11 JUL 2000

PROCESS DEVELOPMENT FOR BIOMASS PRODUCTION OF *ENTEROCOCCUS FAECIUM* FOR PROBIOTICS USE

SUKUNYA OAEW

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY) FACULTY OF GRADUATE STUDIES MAHIDOL UNIVERSITY

2000
ISBN 974-663-802-5

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright © Mahidol University

TH
Sg46p
2000 44557 c.2

4036487 SCBT/M : MAJOR: BIOTECHNOLOGY; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS :PROBIOTICS/ *ENTEROCOCCUS FAECIUM*/ HIGH CELL DENSITY/ LACTIC ACID BACTERIA/ FISH SOLUBLES/ WHEY PROTEIN/ FED-BATCH CULTIVATION/ GROWTH INHIBITION/ BROWNING REACTION PRODUCT

SUKUNYA OAEW: PROCESS DEVELOPMENT FOR BIOMASS PRODUCTION OF *ENTEROCOCCUS FAECIUM* FOR PROBIOTICS USE. THESIS ADVISORS: SOMCHAI CHAUVATCHARIN, Ph.D., AMARET BHUMIRATANA, Ph.D., APINYA ASSAVANIG, Ph.D. 123 p. ISBN 974-663-802-5

In order to develop high cell density cultivation of *Enterococcus faecium* for probiotics use, the growth inhibitory effect of lactic acid should be reduced. With the aim of controlling lactic acid formation, the effects of protein as a C-source and aeration conditions on cell growth and lactic acid production were investigated. It was found that protein supplementation as a C-source, coupled with aeration promoted good cell growth and efficiently reduced lactic acid production. Furthermore, it was observed that protein digestion improved the cell growth yield. For industrial scale cell production, medium containing digested fish solubles and whey was successfully developed to replace costly meat extract, tryptone and yeast extract that were present in the original MRS medium used. However, the utilization of protein as the sole C-source was less efficient than when it was combined with sugar supplementation. Although the cell growth yield could be improved by sugar utilization, lactic acid formation due to excess sugar supply had to be avoided. To achieve this, a fed-batch technique was applied to limit the protein and sugar supply and thus control lactic acid formation. The maximum cell density obtained in the fed-batch cultivation was 4.3×10^{10} cfu/ml, which was 7 times higher than that obtained by batch cultivation. However, a leveling off of cell viability was observed when the fed-batch culture reached a high cell concentration. The results also suggested that Browning reaction products formed during the sterilization of high protein media may have a major inhibitory effect on cell growth. In addition, cell viability was much improved in the presence of low quantities of Browning reaction products.

4036487 SCBT/M : สาขาวิชา: เทคโนโลยีชีวภาพ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

สุกัญญา แซ่เอี๊ยว : การพัฒนากระบวนการผลิตชีวมวลจุลินทรีย์แลคติคสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* สำหรับประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติค (PROCESS DEVELOPMENT FOR BIOMASS PRODUCTION OF *ENTEROCOCCUS FAECIUM* FOR PROBIOTICS USE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สมชาย เชื้อวัชรินทร์, Ph.D., อมเรศ ภูมิรัตน, Ph.D., อภิญญา อัศวนิก, Ph.D. 123 หน้า. ISBN 974-663-802-5

ในการพัฒนากระบวนการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ *Enterococcus faecium* ที่ความเข้มข้นสูงสำหรับใช้เป็นสารเสริมชีวนะ (probiotics) จำเป็นที่จะต้องลดอิทธิพลของกรดแลคติคซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ในการศึกษานี้ได้มีการทดสอบผลของการใช้โปรตีนเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและการเติมอากาศต่อการเจริญเติบโตและการสร้างกรดแลคติคของเชื้อ และพบว่าการใช้โปรตีนเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนควบคู่ไปกับการให้อากาศ ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดีและสามารถลดการสร้างกรดแลคติคได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยแล้วสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อได้ สำหรับการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการเลี้ยงเชื้อในระดับอุตสาหกรรม พบว่าอาหารที่มีส่วนผสมของ digested fish soluble และ whey สามารถทดแทนแหล่งโปรตีนที่มีราคาสูง เช่น meat extract, tryptone และ yeast extract ที่ใช้ในสูตรอาหาร MRS ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามผลการศึกษาต่อมาชี้ให้เห็นว่า การใช้แหล่งโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในการเลี้ยง เชื้อจะมีการนำโปรตีนไปใช้ได้เพียงส่วนน้อยเท่านั้น แต่จะใช้ได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นถ้ามีการใช้น้ำตาลควบคู่ไปด้วย อย่างไรก็ตามแม้ว่าการให้น้ำตาลจะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่การให้น้ำตาลที่มากเกินไปจะมีผลในการเพิ่มการสร้างกรดแลคติคของเชื้อได้ ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคการเลี้ยงเชื้อแบบ fed-batch ในการควบคุมการให้โปรตีนและน้ำตาลเพื่อควบคุมการสร้างกรดแลคติคของเชื้อ ซึ่งพบว่าโดยเทคนิคนี้สามารถเลี้ยงเชื้อที่มีชีวิตได้ความเข้มข้นสูงถึง 4.3×10^{10} cfu/ml ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงแบบ batch ถึง 7 เท่า อย่างไรก็ตามในการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นสูงระดับหนึ่ง พบว่าเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่สามารถเพิ่มมากขึ้นได้ ทั้งนี้ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าอาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา Browning ที่เกิดในระหว่างการเตรียมอาหารโปรตีนความเข้มข้นสูงที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจากผลการลดปริมาณผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา Browning พบว่าสามารถช่วยเพิ่มเซลล์ที่มีชีวิตให้สูงยิ่งขึ้นได้

Copyright by Mahidol University