาวะที่เหมาะสม

4.3. การศึกษาการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์และ การประยุกต์ใช้เทคนิค fed-batch เพื่อการเลี้ยงจุลินทรีย์ *L. acidophilus* ที่ความเข้มข้นสูง

การศึกษากการเลี้ยงจุลินทรีย์ *L. acidophilus* ภายใต้สภาวะควบคุม (ได้น้ำ อุณหภูมิ, pH, การกวน, การให้อากาศ) พบว่า การควบคุมค่า pH ของ broth ในถังปฏิกรณ์ที่ค่า pH 6.5 สามารถเพิ่มการผลิตของเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยในระดับ 6.0-6.5 เนื่องจากที่ค่า pH 6.5 กรด lactic มีการแตกตัวสมบูรณ์และมีอิทธิพลต่อการยับยั้งการผลิตของเชื้อได้น้อยลง ดังนั้นการศึกษานี้จึงให้เน้นการควบคุมค่า pH ที่สูงมีความสำคัญในการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นสูง ในการนี้มีการสร้างกรด lactic โดยเชื้อจุลินทรีย์

ในการศึกษาการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นสูง ได้มีการศึกษาผลของการเติมอาหารทั้งชนิดแห้งโปรตีน และน้ำตาล ตลอดจนวิธีการเติมอาหาร พบว่าการเติมอาหารในแบบ step-feed (หลังจากเชื้อมีการเจริญเติบโตจนถึงช่วงกลางและช่วงปลายของอาหารที่ให้อาหารต้นเริ่มหมดก็จะมีการเติมอาหารเพิ่มเติมน้ำ เจริญ) จะสามารถเพิ่มผลผลิตความเข้มข้นของเชื้อได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ผลการควบคุมการสร้างกรด lactic กระทำได้ไม่สมบูรณ์เนื่องจากระดับน้ำตาลไม่สามารถควบคุมได้อย่างต่อเนื่องและค่าของการเลี้ยง การศึกษาการเติมอาหารอย่างต่อเนื่องโดยเทคนิค fed-batch โดยเริ่มจากการศึกษาการเติมแหล่งน้ำตาลเพียงอย่างเดียวอย่างต่อเนื่องให้กับจุลินทรีย์หลังจากเชื้อจุลินทรีย์เจริญจนเข้าสู่ช่วงกลาง พบว่าการเติมน้ำตาลเพียงอย่างเดียวอย่างต่อเนื่องสามารถช่วยเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อได้โดยประมาณ 2-3 เท่า ดังที่ตามการ 6.0-6.5 น้ำตาลอย่างสมบูรณ์ของเชื้อแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ควบคุมการสร้างกรด lactic ได้ การศึกษาการให้อาหารจาก 2 แหล่ง ทั้งจากแหล่งน้ำตาลและโปรตีน 6.0-6.5 ให้กับเชื้ออย่างต่อเนื่อง พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยได้ความเข้มข้นเชื้อจากการเลี้ยงโดยเทคนิค batch กว่า 2 เท่า ในขณะที่น้ำตาลสามารถควบคุมได้ดีในระดับค่า การเพิ่มปริมาณโปรตีนในการ 6.0-6.5 เพิ่มเพิ่ม พบว่าสามารถสนับสนุนการผลิตของเชื้อได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ดีสามารถสังเกตได้ว่า feed โดยอัตราที่คงที่ (constant feed rate) พบว่าในช่วงหลังของการเจริญเติบโต และพบว่า ไม่สามารถเลี้ยงเชื้อได้ (จากการวัด) สูงขึ้น แต่ความเข้มข้นของเชื้อเป็น (viable cell count) ไม่ได้เพิ่มขึ้นตามความสูง ซึ่งคาดว่าเชื้อบางส่วนอาจมีการตายในช่วงหลังของการเลี้ยง เนื่องจากการขาดสารอาหารโดยองค์ประกอบโปรตีนจึงได้มีการศึกษาการเพิ่มสัดส่วนของแหล่งโปรตีน ชนิด whey extract, tryptone และของแห้งโปรตีนจาก digested fish soluble (DFS) ที่มีองค์ประกอบเป็นกรดอะมิโนอิสระเป็นส่วนใหญ่ พบว่าการเพิ่มปริมาณโปรตีนชนิด whey extract และ

tryptone สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อเป็นได้ ขณะที่การเพิ่มปริมาณโปรตีนจาก DFS ไม่สามารถช่วยเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อเป็นได้อย่างมีนัยสำคัญได้ อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มสัดส่วนของโปรตีนจาก DFS (ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือกรดอะมิโนอิสระ) ในอาหารที่ใช้ feed พบว่ามีอิทธิพลต่ออัตราการเติบโตโดยมีผลทำให้เชื้อมีการสร้างกรดแลกติก น้อยลงเป็นอย่างมาก ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการสร้างกรดแลกติกได้

เพื่อการปรับปรุงลักษณะของการเลี้ยงให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ (โดยนับจากเชื้อที่เป็น viable cell count) ให้สูงขึ้น ได้มีการศึกษาการใช้เทคนิคการ feed อาหารแบบ exponential feeding โดยอาหารที่ใช้ feed ประกอบไปด้วยแหล่งน้ำพาสเจอร์และแหล่งโปรตีน (ซึ่งใช้สกัดส่วนของ meat extract + tryptone + DFS ที่มีประสิทธิภาพที่สุดจากการเจริญเติบโตของเชื้อ) ในการเลี้ยง และมีการปรับปรุงเทคนิคการย่อย fish oil เพื่อให้มีความเข้มข้นโดยดล (2N HCl) เพื่อลดปัญหาแก๊สที่จะสะสมในระบบ การศึกษาการใช้เทคนิคการ feed อาหารแบบ exponential ที่มีอัตราการเพิ่มการให้อาหารที่ระดับต่างๆ (โดยการตั้งค่า μ , specific growth rate ที่ค่าต่างๆ พบว่าค่าที่ใช้ต่ำกว่า 0.04 ที่สูงมากเกินไป แม้จะสามารถเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อได้บ้าง ทั้งความเข้มข้นเชื้อ (ทั้งค่าความขุ่นและเชื้อที่เป็น) ตลอดจนการควบคุมระดับน้ำพาสได้ แต่มีอัตราการสร้างกรดแลกติก ไม่สามารถควบคุมได้ และมีความเข้มข้นกรดที่สูงเกินจนอาจมีผลไปถึงการเจริญเติบโตของเชื้อได้ การ feed อาหารในอัตราที่ต่ำเกินไป แม้จะสามารถควบคุมการสร้างกรดแลกติก ได้เป็นอย่างดี แต่มีผลอย่างมากต่อความเข้มข้นของเชื้อที่เป็น (viable cell count) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการให้อาหารในอัตราที่เหมาะสม จากการวิเคราะห์ผลการทดลองในการเลี้ยงเชื้อโดยเทคนิค feed-on-starch พบว่าจุลินทรีย์มีลักษณะภาพในการสร้างกรดแลกติก ที่สูงมากในช่วงแรกของกระบวนการเลี้ยง (ในขณะที่ยังมีผล specific growth rate μ ที่สูง) และมีผลยาวนานไป เมื่อ specific growth rate ของเชื้อลดลง เชื้อจะมีลักษณะภาพในการสร้างกรดแลกติก ลดลงอย่างมาก (ค่า Yield ของการสร้างกรดแลกติกลดลง) จากผลดังกล่าวจึงได้แนวทางในการ feed อาหารที่เหมาะสมคือ ในช่วงแรกของกระบวนการเลี้ยงเชื้อ ควรควบคุมการ feed ในอัตราที่ต่ำเพื่อควบคุมการสร้างกรดแลกติก และอัตราการ feed อาหารสามารถเพิ่มได้ในช่วงกลางถึงท้าย ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีลักษณะที่ต่ำลงในการสร้างกรดแลกติก และมีความต้องการสารอาหารที่สูงโดยผลพวงจากแหล่งโปรตีน โดยการเปลี่ยนวิธีการการ feed อาหารสามารถกำหนดได้จากค่า specific growth rate ของเชื้อที่สามารถวัดค่าได้จากกราฟวัดค่าความขุ่นของเชื้อในระหว่างการผลิต อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าใช้แนวทางใหม่ในการ feed เชื้อ พบว่าเชื้อหยุดการเจริญเติบโตก่อน แม้ว่าจะมีการให้อาหารในปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ว่าสาเหตุของการหยุดของเชื้อมีสาเหตุเนื่องมาจากสารยับยั้ง (inhibitors) การศึกษาเพิ่มเติมพบว่าสารยับยั้งที่ผลิตขึ้นน่าจะมาจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการให้อาหารเกินเพื่อขจัดเชื้อของแหล่งอาหารโปรตีน โดยเกิดปฏิกิริยา metabolic ซึ่งทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ เมื่อมีการสะสมมากเกินไปในระบบ ซึ่งปฏิกิริยา

นี้เกิดขึ้นได้มากในการผลิตโปรตีนที่นำมาใช้มีความเข้มข้นสูง ตลอดจนมีสภาพแวดล้อมที่ช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้แก่ อุณหภูมิที่สูง, ระยะเวลาการให้ความร้อนที่ยาวนาน ตลอดจนความเข้มข้นของสารบางอย่างที่สูง เช่น citrate และ phosphate การปรับปรุงกระบวนการเตรียมอาหาร โดยเฉพาะแหล่งโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Maillard ที่ลดลง จึงน่าที่จะเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบในการเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นที่สูงยิ่งขึ้นจากระบบการเลี้ยงเชื้อ ในปัจจุบันสามารถเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ได้ความเข้มข้นสูงสุดถึง 4.3×10^{11} ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงโดยสูตรอาหารธรรมดา (MRS) ประมาณกว่า 20 เท่า

ในตารางที่ 3, ได้มีการสรุปค่าความเข้มข้นเชื้อ, ผลผลิตเซลล์ *lactoc*, ค่าดัชนีค่า *growth yield* จากการเลี้ยงเชื้อโดยวิธีการต่างๆในการศึกษาครั้งนี้ ผลการเปรียบเทียบชี้ให้เห็นว่า การเลี้ยงเชื้อโดยการใช้น้ำเลี้ยงโปรตีนเป็น C-source ที่เหมาะสมสามารถผลิตสาร *lactoc* ได้ดีมาก อย่างไรก็ตามมีผลค่าอัตรา $Y_{x/TN}$ ที่ต่ำเนื่องจากโปรตีนไม่สามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การเลี้ยงเชื้อแบบ *batch* โดยมีการเติมน้ำตาลควบคู่ไปกับการใช้โปรตีนโปรตีน *case* สดขึ้น (โดยมีค่า $Y_{x/TN}$) ที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามการสร้างกรด *lactoc* ไม่สามารถวัดค่าได้ การควบคุมการสร้างกรด *lactoc* สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการใช้เทคนิค *fed-batch* โดยการ *feed* ที่เหมาะสมจะต้องมีการใช้ทั้งแหล่งน้ำเลี้ยงและโปรตีนควบคู่กันไป สามารถเลี้ยงเชื้อสามารถทำให้สูงขึ้นได้โดยการเพิ่มปริมาณโปรตีน (*case* หรือ *glucose*) และน้ำตาล อย่างไรก็ตามพบว่า *growth yield* ($Y_{x/g}$, $Y_{x/TN}$) มีแนวโน้มที่จะลดลงที่การเลี้ยงที่มีความเข้มข้นเชื้อที่สูงขึ้นทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของ *inhibitors* (ได้แก่กรด *lactoc*, *acet*, เกลือ และ *Maillard products*) ที่สะสมมากขึ้นซึ่งค่า *growth yield* น่าที่จะสามารถปรับปรุงให้สูงขึ้นได้โดยแนวทางการลดการเกิดและสะสมของ *inhibitors* เหล่านั้น

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงเชื้อในภาชนะ *Lactoc acid bacteria* ที่ความเข้มข้นสูงได้ดังนี้คือ

1. การใช้น้ำเลี้ยงอาหารประเภทโปรตีนทดแทนแหล่งอาหารประเภทน้ำตาล สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี และยังทำให้เชื้อมีการสร้างกรด *lactoc* ที่ไม่มากนัก
2. การใช้น้ำเลี้ยงอาหารประเภทโปรตีนทั้งหมด มีข้อเสียคือประสิทธิภาพการใช้โปรตีนโดยเชื้อจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพต่ำ (มีการใช้น้ำเลี้ยงโปรตีนประมาณ 10% ของที่ไว้ทั้งหมด) ซึ่งหมายความว่ามีการใช้น้ำเลี้ยงอย่างสิ้นเปลืองในการเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นสูง จำเป็นต้องได้ปริมาณโปรตีนเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการใช้โปรตีนมีแนวโน้มว่าสามารถปรับปรุงได้โดยการย่อยโปรตีนให้มีขนาดที่เหมาะสม (*α*-, *β*- peptide) การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับขนาดของโปรตีนที่เหมาะสมและ *growth promotor* ที่จำเป็น (ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นสายเปปไทด์ที่

จำเพาะ) จะมีความสำคัญอย่างมากต่อการพัฒนาให้แหล่งโปรตีนอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

3. การใช้แหล่งอาหารประเภทน้ำศาลประกอบการใช้แหล่งโปรตีนจะช่วยให้ได้ cell yield ที่เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องระมัดระวังการสร้างกรด lactic ที่มีมากกว่าที่ใช้ในแหล่งน้ำศาลเป็น ๘-๑๐% แนวทางที่สามารถใช้ควบคุมการสร้างกรด lactic อย่างมีประสิทธิภาพหนึ่งคือการให้แหล่งอาหารน้ำศาลสามารถทำสโตร์การใช้เทคนิค fed-batch ในการควบคุมระดับน้ำศาลในกระบวนการ
4. การใช้เทคนิค fed-batch ในการเลี้ยงเชื้อก็มีความเข้มข้นสูงสามารถทำได้โดยการปรับอัตราส่วน feed อาหารทั้งแหล่งน้ำศาล และโปรตีนให้เหมาะสมกับสภาวะของเชื้อในแต่ละช่วง โดยเราสามารถติดตามสภาวะของเชื้อได้จากการวัด parameter ที่สำคัญจากระบบ เช่น ความเข้มข้นของเชื้อ
5. ในการเตรียมแหล่งอาหารโปรตีนเพื่อความเข้มข้นสูงสำหรับกระบวนการที่ก่อให้เกิดความเข้มข้นสูง พบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา Maillard ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และเป็นอุปสรรคที่สำคัญของการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการเลี้ยงเชื้อเพื่อความเข้มข้นสูง การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนากระบวนการเตรียมแหล่งอาหารโปรตีนที่ความเข้มข้นสูงที่ได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา Maillard ต่ำ จึงมีความสำคัญอย่างมาก
6. ขบวนการศึกษาการพัฒนาแหล่งโปรตีนที่มีราคาถูกและสามารถนำมาใช้ทดแทนแหล่งโปรตีนราคาสูงที่ใช้กันอยู่คือ meat extract, tryptone และ yeast extract พบว่าสามารถใช้แหล่งโปรตีนจาก fish soluble protein ที่ไม่ผ่านการย่อยซึ่งจะกลายเป็นแหล่งโปรตีนหลัก และเสริมด้วยแหล่งโปรตีนจาก whey ซึ่งมี growth factor ที่จำเป็น ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
7. แนวทางสำหรับการเลี้ยงเชื้ออื่นๆที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ประยุกต์ใช้สำหรับกระบวนการเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* ที่ความเข้มข้นสูงได้อย่างดีและน่าที่จะสามารถใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้ออื่นๆในกลุ่ม Lactic acid bacteria ได้เป็นอย่างดี และมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาศักยภาพของกระบวนการให้สูงขึ้นอีกได้

5. พินิจอรรถาธิบาย

1. Fuller, R.: History and development of probiotics, p.1-9. *In* Fuller, R.(ed.), Probiotics: The scientific basis. Chapman & Hall press, London (1992).
2. คณินิจ ก่อธรรมฤทธิ์, การศึกษาผลวิเคราะห์สภาพและศักยภาพการผลิต การขึ้นและ การลดลงของ Probiotic ของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ พงศาวดารคณินิจมหาวิทยาลัย เชียงใหม่ (2540)
3. Pirt, S. J.: Effect of chemical inhibition and activation of growth, p. 170-185. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1985).
4. Garje, G. and Gottschalk, G.: Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **34**, 446-449 (1991).
5. Ohara, H., Hiyama, K., and Yoshida, T.: Kinetics of growth and lactic acid production in continuous and batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol., **37**, 544-548 (1992).
6. Hough, M., Nomura, Y., and Iwahara, N.: Novel method of lactic acid production by electrodialysis fermentation. Appl. Environ. Microbiol., **52**, 314-319 (1986).
7. Srivastava, A., Roychoudhury, P. K., and Subai, V.: Extractive lactic acid fermentation using ion-exchange resin. Biotechnol. Bioeng., **39**, 607-611 (1992).
8. Lazarova, Z. and Peeva, L.: Solvent extraction of lactic acid from aqueous solution. J. Biotechnol., **32**, 75-82 (1994).
9. Gottschalk, G.: Bacterial fermentations, p.214-224. *In* Gottschalk, G. (ed.), Bacterial metabolism. Springer-Verlag, Berlin, 2nd Ed. (1988).
10. Tseng, C.P., Tsau, J.L., and Montville, T.J.: Bioenergetics consequences of catabolic shifts by *Lactobacillus plantarum* in response to shifts in environmental oxygen and pH in chemostat cultures. J. Bacteriol., **173**, 4411-4416 (1991).
11. Bohills, M. and Marshall, V.M.: Effect of acidid pH and salt on acid end-products by *Lactobacillus plantarum* in aerated, glucose-limited continuous culture. J. Appl. Bacteriol., **73**, 67-70 (1992).
12. Tseng, C.P. and Montville, T.J.: Metabolic regulation of end-product distribution in *Lactobacilli*: Causes and consequences. Biotechnol. Prog., **9**, 113-121 (1993).
13. Aiba, S., Nagai, S., and Nishizawa, Y.: Fed batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: A perspective of computer control to enhance the productivity in baker's yeast cultivation. Biotechnol. Bioeng., **18**, 1001-1016 (1976).
14. Konstantinov, K., Kishimoto, M. Seki, T. and Yoshida, T.: A Balanced Dil-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng., **36**, 750-758 (1990).
15. Yamane, T. and Shimizu S.: Fed batch technology in microbial processes. *In* Adv. Biochem. Eng., Springer-Verlag, Berlin, Fiescher, A. (ed.), **30**, p. 145-194 (1984).
16. De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E.: A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol., **23**, 130-135 (1960).

17. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356 (1956).
18. Taylor, M.: Ferrozol titration: an evaluation of its various modifications. *Analyst*, **82**, 488-498 (1957).
19. Mickelson, M.N.: Glucose degradation, Molar growth yields, and evidence for oxidative phosphorylation in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **109**, 46-105 (1972).
20. Bryan-Jones, D.G., Whittenbury, R.: Haematin-dependent oxidative phosphorylation in *Streptococcus faecalis*. *J. Gen. Microbiol.* **58**, 247-260 (1969).
21. Borch, E. and Molin, G.: The aerobic growth and product formation of *Lactobacillus Leuconostoc, Brachyothrix*, and *Carnobacterium* in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 81-88 (1989).
22. Lacey, C. A. and Condon, S.: Active role of oxygen and NADH oxidase in growth and energy metabolism in *Leuconostoc*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 1789-1796 (1986).
23. Pritchard, G. G. and Coolbear, T.: The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 179-206 (1993).
24. Kok, J. and W. M. de Vos: The proteolytic system of lactic acid bacteria. p.169-210. In M.J. Gasson and W.M. de Vos (ed.), *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. Blackie Academic and Professional, Glasgow (1994).
25. Kramer, R. and Springer, G.: Metabolism. p.90-93. In Rehm, H.-J. and Reed, G.(eds.), *Biotechnology*, 2nd Ed. VCH, Weinheim (1993).
26. Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, R.S. E., Konnings, W. N., Gripon, J.-C., and Richard, J.: Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3024-3030 (1995).
27. Juillard, V., Lann, H., Kunji, E.R.S., Jeronimus-stratingh, C. M., Bruins, A.P., and Konings, W.N.: The extracellular P₁-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *J. Bacteriol.*, **177**, 3472-3478 (1995).
28. Konings, W.N., Poolman, B., and Driessen, A.J.M.: Bioenergetics and solute transport in lactococci. *Crit. Rev. Microbiol.*, **16**, 419-476 (1989).
29. Jensen, P. R. and Hammer, K.: Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. Env. Microbiol.*, **59**, 4363-4366 (1993).
30. Berg, R.W., Sandine, W.E., and Anderson, A.W.: Identification of a growth stimulant for *Lactobacillus sanfrancisco*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 786-788 (1981).
31. Major, N. C. and Bull, A. T.: Lactic acid productivity of a continuous culture of *Lactobacillus delbrenckii*. *Biotech. Lett.*, **7**, 401-405 (1985).
32. Venkatesh, K.V., Okos, M.R., and Wankat, P. C.: Kinetic model of growth and lactic acid production from lactose by *Lactobacillus bulgaricus*. *Process Biochem.*, **28**, 231-241 (1993).
33. Kulozik, U.: Physiological aspects of continuous lactic acid fermentations at high dilution rates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 506-510 (1998).
34. Tilak, W. N.: Maillard reaction. p.105-110. In *Savory Flavors*. Esteezy Associates, Inc., Wisconsin, U.S.A. (1995).

35. Marounek, M. and Brezina, P.: Heat-induced formation of soluble Maillard reaction products and its influence on utilization of glucose by rumen bacteria. *Archiv. für Tierernährung*, 43(1), 45-51 (1993).
36. Marounek, M., Kostyukovsky, V.A., Hodrova, B. and Fliegrova, K.: Effect of soluble Maillard reaction products on rumen microorganisms. *Folia Microbiologica*, 40(3), 267-270 (1995).
37. Lanciotti, R., Anese, M., Sinigaglia, M., Severini, C. and Massini, R.: Effects of heated glucose-fructose-glutamic acid solutions on the growth of *Bacillus stearothermophilus*. *Food Science & Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 32(4), 223-230 (1999).

6. ตารางแสดงและรูป ประกอบผลการทดลอง

Table 1 Cultivation of *Lactobacillus acidophilus* using various carbon sources at 2%w/v.

Carbon source ¹	Total viable count (cfu/ml)±SD ²	lactic acid (g/l)
Glucose (MRS)	1.24±0.17×10 ⁹	5.8
Molasses ³	7.22±0.21×10 ⁸	5.5
Glycerol	4.82±0.20×10 ⁸	ND ⁴
Yeast extract	2.32±0.14×10 ⁹	11.5

¹ Modified MRS medium by substituting the glucose with mentioned carbon sources.

² Standard deviation of duplicated data.

³ prepared according to a basis of equal total sugar with 2% glucose.

⁴ ND is not determined.

Table 2. Comparison of the cell yield obtained by using different types of complex media¹.

Complex media	Cell density, OD ₆₀₀ (unit)	Ratio of OD ₆₀₀ unit /TN	AN/TN ²
2% Yeast extract	2.03	9.58	0.64
3 h Acid digested soy bean meal	1.52	6.90	0.34
9 h Acid digested soy bean meal	1.74	7.90	0.36
Kojizyme digested soy bean meal	2.11	8.79	0.31
Non digested fish soluble protein	0.50	2.33	0.26
10 h Acid digested fish soluble protein	2.52	11.72	0.70

¹ The medium used was MRS media where glucose was substituted by each complex media prepared at equal total nitrogen (TN) of 0.22 % (w/v).

² Ratio of amino nitrogen and total nitrogen of the complex media.

Table 3 Comparison of the growth, lactic acid and yields of experiments using different cultivation techniques

Cultivation	OD ₆₀₀	Viable count (x10 ⁸ cells)	Lactic acid concentration (g/L)	Total nitrogen (TN) added (g/L)	Yield at max. OD (OD/g/L)	Yield at max. OD (OD/TN)
Batch (without glucose)	4.8	-	0.8	4.62	-	0.2%
Batch	12.4	-	8.8	4.18	0.57	0.22
Fed-batch (glucose feeding only)	11.6	10.8	7.8	4.18	0.68	0.23
Fed-batch (glucose and protein feeding) exp1	35.2	37.8	6.3	15.97	0.95	0.29
Fed-batch (glucose and protein feeding) exp2	36.3	40.0	10.1	16.62	0.78	0.32

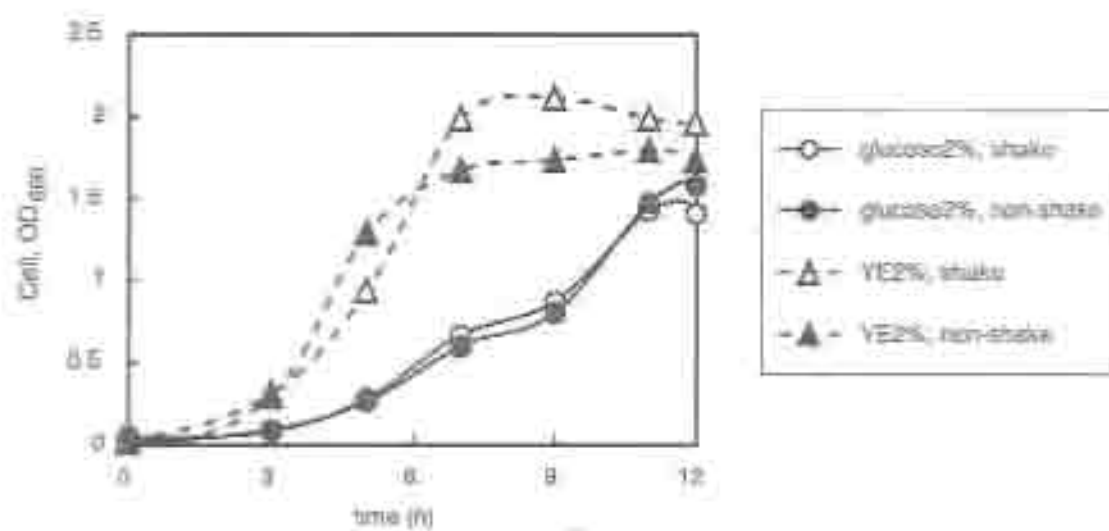


Fig.1. Cell growth in flask cultivation using glucose and yeast extract.

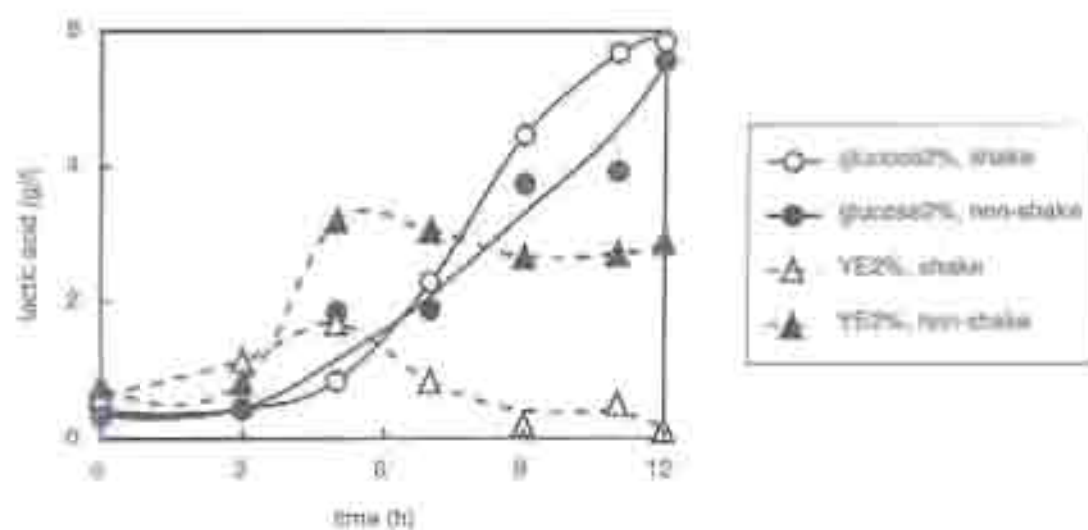


Fig.2. Lactic acid production in flask cultivation using glucose and yeast extract.

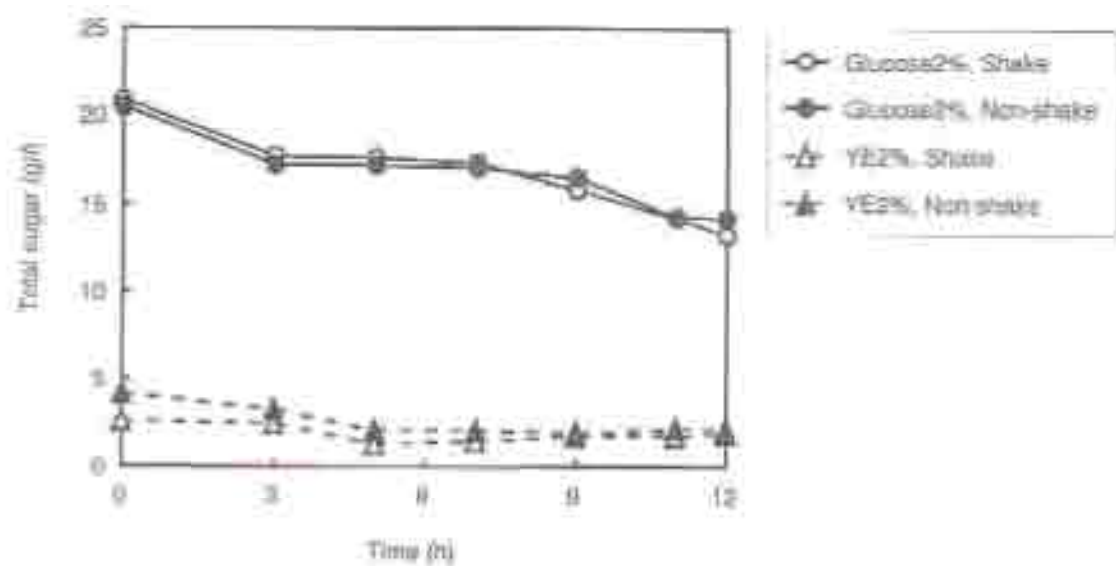


Fig. 3. Total sugar in flask cultivation using glucose and yeast extract.

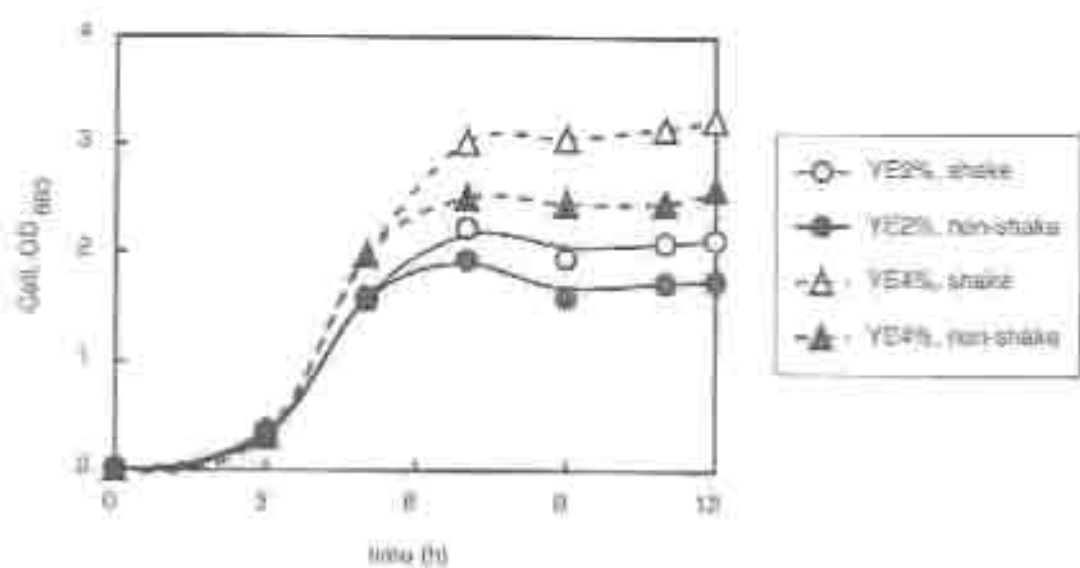


Fig. 4. Cell growth in flask cultivation using various concentrations of yeast extract.

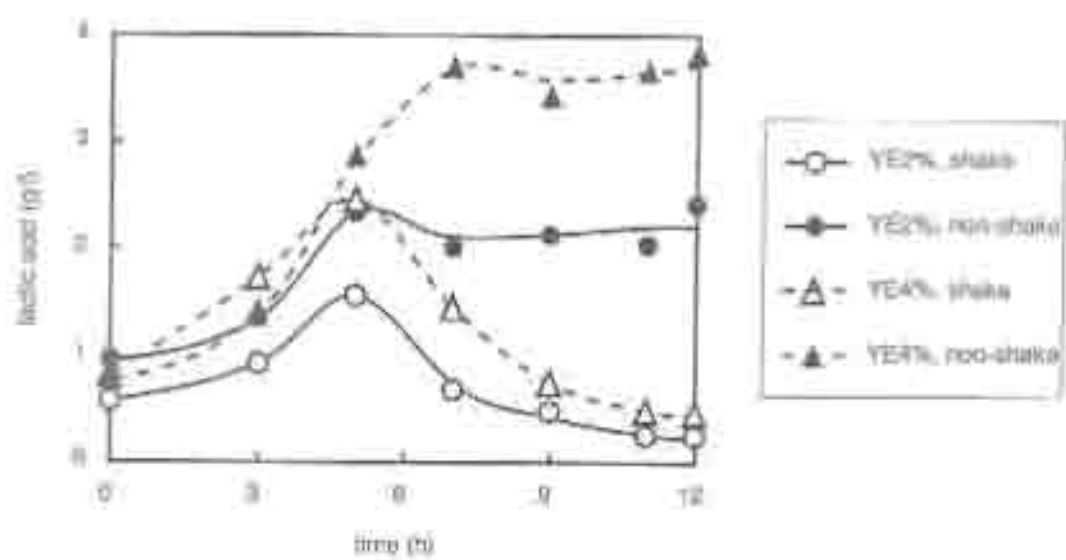


Fig. 5. Lactic acid production in flask cultivation using various concentrations of yeast extract.

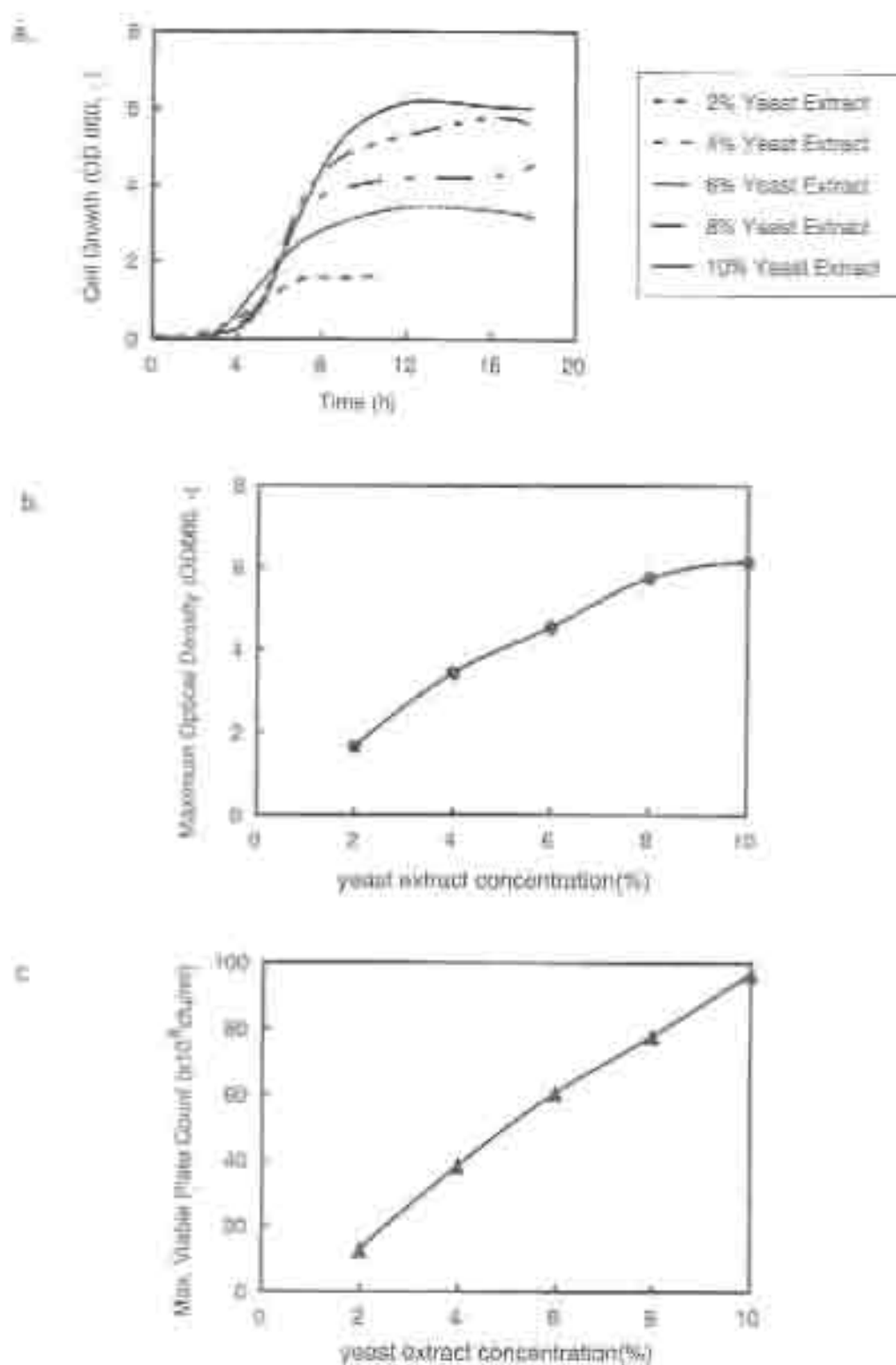


Fig. 6. Effect of yeast extract concentration on cell growth.

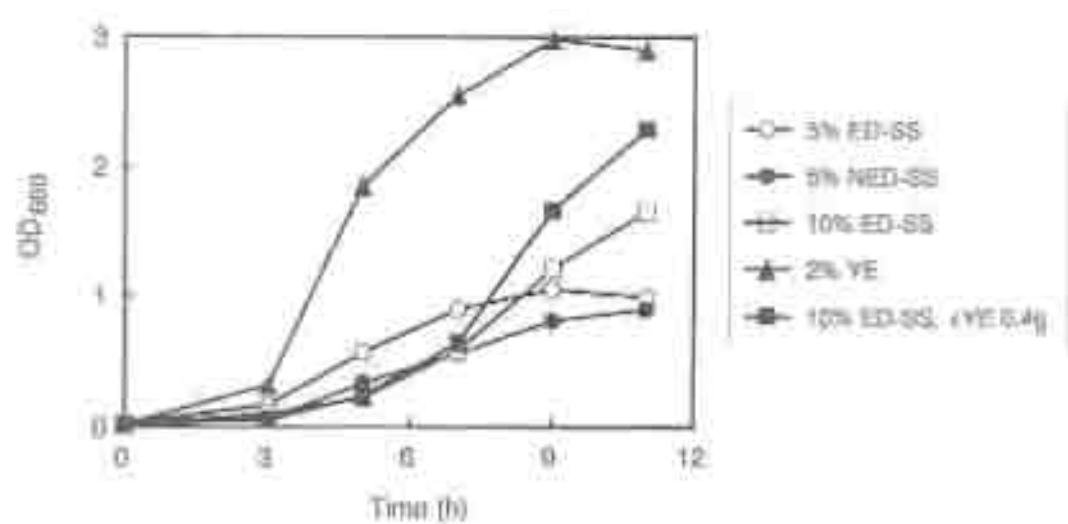


Fig. 7. Cultivation of LAB Using C-Source from Soy-sauce.

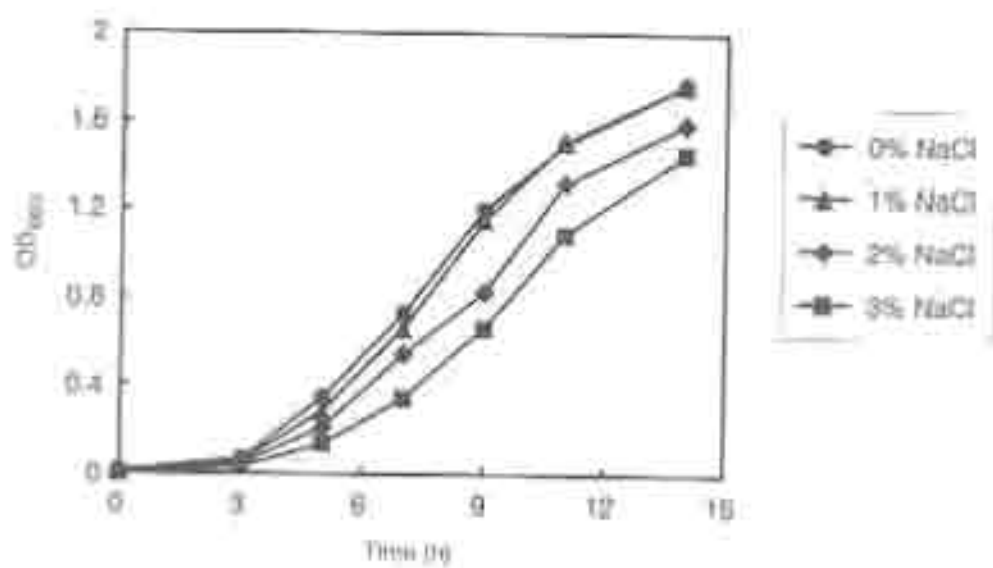


Fig. 8. Effect of Salt Concentration on Growth of LAB

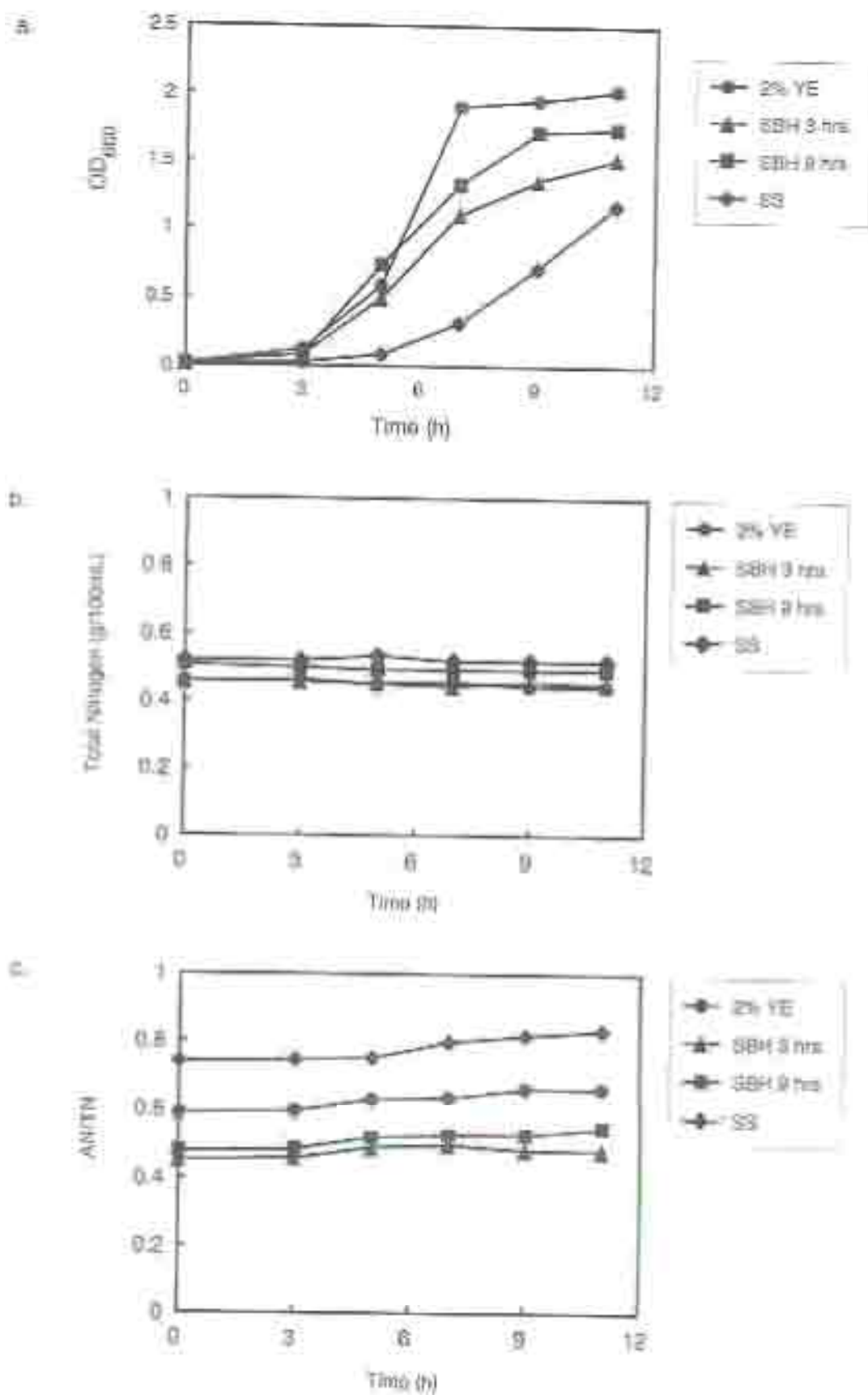


Fig. 8. Cultivation of LAB using acid hydrolysed soybean meal.

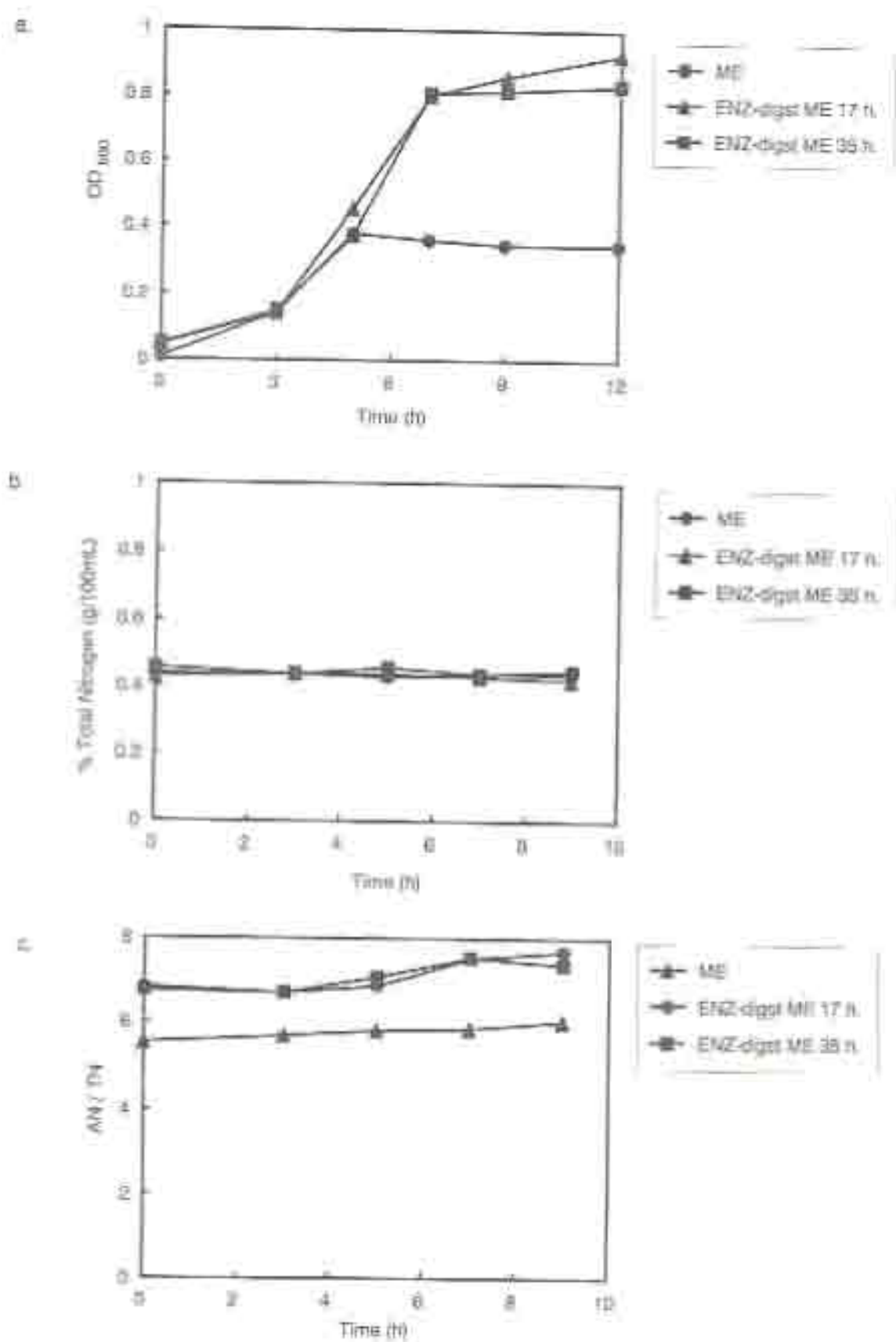


Fig. 10. Cultivation of LAB using different AN/TN meal extract as C-source.

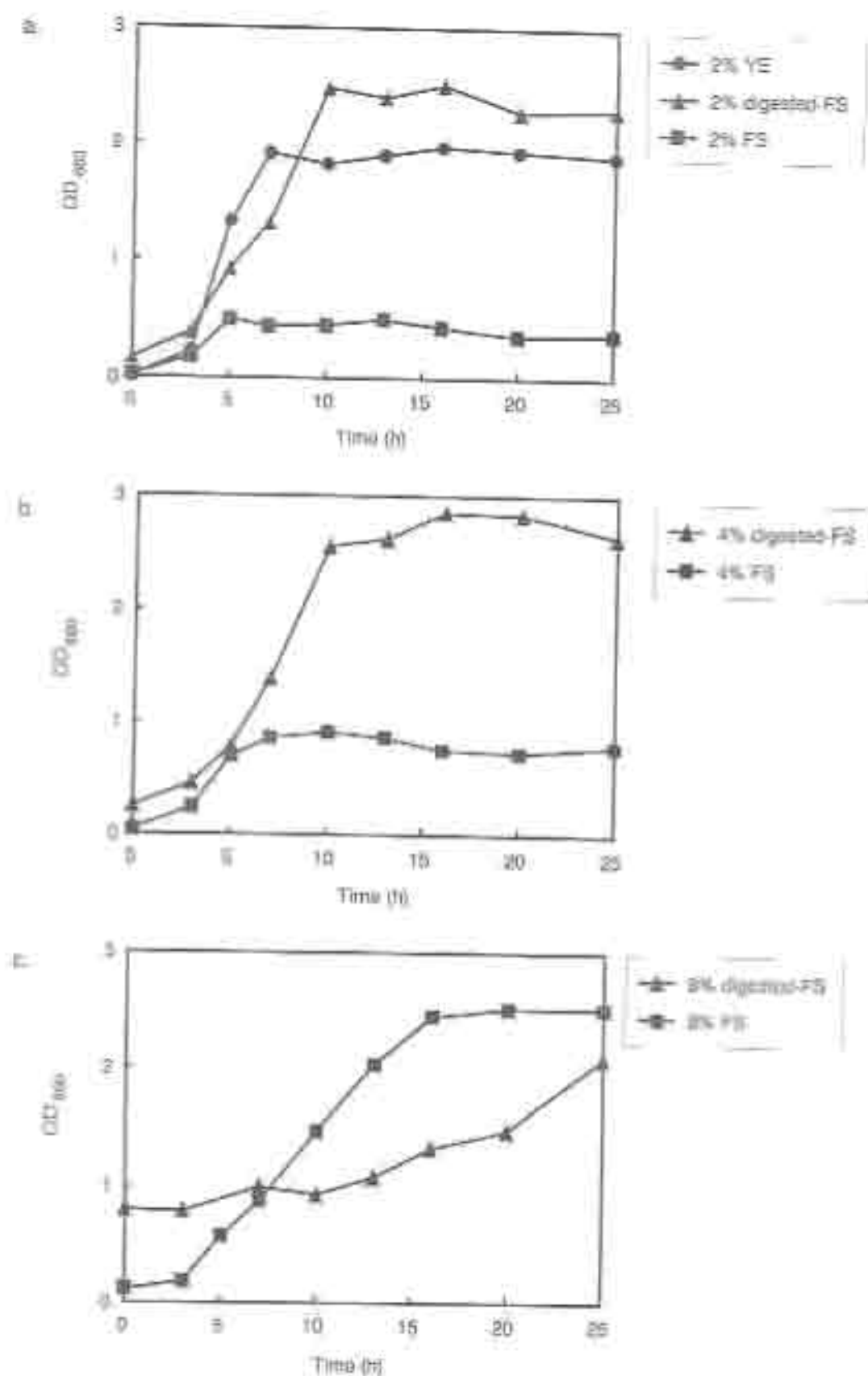


Fig. 11. Cultivation of LAB using C-source from fish soluble protein.

Note: The medium of 2%, 4% and 8% FB were prepared on the basis of equivalent total nitrogen to those of 2%, 4% and 8% of yeast extract.

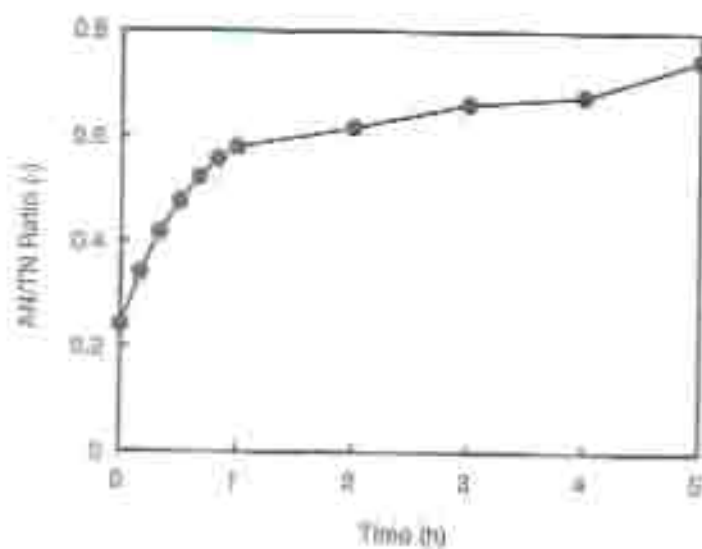


Fig. 12a. Time course of AN/TN ratio in digestion of fish soluble with HCl.

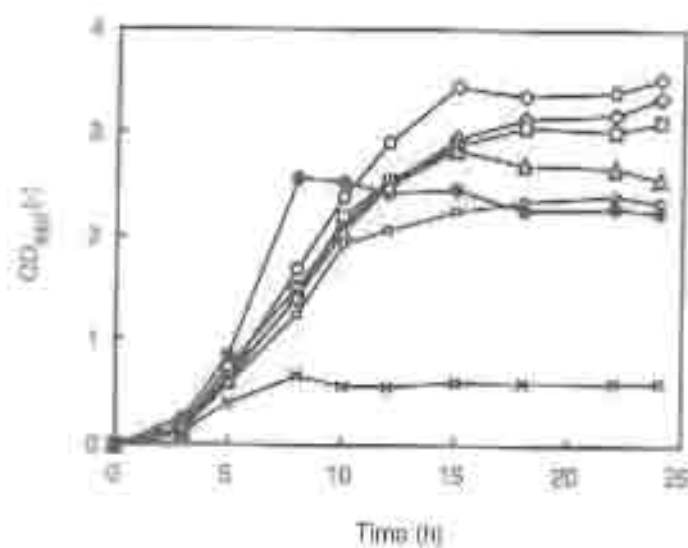
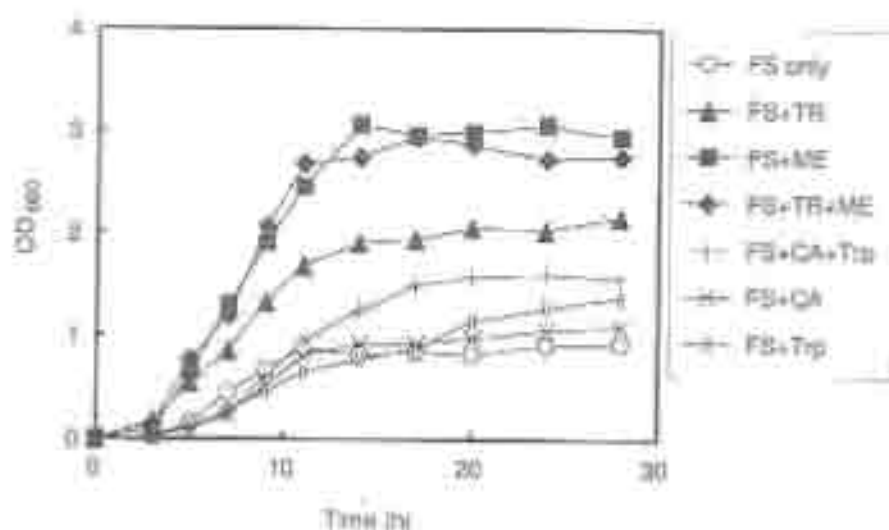


Fig. 12b. Growth of *L. acidophilus* in fish soluble digested for various time. Symbols: ●, 2% (w/v) yeast extract; ×, non-digested fish soluble; ◇, □, ◻, △, ■, fish soluble digested at 10 min., 30 min., 1 h., 3h. and 5 h. respectively. All medium was adjusted to have equal total nitrogen content.



Note: The medium in all experiment was prepared at equal total nitrogen.
 Abbreviations: FS: Fish soluble; TB: Tryptone; ME: Meat extract; CA: casein acid; Trp: Tryptophan.

Fig. 13. Comparison of growth of *L. acidophilus* using fish soluble as a sole protein source and with supplement of various sources of protein.

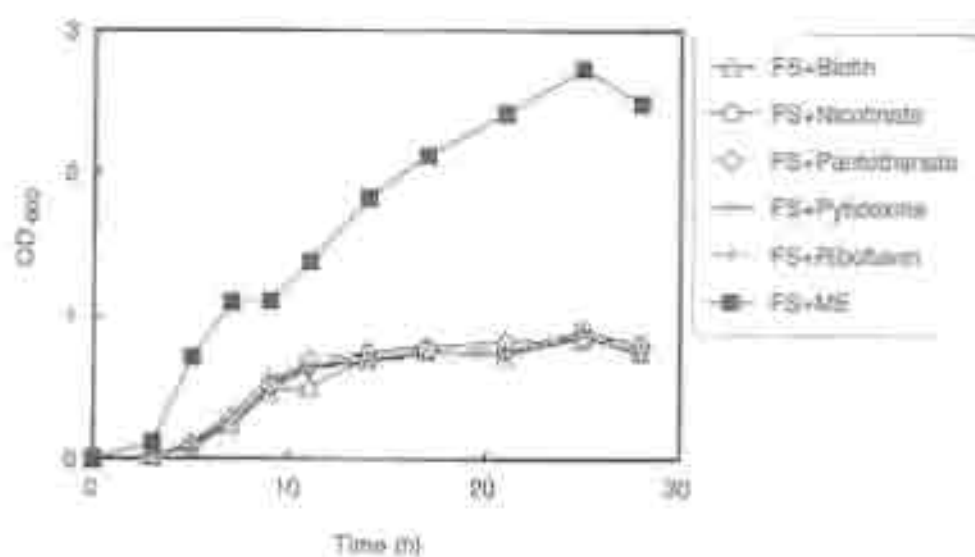


Fig. 14. Effect of vitamins addition on growth of *L. acidophilus*.

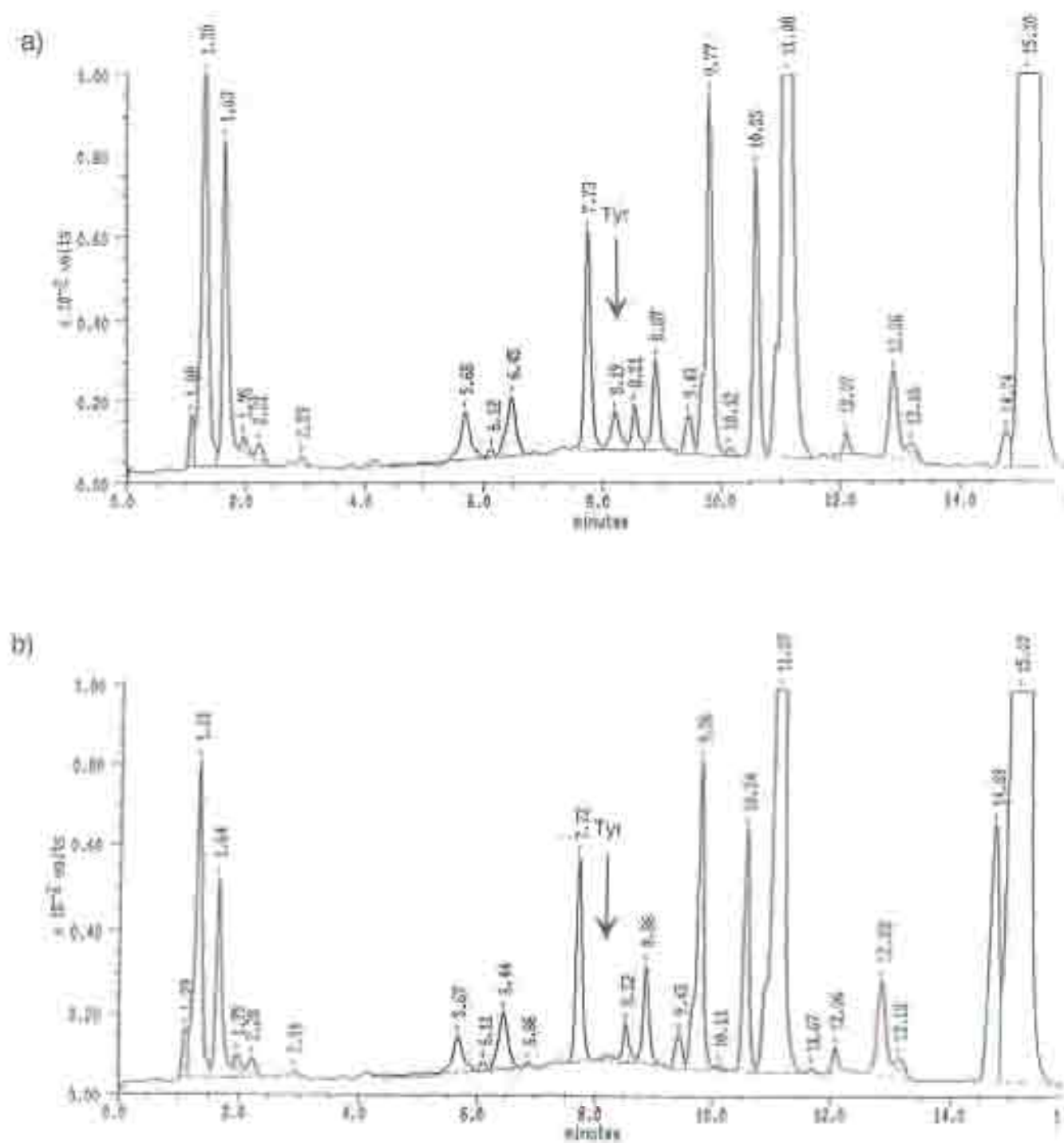


Fig. 15. Analysis of amino acids content in broth during growth of *L. acidophilus* at a) 0 hr and b) 8 hr.

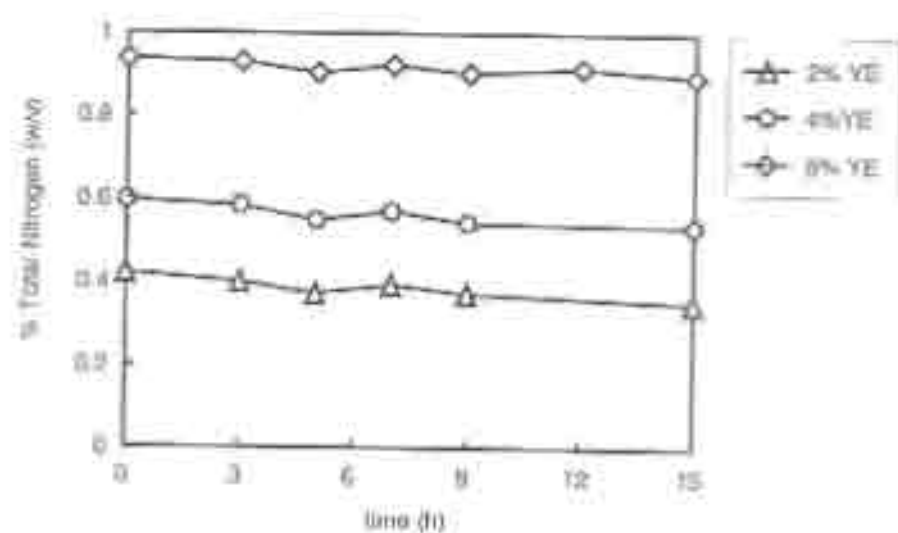


Fig. 16. Time course of total nitrogen remained in supernatant of culture broth using yeast extract at different concentration as complex carbon source instead of glucose.

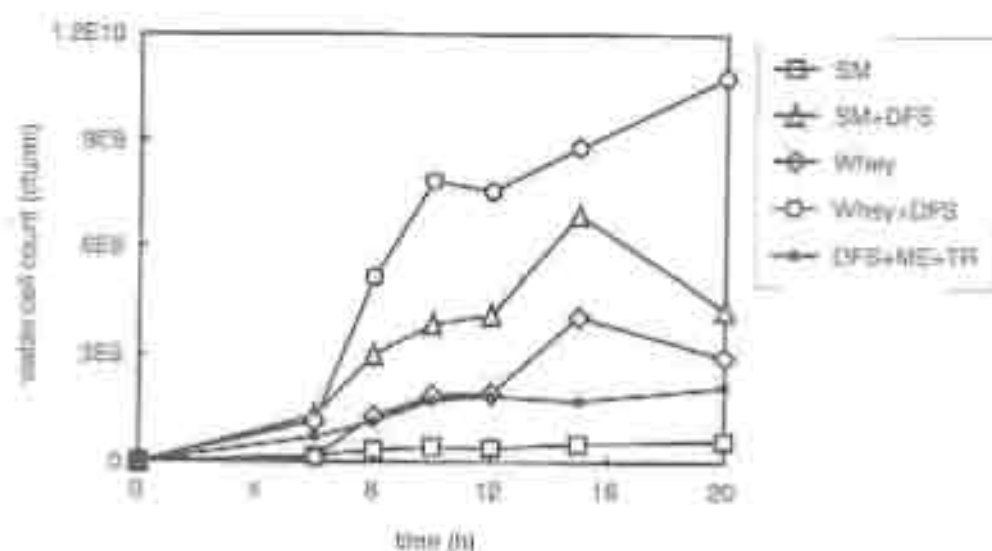


Fig. 17. Growth of *L. acidophilus* on various sources of milk base protein. The protein content of medium in all experiment was adjusted to be equivalent in total nitrogen (TN = 0.46 %).
Abbreviation: SM, skim milk; DFS, digested fish powder; NE, yeast extract; TR, tryptone.

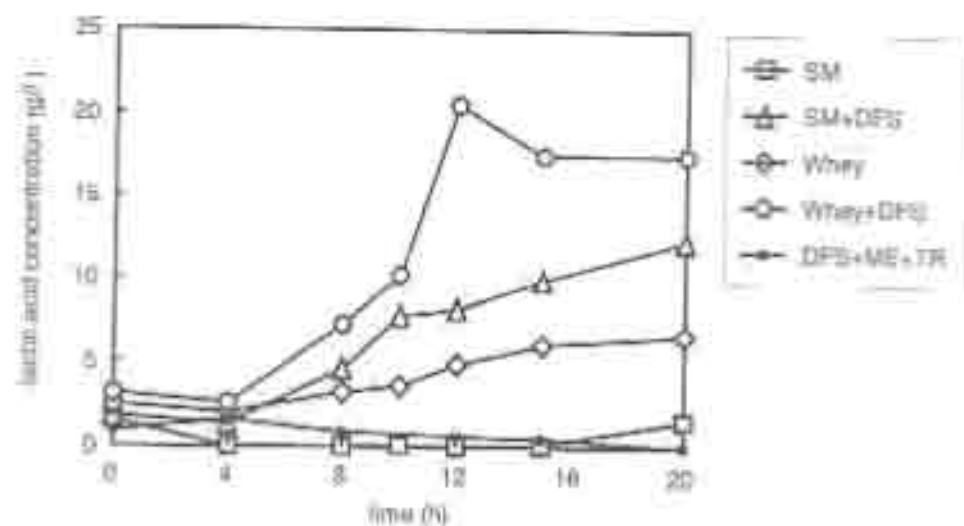


Fig. 18 Lactic acid formation of *L. acidophilus* cultured on various sources of milk base protein. Calcium carbonate was added to buffer the system in order to reduce the inhibitory effect of lactic acid. Abbreviations: SM, skim milk; DPS, digested skim whey; ME, meat extract; TR, Tryptone.

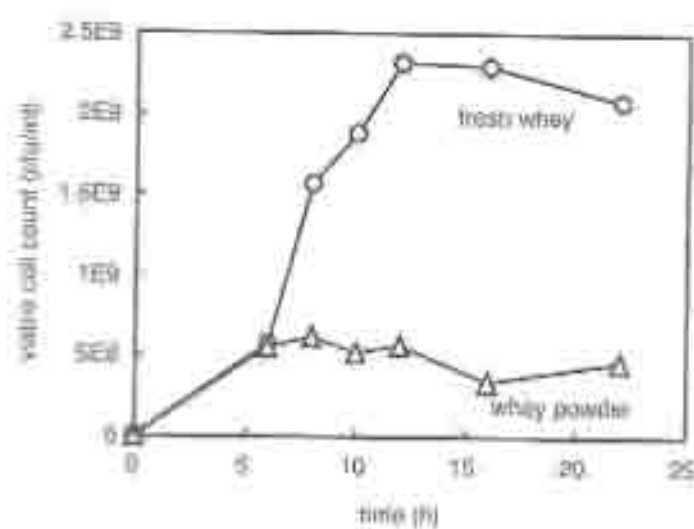


Fig. 19. Comparison of growth of *L. acidophilus* in medium contained fresh whey and whey powder as a protein source. Total nitrogen content for both medium was adjusted to be equivalent.

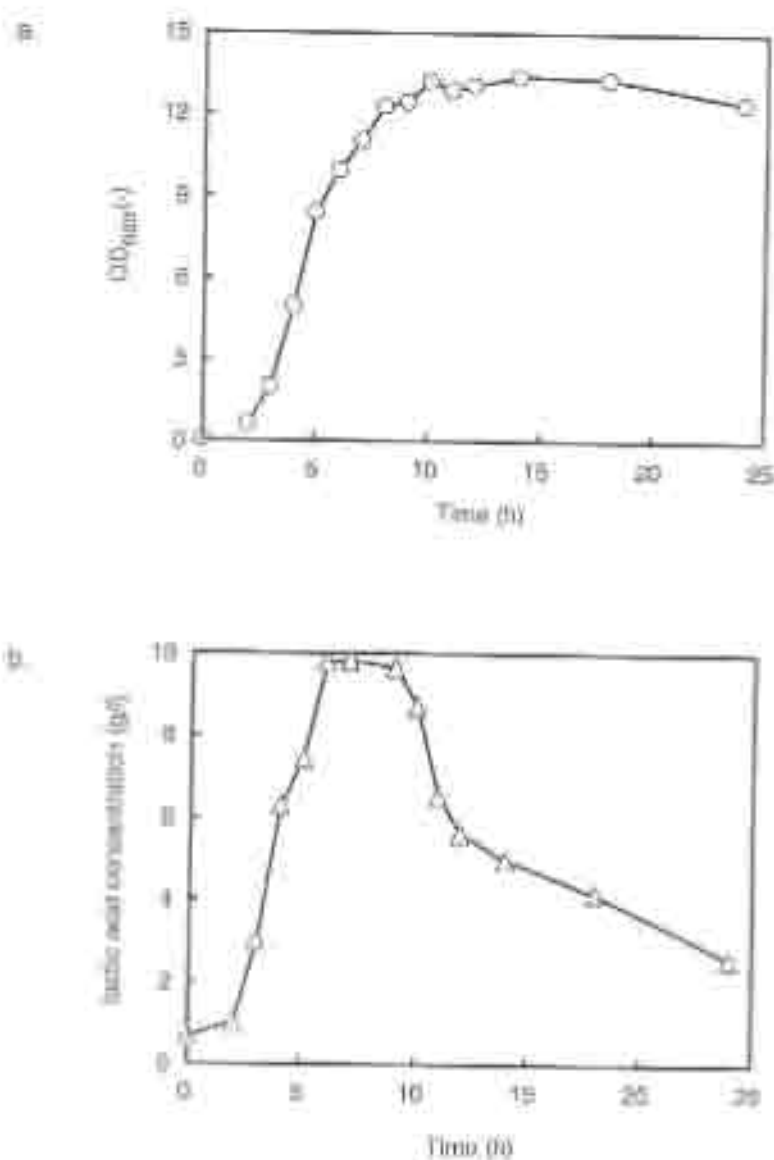


Fig. 20. Batch cultivation of *L. acidophilus* under pH control using digested fish soluble protein in modified MRS medium. a) growth, b) lactic acid formation.

Index: Formosa, S.
SFV-HCl digested DFE

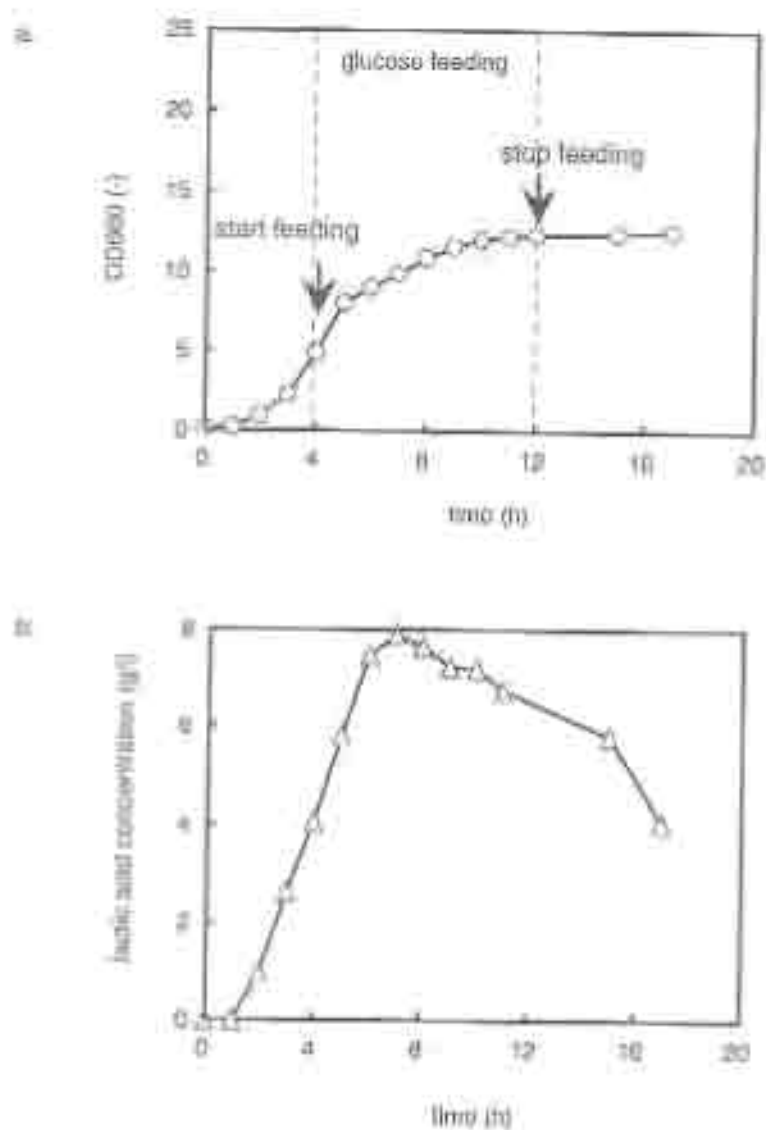


Fig. 21. Feed-batch cultivation of *L. acidophilus* by constant feed rate of glucose. a) cell density, b) lactic acid formation.

From: *Bioprocess Engineering*
 24 (1999) 249-254

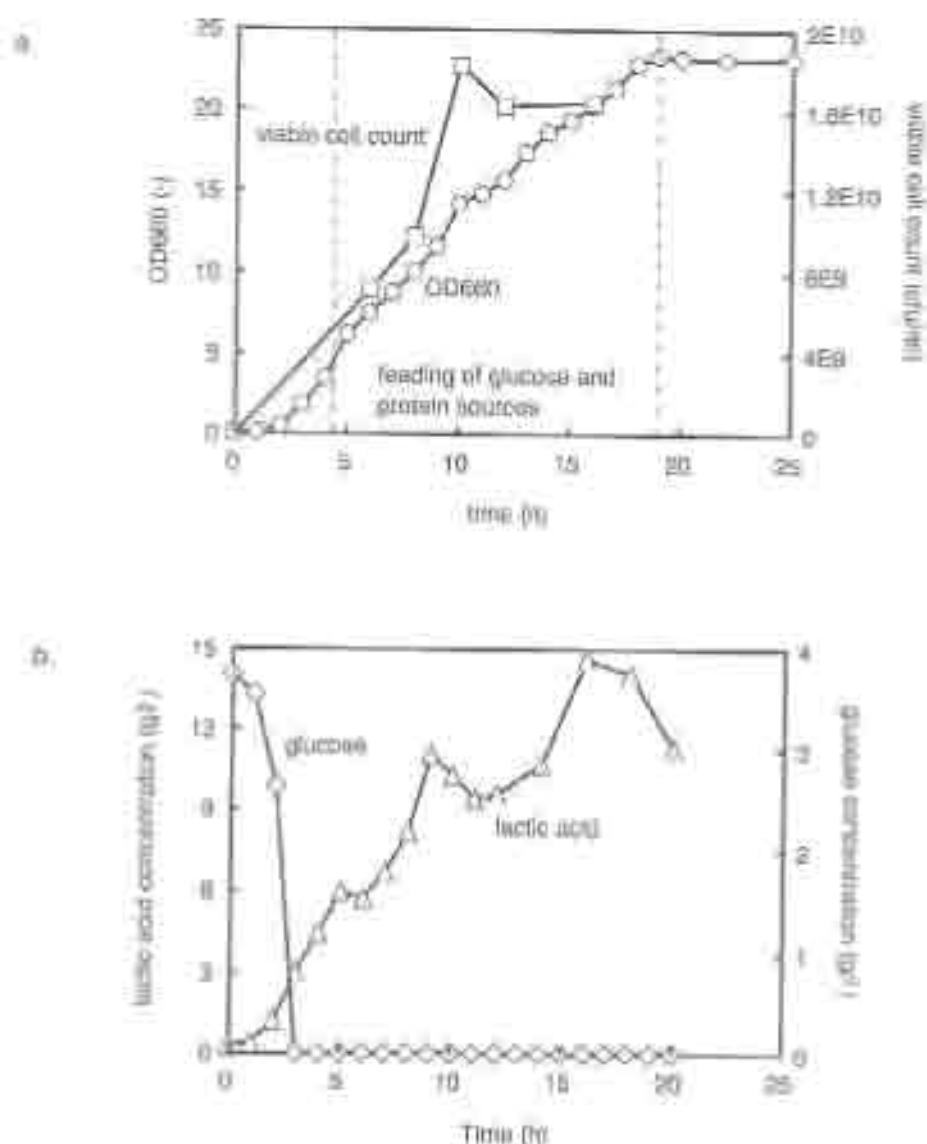


Fig. 22 Fed-batch cultivation by constant feeding of glucose and proteins.
a) cell density and viable cell count. b) lactic acid formation and glucose concentration.

From Fermentation, 6
© 1994 John Wiley & Sons

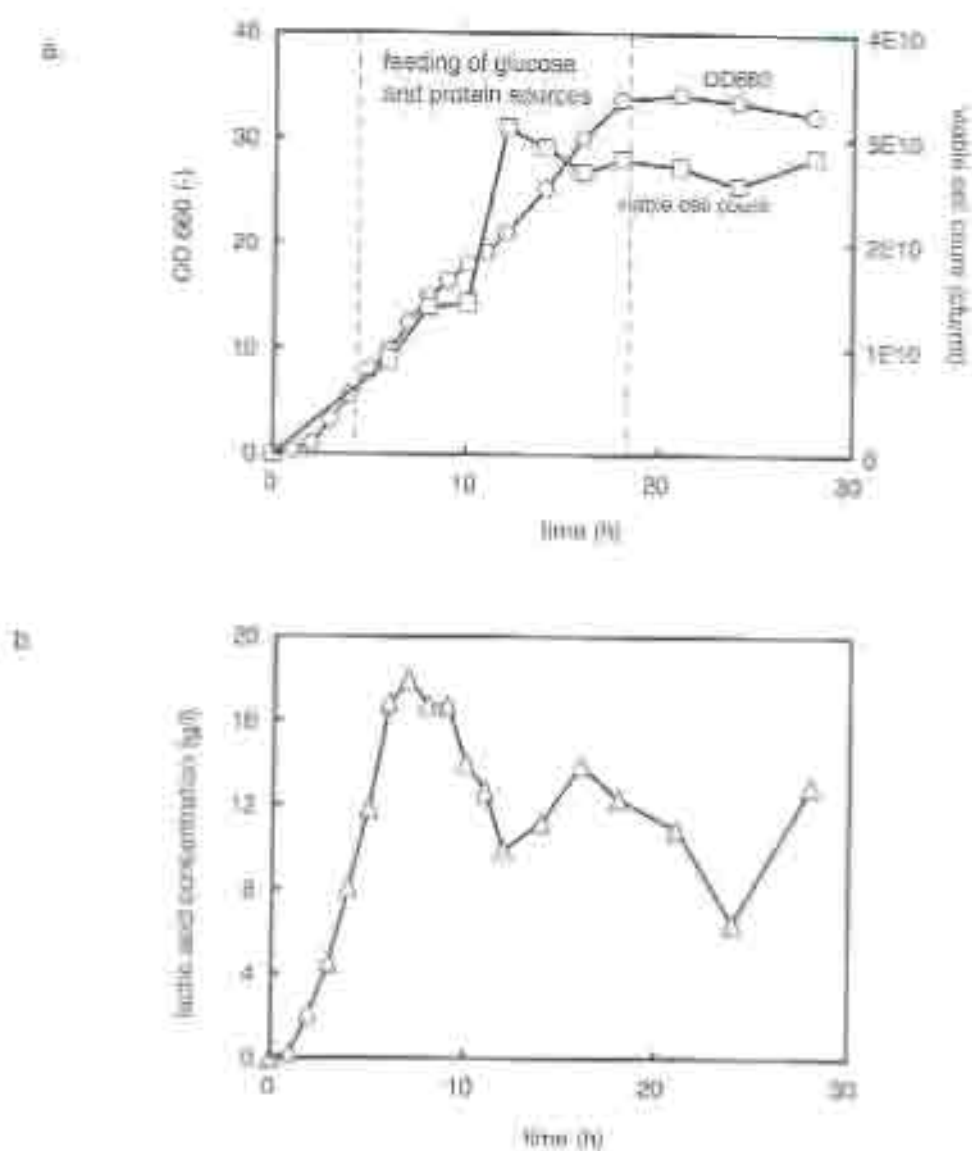


Fig. 23. Fed-batch cultivation by exponential feeding of glucose and proteins. a) cell density and viable cell count. b) lactic acid formation.

Notes: Fermentor: 7
 F W: 100 g/l glucose, 10 g/l

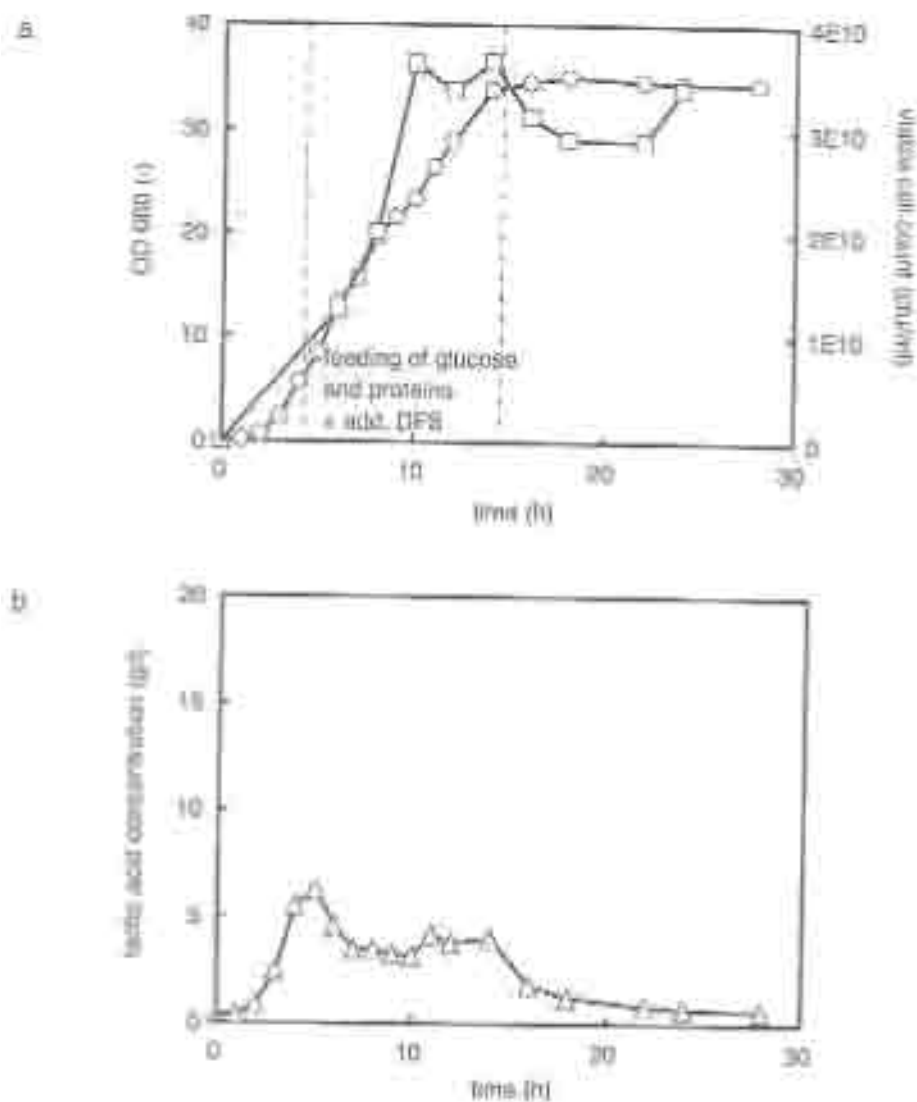


Fig. 24 Fed-batch cultivation by exponential feeding of glucose and proteins with additional DFS. a) cell density and viable cell count. b) lactic acid formation.

Note: Feeding: 8
8.14 H₂O digested DFS

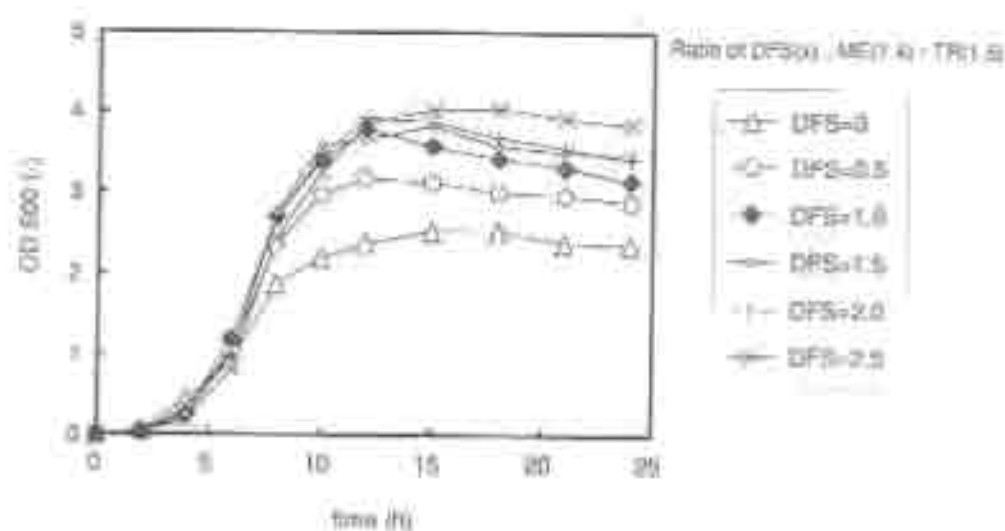


Fig. 25. Optimal ratio of DFS:ME:TR for optimal growth of *L. acidophilus*. 2% of glucose was supplemented for C-source. Abbreviations: DFS, digested fish soluble; ME, meat extract; TR, tryptone.

(Note: 5% HCl dissolved DFS)

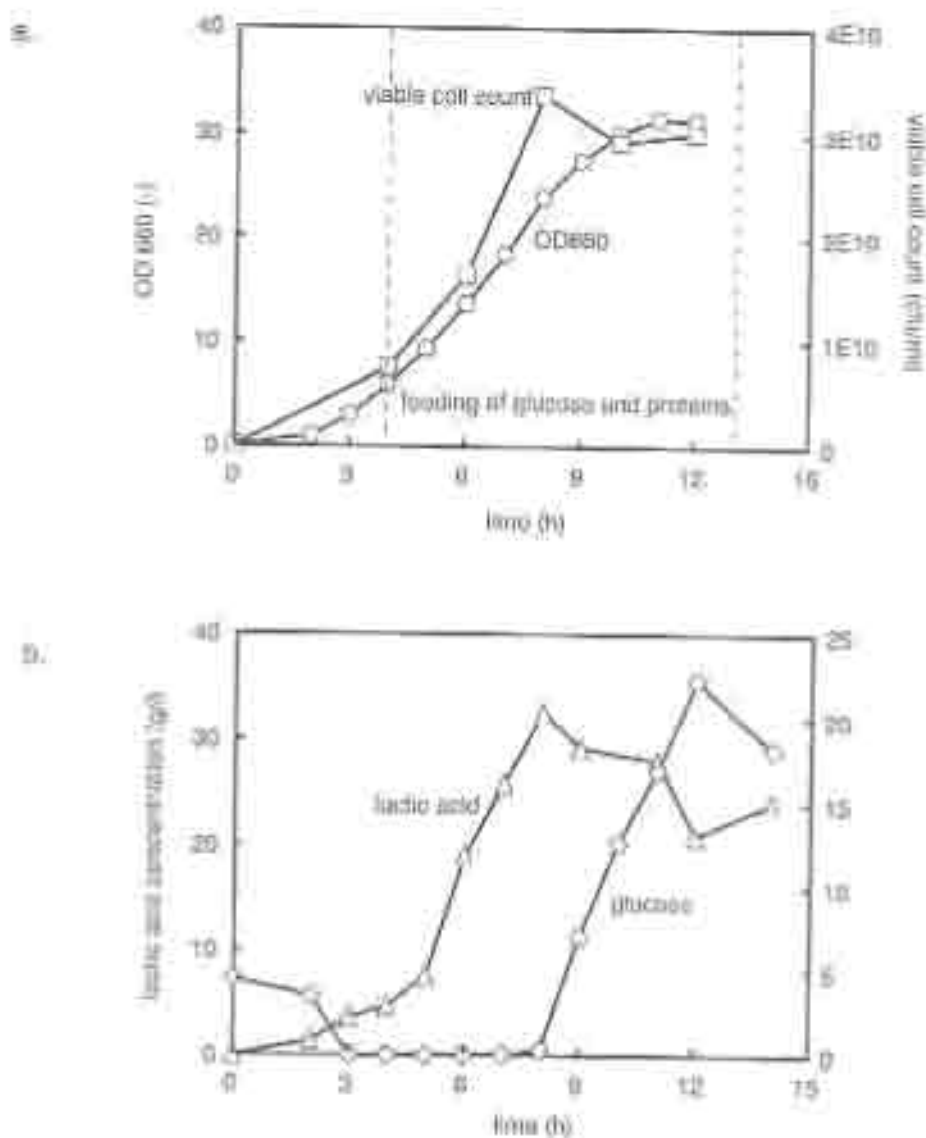


Fig. 26. Fed-batch cultivation by exponential feeding at high feed rate of glucose and proteins. a) cell density and viable cell count. b) lactic acid formation and glucose concentration.

Notes: Polymer: 12
2N HCl: 10g/l

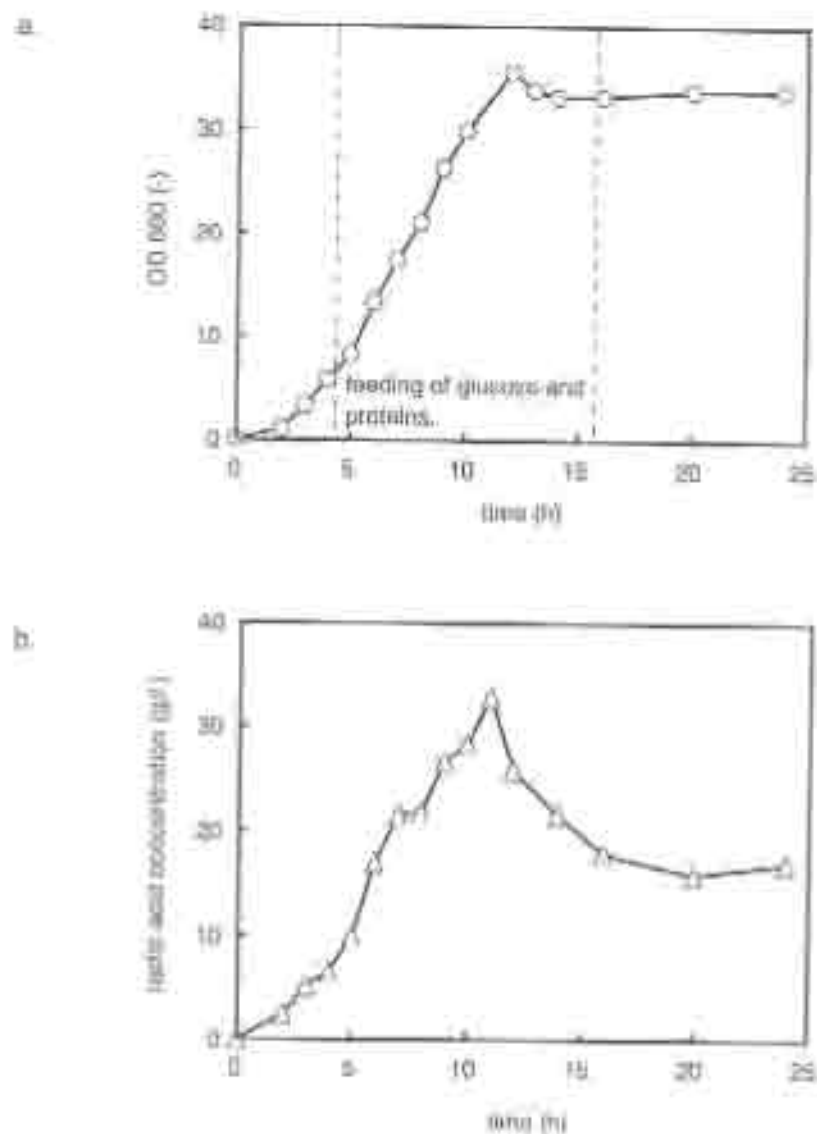
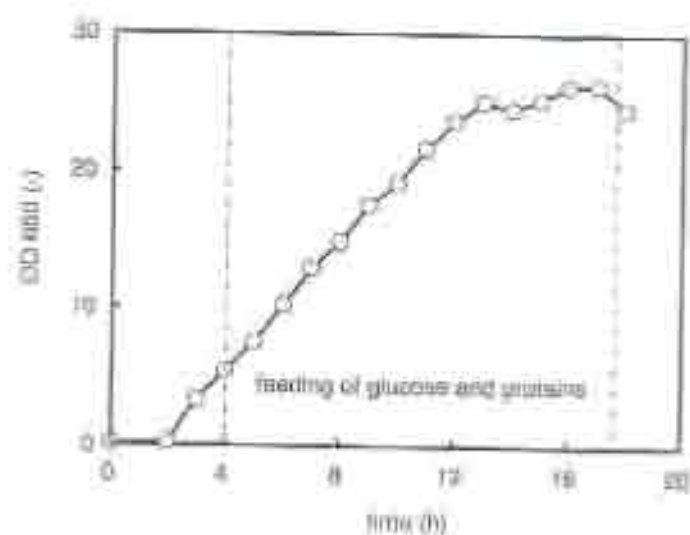


Fig. 27. Fed-batch cultivation at medium range of feeding rate: a) cell density, b) lactic acid formation.

ferro: Ferrappt. 14
 24 HCT aligned GFS

16.



17.

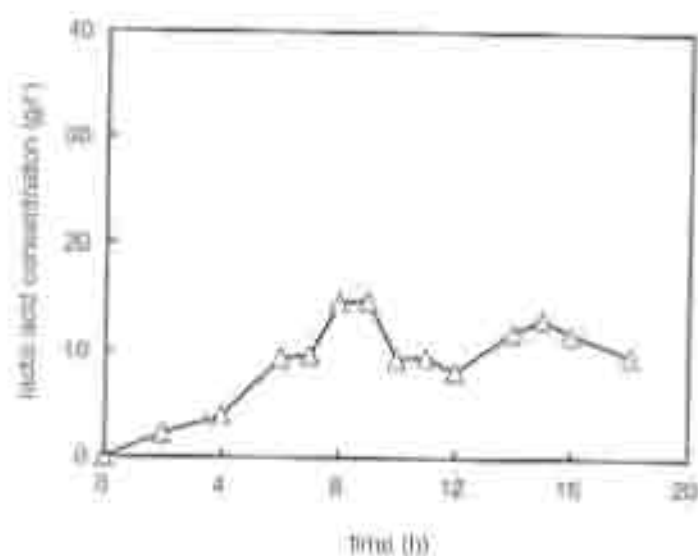


Fig. 28. Fed-batch cultivation using low range of feeding rate.
a) cell density. b) lactic acid formation.

Notes: Fermenter: 10
20% HCT (20% CPs)

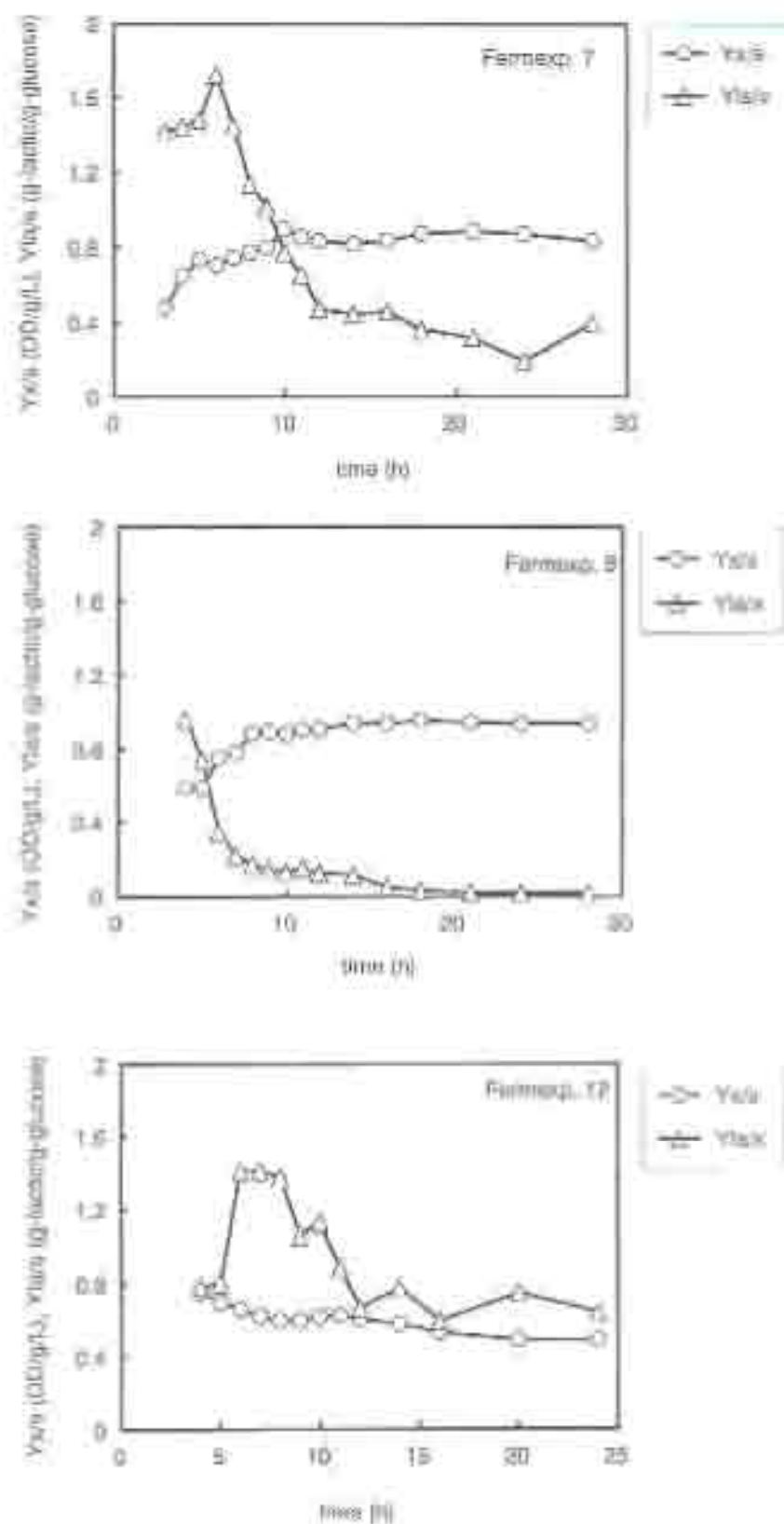


Fig. 26. Time course of growth yield ($Y_{x/s}$) and lactic acid production yield ($Y_{la/s}$) of various experiments.

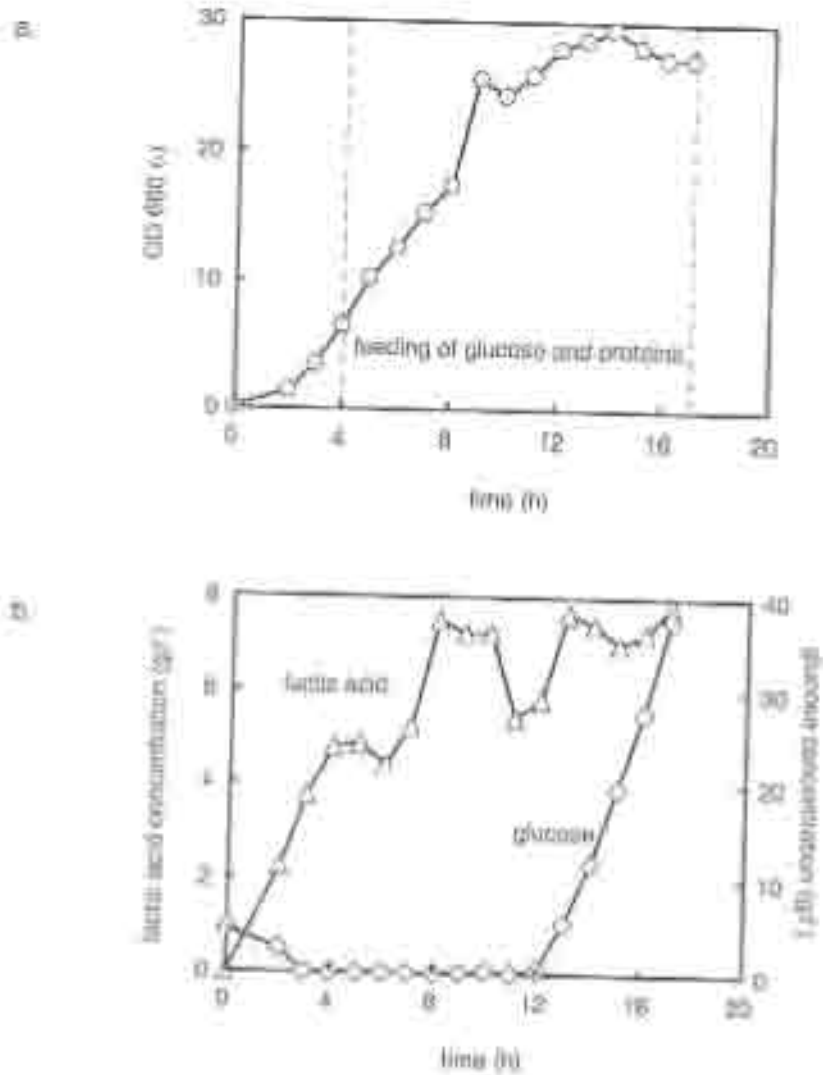


Fig. 30. Fed-batch cultivation by exponential feeding
a) cell density, b) lactic acid formation and glucose
concentration.

Figure: Fermenter, 18
18-11-10, 18-11-10, 18-11-10

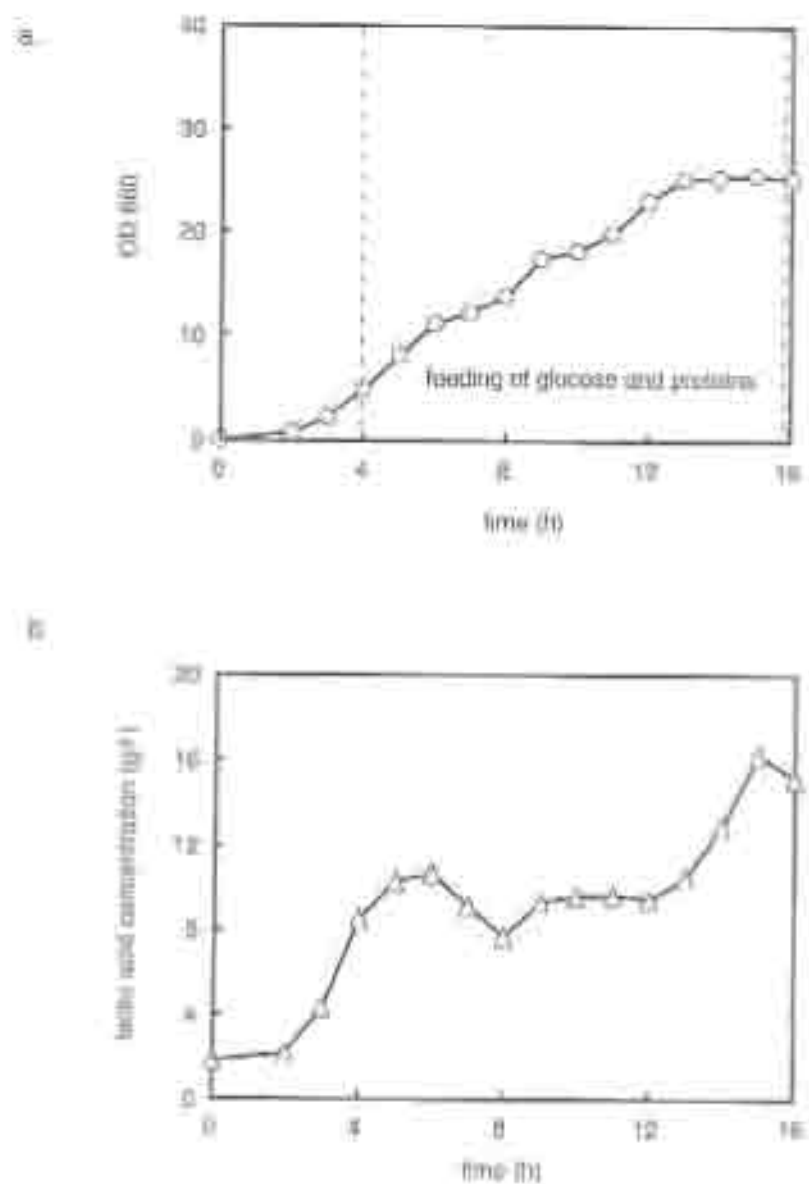


Fig. 31. Fed-batch cultivation by exponential feeding
a) cell density, b) lactic acid formation

Note: Fermentor: 38
3M HCl triggered DFB

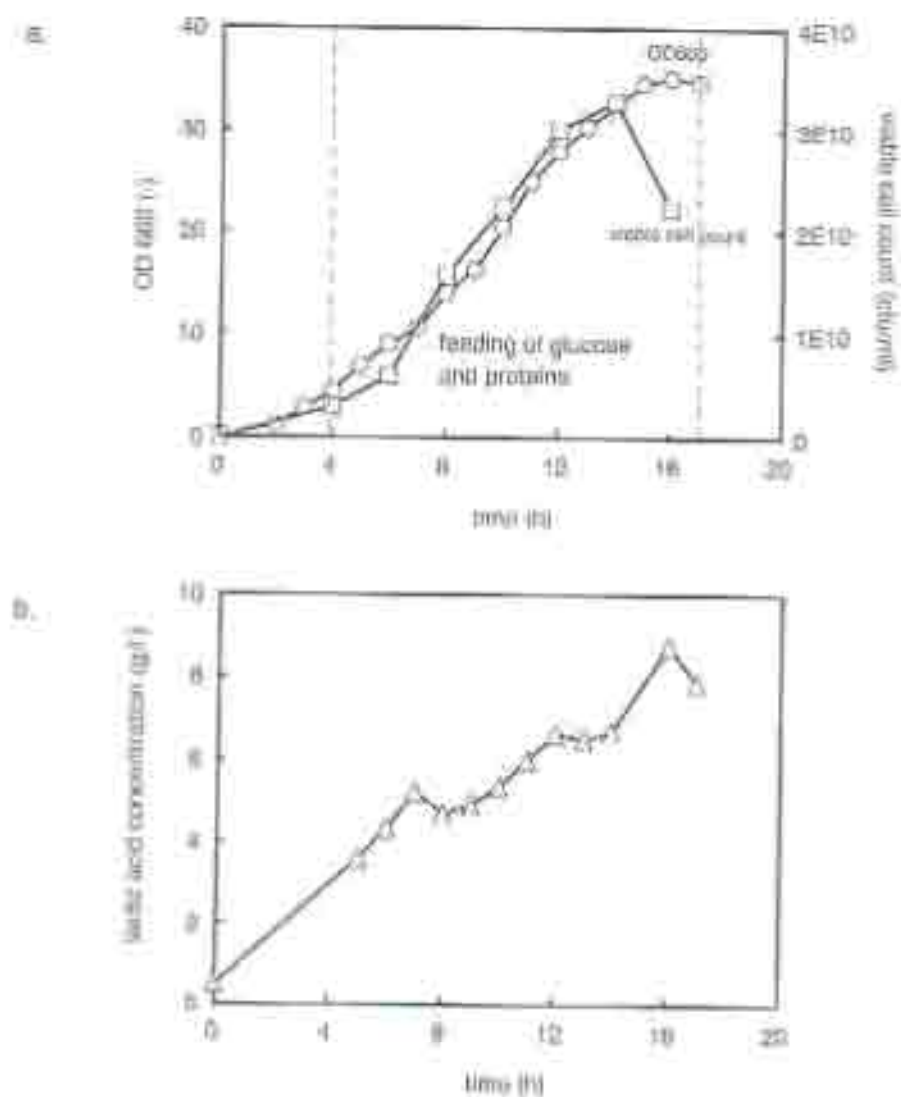


Fig. 32. Fed-batch cultivation by exponential feeding.
The DFS content in feeding protein sources was reduced by 1/2 and sterilised at 110 °C, 15 min.
a) cell density and viable cell count. b) lactic acid formation.

Notes: 1) 100 mg/l
2) 100 mg/l

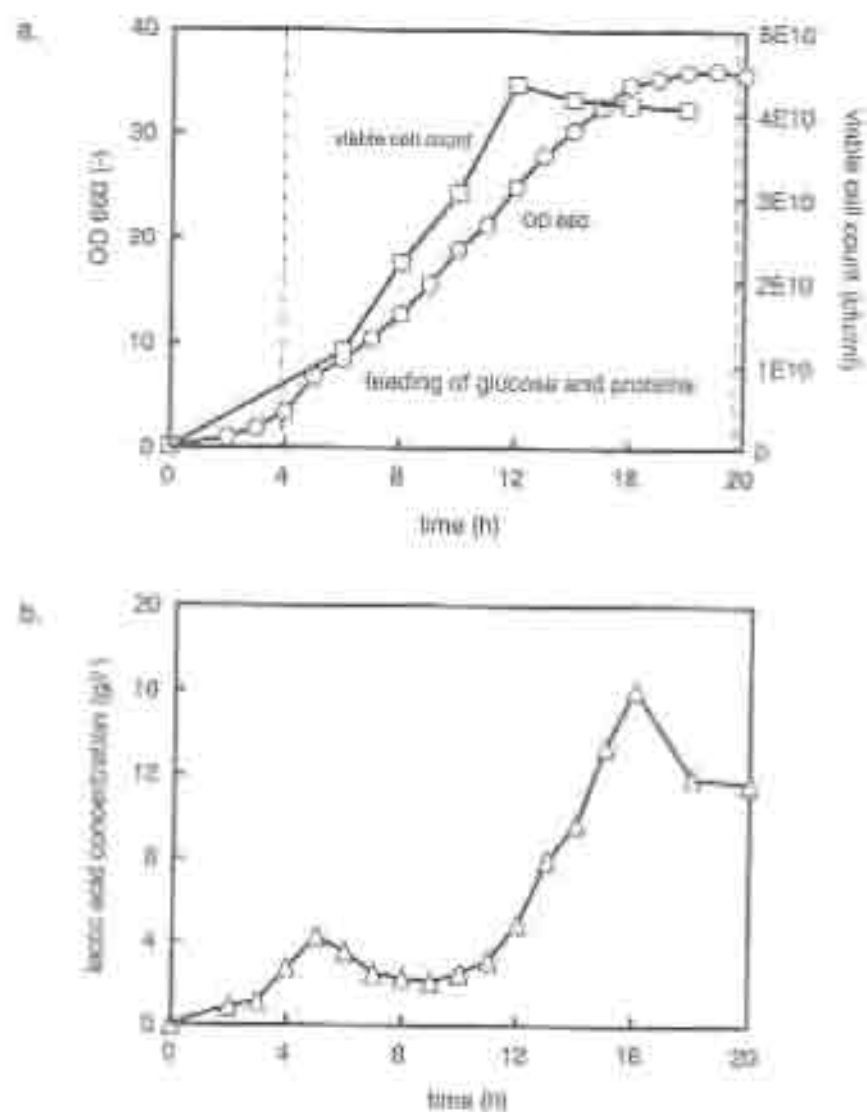


Fig. 33. Fed-batch cultivation by exponential feeding. The component of meat extract and tryptone in feeding proteins were reduced by half and separately sterilized at 121°C, 10 min.

Notes: Formsep. 08
08/10/2008 07:29

7. ผลงานที่ได้จากการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

7.1 การตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

จากผลงานการศึกษานี้สามารถเขียนเป็นผลงานทางวิชาการเพื่อส่งในวารสารวิชาการนานาชาติ ได้ 2 เรื่องตาม manuscript ในภาคผนวก คือ

1. Utilization of fish soluble protein for cell production of *Lactobacillus acidophilus* for probiotics use

อยู่ระหว่างการนำเสนอวารสาร World Journal of Microbiology & Biotechnology เพื่อกิจการนาถงตีพิมพ์

2. Application of fed-batch technique for high cell density cultivation of *Lactobacillus acidophilus*

กำลังจัดเตรียมเพื่อนำเสนอวารสาร Biotechnology letter หรือ Applied microbiology and Biotechnology

7.2 การนำเสนอผลงานทางวิชาการในการประชุมวิชาการ

ได้มีการนำเสนอผลงานทางวิชาการในการประชุมวิชาการนานาชาติในรูปแบบ Poster (ตาม Abstract ที่แนบมาในภาคผนวก) คือ

1. " Cultivation of High Cell Density of Lactic Acid Bacteria for Probiotics" นำเสนอที่การประชุม International Conference on Asian Network on Microbial Research ระหว่างวันที่ 23 - 25 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2541 ณ เมือง Yogyakarta ประเทศอินโดนีเซีย
2. " Utilization of complex proteinaceous sources for high cell density cultivation of *Lactobacillus acidophilus*"

นำเสนอที่การประชุม "The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999 and The 11th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology" ระหว่างวันที่ 15-18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2542 จังหวัดภูเก็ต

3. " Process Development for High Cell Density Cultivation of *Lactobacillus acidophilus* for Probiotics" นำเสนอที่ประชุม " International Conference on Asian Network on Microbial Researches" ระหว่างวันที่

29 พฤศจิกายน -1 ธันวาคม พ.ศ. 2542 จังหวัดเชียงใหม่

7.3 การผลิตบุคลากร

ได้มีการศึกษาในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทั้งระดับปริญญาตรีและโท : ทำร่วมภายใต้การดูแลในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

ระดับปริญญาตรี : น.ส.ดวงใจ พันธ์เพียร สำเร็จการศึกษาปี 2546 ภายใต้หัวข้อโครงงานปัญหาพิเศษ "Lactic acid bacteria production for probiotics : medium optimization"

ระดับปริญญาโท : น.ส.สุกัญญา แผล่เกี้ยว จะสำเร็จการศึกษาปี 2542 ภายใต้หัวข้อ
วิทยานิพนธ์ "Lactic acid bacteria production for probiotics : medium and process
optimization"

7.4 ความร่วมมือกับองค์กรอื่นทั้งภาครัฐและเอกชนในการเผยแพร่เทคโนโลยี ทางด้านการผลิตเชื้อจุลินทรีย์สำหรับ Probiotics

ได้มีโครงการความร่วมมือกับหน่วยงานต่างๆเพื่อประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้น
สำหรับการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม lactic acid bacteria ชนิดต่างๆที่สามารถใช้เป็น
Probiotics ได้เช่น

- โครงการ "การเพิ่มปริมาณชีวมวลของจุลินทรีย์ *Lactococcus pentosaceus* โดยทาง
ปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงและพัฒนาระบบการหมัก" ดำเนินการร่วมกับ ดร.พงษ์สุพา ผ่องขวัญ
ญา ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

- โครงการ "งานวิจัยและพัฒนาการผลิต probiotics และ enzyme phytase เพื่อใช้เสริม
ในอาหารไก่ไข่" ดำเนินการภายใต้ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยมหิดล โดยมี
ศาสตราจารย์ ดร.วิทยา มีบุญสม เป็นหัวหน้าโครงการ

ทางด้านการผลิตเชื้อจุลินทรีย์กรด lactic สำหรับเป็นหัวเชื้อในอุตสาหกรรม

- โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อนศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาการผลิตหัวเชื้อ
จุลินทรีย์กรด lactic เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตนมเปรี้ยว โดยความร่วมมือกับบริษัทในภาค
เอกชน

ภาคผนวก

Utilization of fish soluble protein for cell production of *Lactobacillus acidophilus* for probiotics use

Somchai Chanvatcharin, Sakunya Oaew, Donangjai Kanningpean and Amaret Bhanmiratana

Department of Biotechnology, faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd., Bangkok 10400, Thailand

With the aim of developing lactic acid bacteria production process, approaches of cell physiological control have been investigated to reduce the production of lactic acid, a growth inhibitor for cell production. It has been found that using protein from complex media instead of glucose in cultivation of *L. acidophilus* at aerobic conditions, resulted in fast growth and high cell density ($> 1.0 \times 10^8$ cfu/ml), while the lactic acid production could be reduced significantly. Fish soluble protein as cheap alternative source was recommended to replace the yeast extract for use as a complex media in the cultivation. It has been shown that the digestion of fish solubles by acid to achieve the optimal peptide size could improve the yield of *L. acidophilus*. However a growth inhibitory effect of salt, a by product produced during the digestion process occurred at salt concentration more than 1%(w/v).

Key words: [lactobacillus acidophilus, fish meal soluble, medium development, protein digestion]

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB), where most of the strains are generally recognized as safe (GRAS), have played important roles in production of many fermented food products. LAB has also been widely used as one of the components in formulation of "probiotics", a live microbial food supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance (1). The utilization of lactic acid bacteria in many products has led to requirements to develop an efficient and high productivity cultivation technique to produce active LABs as starter cultures or as products themselves. For the production of lactic acid bacteria, the major problem that causes low cell productivity is the growth inhibitory effect of the metabolic product, lactic acid (2-5). In order to improve the cell yield and concentration, two main approaches can be considered, one is utilizing extractive methods such as electrodialysis (6), ion-exchange adsorption (7) or solvent extraction (8) to remove the lactic acid continuously to a level that causes less effect on the cell growth. Another approach which has not often been mentioned is the physiological control of lactic acid metabolism to decrease its production. In this paper, *Lactobacillus acidophilus* strain which is commonly utilized for probiotics use (1) was studied. We investigated the approaches to reduce the lactic acid production by controlling of environmental conditions i.e. aeration and the development of medium which utilizes protein as an alternative complex carbon source for culturing the *L. acidophilus* at high cell density. Fish meal soluble as cheap proteinaceous sources was studied for their potential to be used as culture medium for industrial use. The modification of protein source was further investigated in order to improve the growth yield of *L. acidophilus*.

Materials and methods

Media and cultivation methods

Lactobacillus acidophilus was isolated from pig feces and identified according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. For preculture, the strain was cultivated in the De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) medium (Merck, Germany) at 37 °C for 12 h and then preserved in 30% glycerol and used as stock culture. When various medium formulations were investigated for their effects on bacterial growth and lactic acid production, MRS medium and its modified form in which glucose in the formulation was replaced by various carbon sources *i.e.* yeast extract, glycerol, molasses and fish meal soluble (obtained from a tuna canning factory, TC Union, Bangkok, Thailand). The fish meal soluble was either used as obtained from the factory or pre-digested with acid. The acid digested fish meal soluble was prepared as follows: The concentrated fish meal paste with total solid about 30% was mixed with 5N HCl at ratio of 1:1, the mixture was then heated up to 200 °C (the digestion time was started when the mixture was heated up) by a hot plate magnetic stirrer (Snijders Inc., the Netherlands). The digestion mixture was continuously stirred by magnetic bar to maintain homogeneity. After the required period of digestion, the digested product was neutralized to pH 7.0 using 5 N NaOH solution. The remained residual in finished products was removed by centrifugation at 6,000 rpm. The supernatant obtained was utilized as protein source for cultivation of *L. acidophilus*.

The organism was grown in shake flask at 200 rpm, 37 °C.

Analyses

Cell growth was estimated by both total plate count using MRS agar medium and spectrophotometric method measuring the OD at 660 nm (OD_{660}). *Residual sugar* was determined using the phenol-sulfuric method (9) and *glucose* was analyzed enzymatically by glucose assay kit purchased from Wako Pure Chemicals Co. Ltd., Osaka, Japan. *Volatile acids*, acetic acid and lactic acid, were determined by gas chromatography using 80/120 Carbopack™ B-DA*/4% CARBOWAX 20M with a column length of 1.5 m. Temperature in the column chamber was controlled at 190 °C and injection port as well as detector temperature were both maintained at 210 °C. *Total nitrogen* (TN) was determined by Kjeldahl's method using automated total nitrogen analyzer (1024 Kjeltac®System, Tecator AB, Sweden) according to the instructions of the manufacturer. *Amino nitrogen* (AN) was analyzed by formal titration method (10) using glycine as a control.

Results and Discussion

Effect of carbon source on growth and lactic acid production

2% (w/v) of Glucose, molasses (prepared according to total sugar basis), glycerol and yeast extract were used as carbon source for the cultivation. As shown in Table 1, among the carbon sources those were used, yeast extract was found to be the best complex carbon source which gave a maximum viable count of 2×10^8 cfu/ml but minimum lactic acid production (0.5 g/l). For the medium using glucose and molasses, there were shown that the viable counts were rather low compared to that of yeast extract, which might be due to the inhibitory effect of produced lactic acid, and also the result of that of molasses showed slightly lower viable count compared to the

result with glucose this would be due to other effects of other inhibitors presented in molasses. The results with glycerol showed the lowest cell count which imply the difficulty of glycerol assimilation by *L. acidophilus* used in the study.

According to the results shown above, it appeared that, when the yeast extract was supplied as carbon source instead of glucose, the main components of yeast extract, i.e. free amino acids (utilized directly) and peptides (first digested by the proteolytic system) (11-13), could enter the cell metabolism through the TCA cycle (14). Compared with the cultivation using glucose, this would cause a decrease in lactic acid production of bacteria since the main carbon flow by-passes glycolysis metabolism (where pyruvate was converted to lactate) to TCA cycle. However the utilization of yeast extract as carbon source still could not completely prevent the production of lactic acid due to two possibilities, firstly from sugars contained in yeast extract and secondly from some amino acids that can be converted to pyruvate and then to lactic acid. The analysis of total sugar in yeast extract showed a good correlation between its consumption and lactic acid production in both time course and molar balance (data not shown). This suggested that lactic acid production may occurred mainly due to sugar consumption.

Effects of aeration on growth and lactic acid production

The effects of aeration on growth and lactic acid production were investigated using glucose and yeast extract as carbon sources by comparing flask cultivation with and without shaking. As shown in Fig. 1, in case of glucose the results of growth and lactic acid production were not significantly different under different growth conditions, meanwhile, growth on yeast extract under shaking conditions, resulted in

an increase in cell growth yield, whereas the lactic acid concentration was lower when the culture was shaken. It had also found that in case of continuous shaking, lactic acid that was produced at the beginning of the cultivation was utilized again. On the other hand, in case of non shaken flasks the lactic acid produced was not re-utilized. The phenomena which have been mentioned above could be confirmed in other experiments using higher concentrations of yeast extract (data not shown).

The effect of oxygen on the growth of lactic acid bacteria has been mentioned previously (15-19). For some lactic acid bacteria oxygen is toxic, due to the accumulation of toxic oxygen derived compounds that affect the growth (15). Several strains of lactic acid bacteria (*Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*) show better growth yield in aerobic conditions (16-18). It has been reported that heterofermentative *Leuconostoc mesenteroides* was able to regenerate NAD(P)^+ by NADH oxidase and then the ethanol branch of the heterolactic pathway was not used. Instead, acetyl-phosphate was converted to acetate yielding ATP with a consequent increase in biomass (19). In the condition when the NADH was directed to NAD^+ by NADH oxidase, the reduction of NADH level would result in the reverse reaction of lactate to pyruvate via the coupling of NAD^+ . This could be an explanation for the consumption of lactate during the aerobic cultivation in this study. It should be also noted that the acetate level increased during the growth under aerobic conditions (data not shown). According to the reports and results mentioned above it could be hypothesized that the *L. acidophilus* strain used in this study might have a similar activity of NADH oxidase for NADH regeneration.

Cultivation of Lactobacillus acidophilus using yeast extract at various concentration as sole carbon source

Further investigation of cultivation using higher yeast extract concentrations demonstrated that cell density as well as viability could be improved by increasing the yeast extract content and the trend was linear (Fig. 2). The result implied the growth limitation might be due to nutrient limitation. The results also implied that the cell density of lactic acid bacteria could be further increased by supplied higher amounts of yeast extract. Lactate analysis of broth culture using different concentrations of yeast extract showed that in all cases, the final lactic acid concentration was rather low (less than 0.5 g/L, data not shown) even though a high amount of yeast extract used. This might be due to the fact that the lactate those was produced by consumption of sugars in yeast extract during the beginning of cultivation period was later re-utilized to low level.

Alternative proteinaceous sources for Lactobacillus acidophilus cultivation

Although yeast extract proved to be a good carbon source for the high cell density cultivation of *L. acidophilus*, in view of the relatively high cost of yeast extract, it might be desirable to find alternative raw materials. In this study we have investigated another source of protein which was considered to be much cheaper than yeast extract. Fish meal soluble protein with and without pretreatment by acid digestion was used to replace total yeast extract content in the medium, and then was tested for the potential to support the growth of *L. acidophilus*. The result showed that digested fish soluble protein could provide cell yield even higher than that of yeast extract (2% w/v) at equal total nitrogen content, whereas the non-digested fish soluble poorly support the

growth (Fig. 3a). Further supplement of non digested fish soluble can improve the cell density proportionally but the effect was different for digested fish soluble at higher concentrations which caused slow growth (Fig. 3b). The phenomenon of slow growth of *L. acidophilus* at higher concentrations of digested fish soluble was considered as an inhibition effect. Since in the acid digestion process by HCl, a lot of salt (approximately 30 %w/v) was obtained during the neutralization step, the effect of salt concentration was investigated. It was found that growth inhibition of *L. acidophilus* by salt was pronounced when the salt concentration exceeded 1% w/v (Fig. 4). The growth yields obtained when yeast extract and fish soluble were utilized as complex carbon source are summarized in Table 2. It could be concluded that the digested fish soluble could support good growth of *L. acidophilus* and the extend of growth was slightly higher than with yeast extract. Although the utilization of digested fish soluble at high concentration resulted in a growth inhibition effect due to the high salt concentration, the cost for FS was low as compared with yeast extract (less than 1/10 of commercial yeast extract price on equal weight basis). The improvement of the digestion process to reduce the salt formation is currently under investigation, and removal of salt might be done by electrodialysis. Thus the utilization of digested fish soluble showed a high potential for LAB cultivation.

Modification of protein source for optimal growth of Lactobacillus acidophilus

According to the results mentioned above, the degree of protein digestion which is related to the peptide size distribution, showed an effect on the growth yield of *L. acidophilus*. Further study for the optimal degree of digestion for fish soluble protein was conducted. Fish soluble was digested by HCl to get digested fish soluble protein

with various AN/TN ratios (Fig. 5), which were then used to cultivate *L. acidophilus* for comparison of the growth yield. As shown in Fig. 6, the growth yields obtained from the culture using digested fish soluble proteins were higher than those of 2% yeast extract and much higher than non-digested fish soluble protein. The 30 minutes digested fish soluble protein which has an AN/TN ratio of 0.5 was shown to have the highest growth yield. By calculation based on average nitrogen in amino acids, and an AN/TN ratio of 0.5, it was considered to contain mainly di-peptides and free amino acids. It should be noted that the AN/TN ratio could be used for rough estimation or control of protein quality for digestion, even though optimal AN/TN ratio would be dependent on type and basic composition of protein. From the results shown in Fig. 6, fish soluble digested for 5 h has a AN/TN ratio of about 0.7 (which implies that it contains mainly free amino acids), poorly supported the growth of *L. acidophilus* compared with lower AN/TN ratio's (at shorter digestion time and considered to contain more di-, tri-, and larger peptides). The results coincide with a previous report that growth of some lactic acid bacteria depends more on oligopeptides than free amino acids as nitrogen source (20). For *Lactococcus lactis* growth on complex protein sources, the proteolytic system which includes a cell envelope-located proteinase and several peptidases located intracellularly was considered to play a crucial role (11, 12). It has been found that more than 100 different oligopeptides could be obtained according to the cleavage of peptide bonds by cell enveloped proteinase, ProP in *Lactococcus lactis* (21). Further study revealed that only certain type of peptides could be taken up and hydrolyzed internally by peptidases to amino acids (20). In this study, the digestion of fish soluble protein to a certain degree would provide appropriate size of oligopeptides (di-, tri- peptide) which could be

taken up by the cell. It was reported by Konings *et al.* (22) that the uptake of peptides would require the same amount of ATP as that of free amino acids, thus the uptake of peptides would be preferable in term of bioenergetics and this could provide a higher growth yield. Although the protein source was shown to be a potential carbon source for high cell density cultivation of *L. acidophilus*, it should be noted that the overall consumption of protein for growth was low (overall total nitrogen consumed was less than 20%, detailed data not presented). This result was in full agreement with a previous report which claimed that in case of *Lactococcus lactis* grown on casein, only few types of peptides can be utilized (20). The reason for the low efficiency in peptide utilization might be due to several factors such as the complexity of peptides, size exclusion limits of oligopeptide transporter, competition of the peptides for entry via a single oligopeptide transport system and hydrophobicity of peptides (20).

All protein sources (fish soluble, meat extract and tryptone) used in the medium were also studied for the efficiency in growth stimulation and were compared on the basis of equal TN using modified MRS medium. It was shown that meat extract can dramatically stimulate the growth of *L. acidophilus*. The addition of free amino acids (essential amino acids plus tryptophan) as well as vitamins (seven types of vitamin those has been reported to be essential for LAB (23, 24)) to the fish soluble could not substitute for meat extract to promote the growth (data not shown). It has been mentioned elsewhere that a small peptide (with MW of 1065) from freshly prepared yeast extract was a growth stimulant for *Lactobacillus sanfrancisco* (25). According to the results, some oligopeptides in meat extract should be further studied and characterized for their essential role as growth stimulants.

Conclusion

In order to increase the growth yield of lactic acid bacteria, the inhibitory effect of lactic acid has to be reduced. In this study we have investigated the possible strategies to control the lactic acid bacterial metabolism for reducing the lactate formation. It was found that cultivation at aerobic conditions coupled with using protein as alternative complex carbon source, promotes the growth of *L. acidophilus* very well, while the lactic acid production could be reduced significantly. Further study showed that protein with optimal degree of digestion could improve the cell yield. Although when protein was used, the efficiency of protein utilization was rather low compared with glucose, a better understanding of the proteolytic system and peptide transportation mechanism in LAB would lead to improvement in the efficiency of protein utilization and cell growth yield. Also the development of protein digestion processes with less salt formation, would allow the use of higher concentrations of digested protein, and thus increased cell density. According to the results from this study, it might be possible to apply the technique for other strains of lactic acid bacteria which has similar characteristics as *L. acidophilus* for the high cell density cultivation.

Acknowledgments

The authors thank Center of Biotechnology, Mahidol University for providing the gas chromatography facilities for volatile acid analysis. Special thank to Dr. Cornel Vordya for critical discussions and helpful suggestions. This study was financially supported by grant-in-aid from Thailand Research Fund (TRF) under Post Doctoral Fellowship Programme, PDP-33-2540.

References

1. Fuller, R.: History and development of probiotics, p.1-9. *In* Fuller, R. (ed.), *Probiotics: The scientific basis*. Chapman & Hall press, London (1992).
2. Pirt, S. I.: Effect of chemical inhibition and activation of growth, p. 179-185. *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1985).
3. Gatje, G. and Gottschalk, G.: Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 446-449 (1991).
4. Ohara, H., Hiyama, K., and Yoshida, T.: Kinetics of growth and lactic acid production in continuous and batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 544-548 (1992).
5. Ohara, H., Hiyama, K., and Yoshida, T.: Kinetics study of pH dependence of growth and death of *Streptococcus faecalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 403-407 (1992).
6. Hongo, M., Numura, Y., and Iwahara, N.: Novel method of lactic acid production by electrodialysis fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 314-319 (1986).
7. Srivastava, A., Roychoudhury, P. K., and Sahai, V.: Extractive lactic acid fermentation using ion-exchange resin. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 607-613 (1992).
8. Lazárova, Z. and Peeva, L.: Solvent extraction of lactic acid from aqueous solution. *J. Biotechnol.*, **32**, 75-82 (1994).

9. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
10. Taylor, M.: Formol titration: an evaluation of its various modifications. *Analyst*, **82**, 483-498 (1957).
11. Smit, E. J., Plapp, R., and Konings, W. N.: Peptide uptake is essential for growth of *Lactococcus lactis* on the milk protein casein. *J. Bacteriol.*, **171**, 6135-6140 (1989).
12. Pritchard, G. G. and Coolbear, T.: The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 170-206 (1993).
13. Kok, J. and W. M. de Vos.: The proteolytic system of lactic acid bacteria. p.169-210. *In* M.J. Gasson and W.M. de Vos (eds.), *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. Blackie Academic and Professional, Glasgow (1994).
14. Kramer, R. and Sprenger, G.: Metabolism. p.90-93. *In* Rehm, H.-J. and Reed, G. (eds.), *Biotechnology*, vol.2, 2nd Ed., VCH, Weinheim (1993).
15. Condon, S.: Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 269-280 (1987).
16. Blickstad, E. and Molin, G.: Growth and lactic acid production of *Pediococcus pentosaceus* at different gas environments, temperatures, pH values and nitrite concentrations. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 170-174 (1981).
17. Murphy, M. G. and Condon, S.: Comparison of aerobic and anaerobic growth of *Lactobacillus plantarum* in a glucose medium. *Arch. Microbiol.*, **138**, 49-53 (1984).

18. Borch, E. and Molin, G.: The aerobic growth and product formation of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix*, and *Carnobacterium* in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 81-88 (1989).
19. Lacey, C. A. and Condon, S.: Active role of oxygen and NADH oxidase in growth and energy metabolism in *Leuconostoc*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 1789-1796 (1986).
20. Julliard, V., Le Bars, D., Kunjl, R.S. E., Konnings, W. N., Gripon, J-C., and Richard, J.: Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3024-3030 (1995).
21. Julliard, V., Lann, H., Kunjl, F.R.S., Jeroolimus-stratingh, C. M., Bruins, A.P., and Konings, W.N.: The extracellular P₁-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *J. Bacteriol.*, **177**, 3472-3478 (1995).
22. Konings, W.N., Poolman, B., and Driessen, A.J.M.: Bioenergetics and solute transport in lactococci. *Crit. Rev. Microbiol.*, **16**, 419-476 (1989).
23. Mickelson, M.N.: Glucose degradation, molar growth yields, and evidence for oxidative phosphorylation in *Streptococcus agalactiae*. *J. Bacteriol.*, **109**, 96-105 (1972).
24. Jensen, P. R. and Hammer, K.: Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. Env. Microbiol.*, **59**, 4363-4366 (1993).
25. Berg, R.W., Sandine, W.E., and Anderson, A.W.: Identification of a growth stimulant for *Lactobacillus sanfrancisco*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 786-788 (1981).

Table 1. Cultivation of *Lactobacillus acidophilus* using various carbon sources at 2% w/v.

Carbon source ¹	Total viable count (cfu/ml)±SD ²	Lactic acid (g/l)
Glucose (MRS)	1.24±0.17x10 ⁸	5.8
Molasses ³	7.22±0.21x10 ⁸	5.5
Glycerol	4.82±0.20x10 ⁸	ND ⁴
Yeast extract	2.32±0.14x10 ⁸	0.5

¹Modified MRS medium by substituting the glucose with mentioned carbon sources.

²Standard deviation of duplicated data.

³prepared according to a basis of equal total sugar with 2% glucose.

⁴ND is not determined.

Table 2. Comparison of the cell yield obtained by using different types of complex media¹.

Complex media	Cell density, OD _{600nm}	Ratio of OD _{600nm} /TN	AN/TN ²
2% Yeast extract	2.03	9.38	0.64
Non digested fish soluble protein	0.50	2.33	0.26
10 h Acid digested fish soluble protein	2.52	11.72	0.70

¹The medium used was MRS media where glucose was substituted by each complex media prepared at equal total nitrogen (TN) of 0.22 % (w/v).

²Ratio of amino nitrogen and total nitrogen of the complex media.

Figure captions

Fig. 1. Cultivation of *L. acidophilus* using glucose or yeast extract as media. (a) Time course of growth and (b) lactic acid production. Symbols: $\circ$, 2% glucose; Δ , 2% yeast extract. Open and filled symbols denote shaken and non-shaken conditions, respectively.

Fig. 2. Effect of yeast extract concentration on growth of *L. acidophilus*. Symbols: $\circ$, maximal OD_{600} ; Δ , maximal viable cell count.

Fig. 3. Growth of *L. acidophilus* using complex medium of yeast extract and fish soluble protein. (a) 2% (w/v) of yeast extract in comparison with fish soluble protein and (b) 4 and 8% of fish soluble protein. Symbols: $\square$, yeast extract; $\circ$; Δ ; $\diamond$, fish soluble at 2, 4 and 8%, respectively. For fish soluble protein, open and filled symbols denote non-digested and digested, respectively. The medium of 2, 4 and 8% FS were prepared on the basis of equivalent total nitrogen to those of 2, 4 and 8%(w/v) of yeast extract.

Fig. 4. Effect of salt concentration on growth of *L. acidophilus* in MRS medium. Symbols: $\circ$; Δ ; $\diamond$; $\square$, NaCl concentration at 1, 2, 3 and 4%(w/v), respectively.

Fig. 5. Time course of AN/TN ratio in digestion of fish soluble with HCl.

Fig. 6. Growth of *L. acidophilus* in fish soluble digested for various time. Symbols: ●, 2%(w/v) yeast extract; ×, non-digested fish soluble; ◇; ○; □; Δ; ○, fish soluble digested at 10 min., 30 min., 1 h., 3 h. and 5 h., respectively. All medium was adjusted to have equal total nitrogen content.

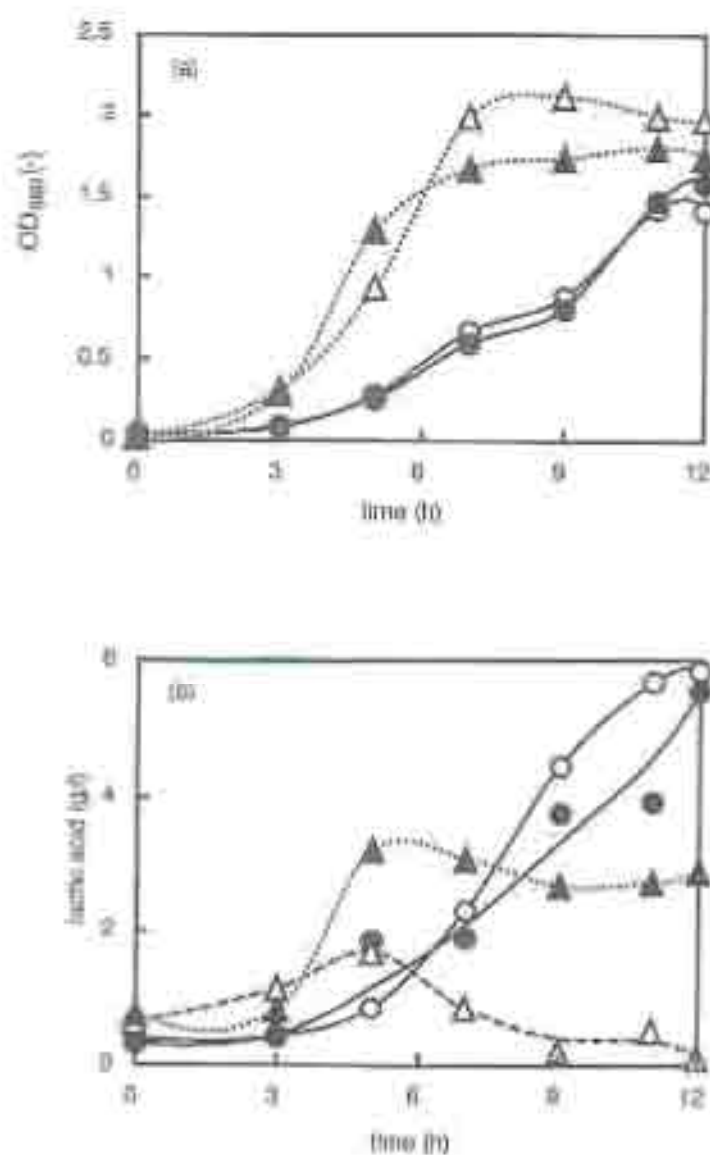


Fig. 1. Cultivation of *L. acidophilus* using glucose or yeast extract as media. (a) Time course of growth and (b) lactic acid production. Symbols: ○, 2% glucose; △, 2% yeast extract. Open and filled symbols denote shaken and non-shaken conditions, respectively.

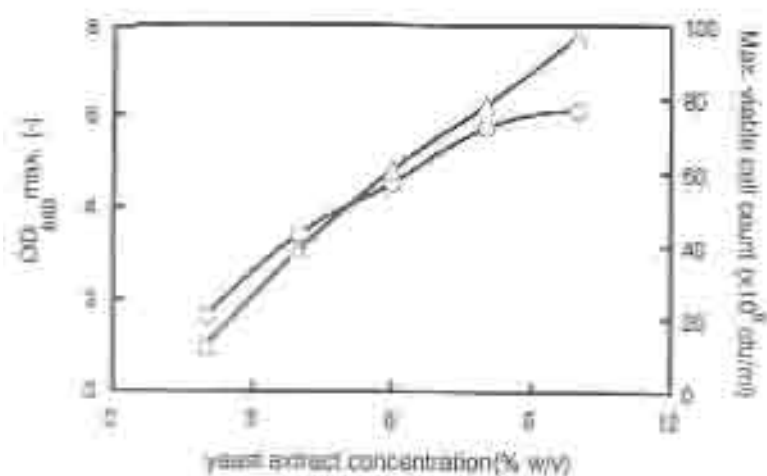


Fig. 2. Effect of yeast extract concentration on growth of *L. acidophilus*.
 Symbols: $\bigcirc$, maximal OD 660, Δ , maximal viable cell count.

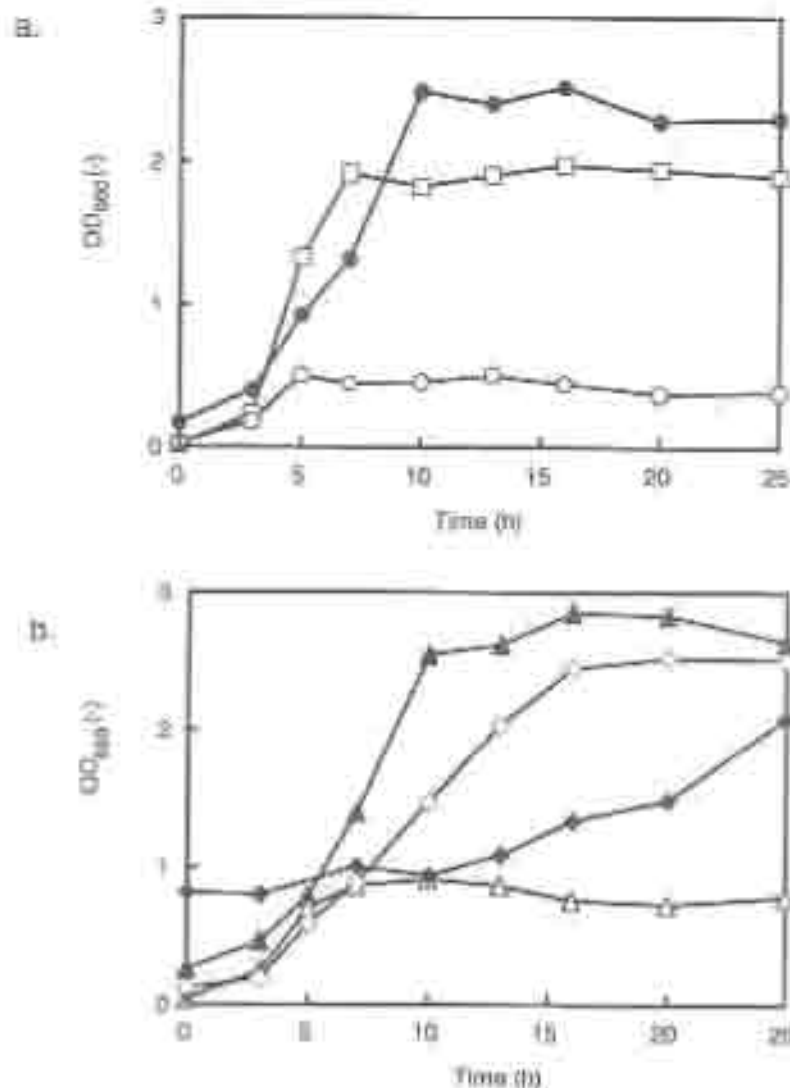


Fig. 3. Growth of *L. acidophilus* using complex medium of yeast extract and fish soluble protein. (a) 2% (w/v) of yeast extract in comparison with fish soluble protein and (b) 4 and 8% of fish soluble protein. Symbols: □, yeast extract; ○, △, ◇, fish soluble at 2, 4 and 8% respectively. For fish soluble protein, open and filled symbols denote non-digested and digested, respectively. The medium of 2%, 4% and 8% FS were prepared on the basis of equivalent total nitrogen to those of 2%, 4% and 8% (w/v) of yeast extract.

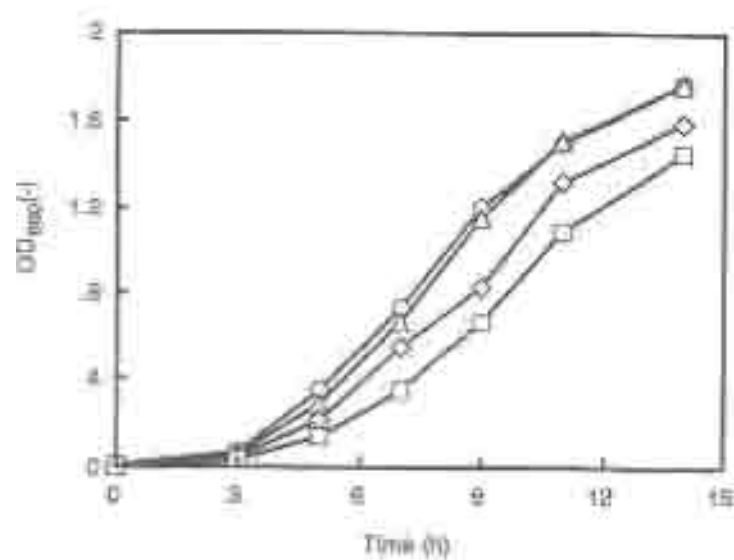


Fig. 4. Effect of salt concentration on growth of *L. acidophilus* in MRS medium. Symbols: ○, △, ◇, □, NaCl concentration at 1%, 2%, 3% and 4% (w/v), respectively.

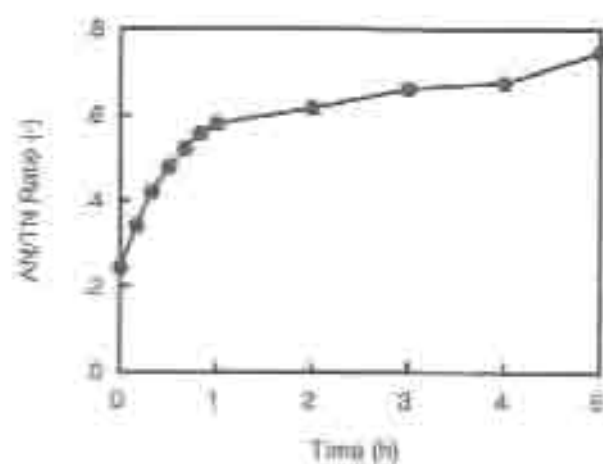


Fig. 5. Time course of AN/TN ratio in digestion of fish soluble with HCl.

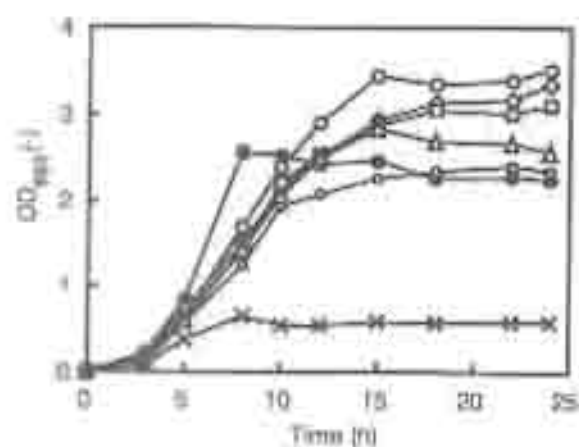


Fig. 6. Growth of *L. acidophilus* in fish soluble digested for various time. Symbols: ●, 2% (w/v) yeast extract; ×, non-digested fish soluble; ○, □, △, ◇, ▽, fish soluble digested at 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, and 5 h, respectively. All medium was adjusted to have equal total nitrogen content.

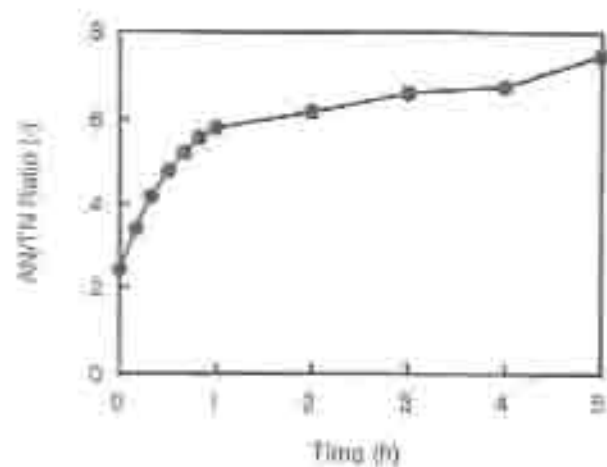


Fig. 5. Time course of AN/TN ratio in digestion of fish soluble with HCl.

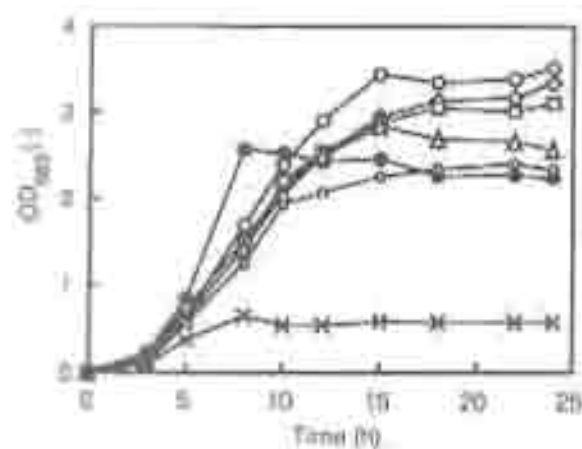


Fig. 6. Growth of *L. acidophilus* in fish soluble digested for various time. Symbols: ●, 2% (w/v) yeast extract; ×, non-digested fish soluble; ○, □, △, ◇, ▽, fish soluble digested at 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, and 5 h, respectively. All medium was adjusted to have equal total nitrogen content.

Cultivation of High Cell Density of Lactic Acid Bacteria for Probiotics

Deuangjai Kanungpean, Sukanya Oaew and Somchai Chaisvatcharni
*Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI
Rd., Bangkok 10400, Thailand*

In the production of lactic acid bacteria which is one of the major microorganisms being used for probiotics, main problem that cause the lowest cell productivity is the growth inhibitory effect of lactic acid. In order to improve the cell growth yield several approaches could be considered in order to reduce the inhibitory effect of lactic acid. In this study we investigated strategies to decrease the production of lactic acid through the use of metabolic controls in lactic acid bacteria. We investigated the effect of various of carbon sources for cultivation and aeration effect on the growth yield and lactic acid production. The result showed that by using yeast extract as sole carbon source the growth yield could be increased (with final viable count of more than 10^{11} cfu/ml) for more than 10 folds compare to normal cultivation using glucose as carbon source, while the lactic acid production was significantly decreased. The aeration accompanied with using yeast extract could improved the growth yield and also cause the produced lactic acid to be re-utilized. The results of fed-batch cultivation using yeast extract feeding coupling with aeration showed that the lactic acid concentration can be controlled at low level. The proposed strategy show the potential to be applicable with high cell density cultivation of other lactic acid bacteria.

Utilization of complex proteineous sources for high cell density cultivation of *Lactobacillus acidophilus*

Sudanya Osaw, Somsai Chauratcharn, Doungjai Kamingpean and Anaret Rhrumiratanu.
Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd, Bangkok
10400, Thailand.

In lactic acid bacteria production, to improve the cell growth and obtain high cell density, the effect of produced lactic acid have to be minimized. In this study, strategy in which the metabolism control to reduce the production of lactic acid have been investigated. We have studied the effect of proteineous sources on the growth yield and lactic acid production of *Lactobacillus acidophilus*. The result showed that using protein source such as yeast extract as carbon source, high cell growth (upto 8×10^8 cfu/ml) could be obtained proportionally to amount of protein addition while the lactic acid level was low (< 0.5 g/L under aeration condition). The improvement of cell growth was considered to be due to less inhibition effect of lactic acid compared with the cultivation using glucose as carbon source where the lactic acid concentration was more than 4.5 g/L. However, due to the high cost of yeast extract, various protein sources were investigated for their potential to use as culture medium for industrial production. It was found that fish soluble extract which was pre-digested by acid provided 1.5 times higher growth yield than that obtained from yeast extract, base on equal total nitrogen.

Process Development for High Cell Density Cultivation of *Lactobacillus acidophilus* for Probiotics

SOMCHAI CHAUVATCHARIN, SUKANYA OAEW AND AMARET BHUMIRATANA
Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd., Bangkok
10400, Thailand FAX: +66-2-246-3026, E-mail: scscv@mahidol.ac.th

SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB), where most of the strains are generally recognized as safe (GRAS), have been widely used in production of many fermented food products. It has also been utilized as one of the components in formulation of "probiotics", a live microbial food supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance. In lactic acid bacteria production, to improve the cell growth and obtain high cell density, the effect of produced lactic acid have to be minimized.

In this study, strategies in which the metabolism control to reduce the production of lactic acid have been investigated. Firstly, We have studied the effect of proteinaceous source on the growth yield and lactic acid production of *Lactobacillus acidophilus*. The result showed that using protein source such as yeast extract as alternative carbon source, high cell growth (upto 8×10^8 cfu/ml) could be obtained proportionally to amount of protein addition while the lactic acid level was low (< 0.5 g/L under aeration condition). The improvement of cell growth was considered to be due to less inhibition effect of lactic acid compared with the cultivation using glucose as carbon source where the lactic acid concentration was more than 4.5 g/L. It was also found that fish soluble extract as alternative protein source which was pre-digested by acid provided 1.5 times higher growth yield than that obtained from yeast extract, base on equal total nitrogen. However the analyses of protein indicated that protein consumption was less efficient compare with that of glucose (only upto 15 % of total nitrogen). So secondly fed-batch cultivation of glucose and protein source was further investigated in order to improve the cell production yield. The results showed that higher cell density (upto 2.0×10^{10} cfu/mL) could be obtained by fed-batch technique while the level of lactic acid concentration could be controlled by limitation of glucose supply. The fed-batch study indicated that continuous feeding of both sugar and protein is required for high cell density cultivation of *L. acidophilus*.

The result from this study showed the potential trend to apply the technique for high cell density cultivation of other lactic acid bacteria.

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB), where most of the strains are generally recognized as safe (GRAS), have been widely used in production of many fermented food products. It has also been utilized as one of the components in formulation of "probiotics", a live microbial food supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance (1). For lactic acid bacteria production, the major problem is the growth inhibitory effect of the metabolic product, lactic acid (2). To solve this problem, the physiological control of lactic acid bacteria metabolism to reduce its production could be considered. In this paper, *Lactobacillus acidophilus* strain which is commonly utilized for probiotics was studied. With the aim of high cell density cultivation. Firstly, the lactic acid production has been controlled by medium which utilizes protein as an alternative complex carbon source. Different sources of protein have been studied for their suitability in term of efficiency and

