ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตโอลิโกเด็กแตรนโดยใช้เชื้อ *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 และการประเมินความสามารถการเป็นสารพรีไบโอติก
ผู้เขียน	นายสันทัด วิเชียรโชติ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2547

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตโอลิโกแด็กแตรนโดยเชื้อ *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 จากมอลโตเด็กตรินทางการค้าชนิดต่างๆ และปัจจัยที่มีผลต่อการกระจายของมวลโมเลกุลและโครงสร้างทางเคมีของโอลิโกเด็กแตรน ผลผลิตของโอลิโกเด็ก-แตรนที่ได้จากวิธี culture medium โดยการเลี้ยงเชื้อ *G. oxydans* ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ maltodextrin complex medium มีค่าสูงกว่า (30.35%) วิธี cell suspension (25.03%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ความเข้มข้นของเซลล์มีผลต่อผลผลิตของโอลิโกเด็กแตรนที่เวลา 24 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตโอลิโกเด็กแตรนโดยวิธี cell suspension คือ พีเอช 4.5 อุณหภูมิมีผลต่อการผลิตโอลิโกเด็กแตรนอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส มอลโตเด็กตรินที่มีค่า dextrose equivalent (DE) สูงจะให้ผลผลิตโอลิโกเด็กแตรนสูงสุดเป็น 30.02% ขณะที่มอลโตเด็กตรินที่มีค่า DE ต่ำให้ผลผลิตโอลิโกเด็กแตรนต่ำเมื่อใช้วิธี culture medium ความเข้มข้นของสับสเตรตมีผลต่อผลผลิตโอลิโกเด็กแตรนอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) มอลโตเด็ก-ตรินซึ่งมีมวลโมเลกุลต่ำ (ประมาณ 1 kDa) ถูกเปลี่ยนเป็นโอลิโกเด็กแตรนที่มีมวลโมเลกุลสูง (7.8-65.6 kDa) โดยมีสัดส่วนของพันธะ α-1,6, α-1,4 และ α-1,4,6 มีค่าเป็น 1.43-3.99, 1.48-4.27 และ 0.31-0.93 ตามลำดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะในการผลิต โครงสร้างทางเคมีของโอลิโกเด็กแตรนที่ผลิตจากมอลโตเด็กตริน G19 ซึ่งหาโดยวิธี ^{1}H-NMR พบว่าประกอบด้วย 44 หน่วยกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 และ 49 หน่วยกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ α-1,6 และโอลิโกเด็กแตรนที่ผลิตจากมอล-โตเด็กตริน G20 ประกอบด้วย 41 หน่วยกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 และ 45 หน่วยกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ α-1,6 จากผลดังกล่าวแสดงว่าโอลิโกเด็กแตรนประกอบด้วยกลูโคสทั้งหมดไม่น้อยกว่า 86 หน่วย

การผลิตโอลิโกเด็กแตรนในระดับ pilot-scale (ถังหมัก 150 ลิตร) และการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี ultrafiltration (UF) ประสบความสำเร็จ ซึ่งได้ผลผลิตใกล้เคียงกับการผลิตใน shake-flask นอกจากนี้ยังพบว่ามวลโมเลกุลของโอลิโกเด็กแตรนที่ได้มีค่าเท่ากัน (7.8-65.6 kDa)

โอลิโกเด็กแตรนมีคุณสมบัติทนต่อการย่อยด้วยสภาวะกรดจำลองในกระเพาะอาหารมนุษย์ พบว่าน้อยกว่า 3% ถูกย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่พีเอช 1-5 และกรดจำลองของกระเพาะอาหารไม่สามารถย่อยได้ โอลิโกเด็กแตรนยังทนต่อการย่อยด้วยอะมัยเลสโดยอะมัยเลสจากตับอ่อนมนุษย์สามารถย่อยโอลิโกเด็กแตรนได้สูงสุด (25%) ขณะที่อะมัยเลสจากน้ำลายมนุษย์ย่อยโอลิโกเด็ก-แตรนสุงสุดเป็น 15% อะมัยเลสจากแหล่งอื่นคือ จากเชื้อ *A. oryzae, B. sp., B. licheniformis* และจากข้าวบาเล่ย์สามารถย่อยได้สูงสุดน้อยกว่า 15% คาดว่าเมื่อบริโภคโอลิโกเด็กแตรนซึ่งสามารถทนการย่อยในระบบทางเดินอาหารมนุษย์และถึงลำไส้ใหญ่ไม่น้อยกว่า 60% และเกิดการหมักต่อไป

โอลิโกเด็กแตรนที่ผลิตโดย *G. oxydans* NCIMB 4943 จากมอลโตเด็กตรินชนิดต่างๆ เมื่อนำมาศึกษาผลการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้ใหญ่มนุษย์ พบว่ามีความสามารถในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการเมื่อทดลองในถังหมักแบบกะที่มีการกวนและควบคุมพีเอช (6.8) จำนวนและชนิดของแบคทีเรียนับโดยวิธี fluorescent *in situ* hybridization (FISH) พบว่าโอลิโกเด็กแตรนสามารถเพิ่มจำนวนเชื้อ bifidobacteria และ lactobacilli ภายใน 24 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จำนวนเชื้อ bacteroides, clostridium และ eubacteria ลดลงที่เวลา 48 ชม. มอลโตเด็กตรินเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ไม่มีคุณสมบัติในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากยังส่งเสริมการเจริญของเชื้อ bacteroides, clostridium และ eubacteria ด้วย โอลิโกเด็กแตรนที่ผลิตจากมอลโตเด็กตริน G19 มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกสูงสุดซึ่งมีค่าดัชนีพรีไบโอติก (Prebiotic Index, PI) เป็น 5.90 ที่เวลาการหมัก 48 ชม. กรดไขมันสายโซ่สั้น (short-chain fatty acid, SCFA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมักหาโดยวิธี HPLC พบว่าความเข้มข้นของอะซิเตต โพรพิโอเนตและบิวไทเรตที่ได้จากการหมักโอลิโกเด็กแตรนชนิดผลิตจากมอลโตเด็กตริน G19 ที่เวลา 48 ชม. มีค่าเป็น 63.67, 18.36 และ 14.52 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ไม่พบแลกเตตและพบฟอเมตปริมาณเล็กน้อย

ผลการศึกษาการหมักโอลิโกเด็กแตรนชนิดผลิตจากมอลโตเด็กตริน G19 ในถังหมักแบบต่อเนื่องสามถัง (three-stage continuous system) พบว่าจำนวนเชื้อ bifidobacteria และ lactobacilli เพิ่มขึ้นทั้งในถังที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งเป็นตัวแทนของลำไส้ใหญ่ส่วน proximal, transverse และ distal ตามลำดับ ค่าดัชนีพรีไบโอติกในถังหมัก 1, 2 และ 3 ของการหมักในวันที่ 20 มีค่า 2.29, 4.23 และ 2.74 ตามลำดับ บิวไทเรตที่ผลิตขึ้นในวันที่ 20 มีค่า 19.47, 24.28 และ 27.53 มิลลิโมลต่อลิตรในถังหมัก 1, 2 และ 3 ตามลำดับ คาร์โบไฮเดรตชนิดใหม่ที่ได้จากการศึกษานี้มีคุณสมบัติเป็นสารส่งเสริมการเจริญของเชื้อ bifidobacteria (bifidogenic) และมีคุณสมบัติผลิตบิวไทเรตในปริมาณสูง (butyrogenic) และมีศักยภาพเป็นสารพรีไบโอติกสำหรับป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่

Thesis Title	Production of Oligodextrans by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 and Evaluation on their Prebiotic Properties
Author	Mr. Santad Wichienchot
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2004

Abstract

This study was focused on the optimal environmental factors involved in the oligodextran production by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 from a range of commercial maltodextrins, and the influence of reaction parameters on the molecular weight distribution and chemical structure of the oligodextran products. *G. oxydans* gave significantly ($p<0.01$) higher oligodextran yield in culture medium method (30.35%) than using cell suspensions (25.30%) method. Cell concentration had a significant ($p<0.05$) effect on oligodextran yields at 24 h. The optimal pH was found to be 4.5 for the cell suspension method. Temperature had a significant ($p<0.05$) effect and the optimal temperature was found to be 30°C. Maximum yield (30.02%) was obtained with high dextrose equivalent (DE) maltodextrin in maltodextrin complex medium. Low DE substrates gave the lowest oligodextran yields. Substrate concentration affected oligodextran formation significantly ($p<0.05$). Low molecular weight (approximately 1 kDa) maltodextrin was converted to higher molecular weight oligodextran (7.8-65.6 kDa) with ratios of α-1,6-, α-1,4- and α-1,4,6-D-glucosidic linkages in the ranges of 1.43-3.99, 1.48-4.27 and 0.31-0.93 respectively, depending on the manufacturing conditions. The chemical structure of G19 oligodextran, produced from maltodextrin Glucidex G19, elucidated by ^{1}H-NMR was proposed to contain 44 α-1,4-D-glucosidic residues and 49 α-1,6-D-glucosidic residues whereas G20 oligodextran, produced from maltodextrin Goldex G20, contained 41 α-1,4-D-glucosidic residues and 45 α-1,6-D-glucosidic residues. This suggests that the oligodextran product had at least 86 glucose residues in total.

Oligodextran was produced in pilot-scale (150 l fermenter) and recovered using pilot-scale ultrafiltration successfully giving oligodextran yield similar to that obtained

in shake-flask culture. In addition, the molecular weight distribution of the product was also exactly the same as that produced in shake-flask batch culture (7.8-65.6 kDa).

Oligodextran had highly persistent to acidic condition stimulated human stomach. It was found that less than 3% of oligodextran was hydrolyzed by HCl and no hydrolysis was observed using HCl buffer. Oligodextran also resisted to amylases digestion and human pancreatic amylase seemed to give the maximum digestion (25%) whereas human saliva amylase showed the highest digestion (15%). Other sources of amylase were *A. oryzae*, *Bacillus sp*., *B. licheniformis*, barley gave the maximum digestion of less than 15%. Consumption of oligodextran is thought at least 60% of oligodextran reach the colon for further fermentation by colonic microflora.

The selectivity of oligodextrans on the growth of desirable bacteria in the human colon was studied in stirred pH-controlled (6.8) batch culture. The populations of bacteria were enumerated using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique. Oligodextrans had significantly (P<0.05) increased numbers of bifidobacteria and lactobacilli within 24 h. The number of bacteroides, clostridia and eubacteria were decreased at 48 h. Maltodextrin showed a non-selective carbohydrate since it could also stimulate the growth of bacteroides, clostridia and eubacteria. Oligodextran produced from G19 maltodextrin demonstrated the highest prebiotic effect since it had the highest prebiotic index (PI) of 5.90 at 48 h. The concentrations of acetate, propionate and butyrate produced from oligodextran, derived from G19 maltodextrin, at 48 h were 63.67, 18.36 and 14.52 mmol l^{-1}, respectively whist no lactate and small amount of formate detected.

Three-stage continuous system studies on oligodextran produced from Glucidex 19 maltodextrin showed significant (P<0.05) increases numbers of bifidobacteria and lactobacilli in V1, V2 and V3 which represent the proximal, transverse and distal colon, respectively. Prebiotic index of oligodextran produced from Glucidex 19 in V1, V2 and V3 at day 20 were 2.29, 4.23 and 2.74, respectively. Short-chain fatty acids (SCFA) of fermented end products were determined by HPLC. Butyrate produced in three-stage continuous system at day 20 were 19.47, 24.28, 27.53 mmol l^{-1} in V1, V2 and V3, respectively. A novel carbohydrates tested in this study had bifidogenic and also butyrogenic properties and has potential use for prebiotic target colon cancer.