

การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาการเติมซูโครสที่เหมาะสม  
สำหรับการผลิตเดกซ์แทรนจากแบคทีเรียแลคติก

*Leuconostoc mesenteroides* TISTR053

OPTIMIZATION OF MEDIA AND SUCROSE ADDITION TIME  
FOR DEXTRAN PRODUCTION USING LACTIC ACID BACTERIA

*Leuconostoc mesenteroides* TISTR053

กวิตา แก้วชูเชิด<sup>1</sup> สมพจน์ อันติมานนท์<sup>2</sup> สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา<sup>3</sup> และ เทพปัญญา เจริญรัตน์<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

<sup>2</sup>ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

<sup>3</sup>คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

Kavita Kaewchucherd<sup>1</sup>, Sompot Antimanon<sup>2</sup>, Soisuda Pornpukdeewattana<sup>3</sup>  
and Theppanya Charoenrat<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathum Thani, 12120,

<sup>2</sup>National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology  
Development Agency (NSTDA), Pathum Thani, 12120,

<sup>3</sup>Faculty of Agro-Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520.

\*E-mail: theppanya\_c@sci.tu.ac.th

Received: 2019-06-06

Revised: 2019-07-18

Accepted: 2019-07-18

บทคัดย่อ

เดกซ์แทรน (dextran) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide; EPS) จากแบคทีเรียแลคติก *Leuconostoc mesenteroides* ที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการแพทย์อย่างแพร่หลาย ซึ่งสามารถผลิตโดยกระบวนการหมัก ทั้งนี้ นอกจากรูปแบบของกระบวนการหมักที่มีอิทธิพลต่อผลได้และความเข้มข้นของเดกซ์แทรนแล้ว ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและส่งเสริมการผลิตเดกซ์แทรนด้วย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมซูโครสระหว่างกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตเดกซ์แทรนสูงสุด โดยเลือก

ศึกษาอาหาร 3 ชนิด คือ อาหารเอ็มอาร์เอส อาหารสังเคราะห์กลูโคส และอาหารสังเคราะห์ซูโครส พบว่าอาหารสังเคราะห์ซูโครสเป็นอาหารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดถึงแม้ว่าจะต้องการระยะปรับตัวประมาณ 1.5 ชั่วโมง ก็ตาม โดยให้ค่าเซลล์ที่มีชีวิตสูงถึง  $(6.03 \pm 0.39) \times 10^{10}$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้อาหารสังเคราะห์กลูโคสและอาหารเอ็มอาร์เอสประมาณ 1.3 และ 1.4 เท่าตามลำดับ สำหรับการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมซูโครสต่อการผลิตเดกซ์แทรน พบว่า การเติมซูโครสที่เวลา 2 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดซึ่งให้ค่าความเข้มข้นของเดกซ์แทรนและอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตรสูงที่สุดเท่ากับ  $29.63 \pm 0.42$  กรัมต่อลิตร และ  $2.69 \pm 0.08$  กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเติมน้ำตาลซูโครสที่ระยะเวลา 0 4 6 และ 8 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง ประมาณ 1.2 1.7 2.4 และ 3.0 เท่า ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการผลิตเดกซ์แทรนในระดับถึงปฏิกิริยาชีวภาพต่อไป

**คำสำคัญ:** เดกซ์แทรน แบคทีเรียกรดแลคติก อาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะเวลาการเติมซูโครส

## ABSTRACT

Dextran is an exopolysaccharide (EPS) from lactic acid bacteria (LAB) *Leuconostoc mesenteriodes*. It is mostly produced by fermentation process and has been widely applied in the food and medical industries. In addition to the development of production process that has influenced on yield and dextran content, other factors affecting to enhance microbial cultivation must be considered to achieve high dextran productivity. The objectives of this research were therefore to study the type of culture media (De Man Rogosa and Sharpe; MRS, glucose synthetic medium and sucrose synthetic medium) on cell growth and sucrose addition time during fermentation to obtain the highest yield. According to the parameters related to growth, the results showed that the suitable medium for growth was sucrose synthesis medium with lag time for 1.5 h. It provided viable cell concentration of  $(6.03 \pm 0.39) \times 10^{10}$  cfu/mL which higher than glucose synthetic medium and MRS around 1.3 and 1.4 times, respectively. The influence of sucrose addition time on dextran production revealed that sucrose added at 2 h of fermentation was optimum with dextran content and volumetric productivity of  $29.63 \pm 0.42$  g/L and  $2.69 \pm 0.08$  g/L·h, respectively. These results were higher than when sucrose was added at 0, 4, 6, and 8 about 1.2, 1.7, 2.4, and 3.0 times, respectively. Regarding the results, further study should be developed on dextran production in bioreactor scale.

**Keywords:** Dextran, Lactic Acid Bacteria, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR053, Cultivation medium, Sucrose addition time

## บทนำ

ในปัจจุบันมีความต้องการใช้พอลิเมอร์ชีวภาพหรือพอลิเมอร์จากธรรมชาติเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น (Kotharia et al, 2014 ; Naessens et al., 2005) โดยหนึ่งในพอลิเมอร์ชีวภาพที่ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ประโยชน์และสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์คือ เดกซ์แทรน (dextran) ซึ่งเป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide; EPS) ที่ได้รับการรับรองว่ามีความปลอดภัยต่อการใช้ในอาหารและยา (Kotharia et al., 2014) ทั้งนี้ เดกซ์แทรนเกิดจากการเชื่อมต่อกันของหน่วยย่อย คือ กลูโคส (D-glucose) ที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) โดยสายโซ่หลักมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -(1, 6)-glycosidic และโซ่กิ่งเกิดจากการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -(1,2)-,  $\alpha$ -(1, 3)-, หรือ  $\alpha$ -(1, 4)-glycosidic (Cote & Robyt, 1982) อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างด้านลักษณะและสมบัติของเดกซ์แทรนที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิต (Brown & Inkerman, 1992) จากการรายงานของ Katina et al. (2009) พบว่าแบคทีเรียแลคติก อาทิเช่น *Leuconostoc* *Lactobacillus* *Streptococcus* และ *Weissella* มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนโดยใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเดกซ์แทรน ผ่านการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (dextranase) ที่แบคทีเรียเหล่านี้ผลิตขึ้น ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการย้ายหมู่กลูโคสจากซูโครสเพื่อสังเคราะห์เดกซ์แทรนและมีการปลดปล่อยฟรุคโตส (Monsan et al., 2001; Precht et al., 2018 ; Sarwat et al., 2008) โดยเดกซ์แทรนที่ผลิตได้มีลักษณะที่เหนียวและหนืด ไม่ละลายในแอลกอฮอล์แต่สามารถละลายน้ำได้ดี สำหรับเดกซ์แทรนที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ใช้กระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์ (fed-batch fermentation) โดยแบคทีเรียแลคติก *Leuconostoc mesenteroides* ซึ่งเป็นรูปแบบการหมักที่สามารถเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ให้สูงขึ้น (high cell density) ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่มากกว่าการใช้กระบวนการหมักแบบแบทช์ (batch fermentation) (Chauvatcharin, 1999; Baruah et al, 2018 ; Nuwan et al, 2016) นอกจากนี้ ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteroides* และปัจจัยที่ส่งเสริมการสร้างและการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครสด้วย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และระยะเวลาในการเติมซูโครสระหว่างกระบวนการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนจากเชื้อแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteroides* TISTR053

## วิธีการ

### 1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ แบคทีเรียแลคติก *Leuconostoc mesenteroides* TISTR053 จากศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยระหว่างการศึกษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นวิธีที่ปรับปรุงจาก Rueangyotchanthana (2013) & Sriphan (2014)

### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเอ็มอาร์เอส (De Man Rogosa และ Sharpe; MRS) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัม มีทเปปโตน (meat peptone) 10 กรัม เนื้อสกัด (beef extract) 10 กรัม ยีสต์สกัด (yeast extract) 5 กรัม โซเดียมอะซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 5 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 2 กรัม แอมโมเนียมอะซิเตต ( $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$ ) 2 กรัม ทวิน-80 (Tween-80) 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4$ ) 0.1 กรัม และแมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4$ ) 0.05 กรัม

อาหารสังเคราะห์กลูโคส ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัม มีทเปปโตน 5 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 15 กรัม แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0.01 กรัม โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) 0.01 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0.05 กรัม (Sarwat et al., 2008)

อาหารสังเคราะห์ซูโครส มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารสังเคราะห์กลูโคส โดยใช้ซูโครสเป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารทดแทนกลูโคส (Sarwat et al., 2008)

อาหารทั้งสามชนิดปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และ/หรือ กรดฟอสฟอริก ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ กรณีที่เป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้น ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) 5 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการสร้างกรดของแบคทีเรีย

### 3. การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายสารแขวนลอยเซลล์ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ถ่ายลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเอ็มอาร์เอสปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิดปากพลาสติกทับจุกลำลิด้วยพลาสติกห่ออาหาร (plastic wrap) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

### 4. การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteroides* TISTR053

การศึกษานี้ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ทำโดยเปรียบเทียบ

การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. mesenteriodes* TISTR053 ในอาหารเอ็มอาร์เอส อาหารสังเคราะห์ กลูโคส และอาหารสังเคราะห์ชูโครสในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารแต่ละชนิดปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยกำหนดค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ( $OD_{600} \sim 0.1$ ) ปิดปากพลาสติก ทับจุลาล์ด้วยพลาสติกห่ออาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และอาหารเอ็มอาร์เอสเป็นอาหารมาตรฐานที่ใช้เป็นอาหารอ้างอิงสำหรับเปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์อีกสองชนิด

## 5. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมชูโครสต่อการผลิตเดกซ์แทรนด้วย กระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์

งานวิจัยในส่วนนี้ต้องการศึกษาอิทธิพลของช่วงระยะเวลาในการเติมชูโครสต่อการผลิตเดกซ์แทรน ซึ่งเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteriodes* TISTR053 ในอาหารเอ็มอาร์เอสปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยกำหนดค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ( $OD_{600} \sim 1$ ) ปิดปาก พลาสติกทับจุลาล์ด้วยพลาสติกห่ออาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายน้ำหมักความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารสังเคราะห์ชูโครสปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกันกับที่กล่าวมาข้างต้น และทำการเติมชูโครสให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอีก 150 กรัมต่อลิตร โดยแปรผันระยะเวลาในการเติมชูโครสที่เวลา 0 2 4 6 และ 8 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ทำการทดลอง ทั้งหมด 3 ซ้ำ และใช้ระยะเวลาการเติมชูโครสที่ 0 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง เป็นชุดทดลองควบคุม

## 6. วิธีวิเคราะห์

### 6.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) และจำนวนเซลล์มีชีวิต (viable cell)

ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งหาโดยการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการนำตัวอย่าง น้ำหมัก 10 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ และน้ำกลั่น ตามลำดับ นำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้นก่อนนำมาชั่งน้ำหนัก ที่แน่นอน คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตรด้วยสูตรคำนวณดังต่อไปนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งจากน้ำหมัก 10 มิลลิลิตร (กรัม)} \times 1,000 \text{ (มิลลิลิตรต่อลิตร)}}{10 \text{ (มิลลิลิตร)}}$$

สำหรับการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้ใช้เทคนิค colony plate count (Keereewan, 2015) โดยการนำน้ำหมักมาผ่านการเจือจางในสัดส่วนที่เหมาะสม จากนั้นหยดลงบนอาหารแข็ง เอ็มอาร์เอสแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรด้วยสูตรคำนวณดังต่อไปนี้

เซลล์ที่มีชีวิต (โคโลนีต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่ขึ้น (โคโลนี)}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง (มิลลิลิตร)}} \times \text{อัตราเจือจาง}$$

## 6.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (total sugar)

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลในงานวิจัยนี้ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Sarwat et al. (2008) โดยเติมเอทานอลบริสุทธิ์ลงในน้ำหมักส่วนใดในอัตราส่วน 1:1 นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนใสผสมกับกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ด้วยอัตราส่วน 1:1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายข้างต้นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในสัดส่วนที่เหมาะสม แล้วนำตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายดีเอ็นเอส (3,5 Dinitrosalicylic acid; DNS) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาล โดยใช้กฎโคสเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งสามารถแสดงสมการในการคำนวณดังต่อไปนี้

$$y = 0.3301x + 0.0035$$

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และ x คือ ความเข้มข้นของน้ำตาล ซึ่งกราฟมาตรฐานค่าความยาวคลื่นกับน้ำตาลกลูโคสนี้ค่า  $R^2 = 0.9986$

## 6.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเดกซ์แทรน

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักทำโดยผสมเอทานอลบริสุทธิ์กับน้ำหมักในอัตราส่วน 1:1 นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น

ล้างตะกอนเดกซ์แทรนที่ได้ด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Abdul et al., 2016 ; Sarwat et al., 2008) นำมาชั่งน้ำหนักและคำนวณความเข้มข้นของเดกซ์แทรนในหน่วยกรัมต่อลิตรด้วยสูตรคำนวณดังต่อไปนี้

เดกซ์แทรน (กรัมต่อลิตร) = น้ำหนักตะกอนแห้งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) - น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

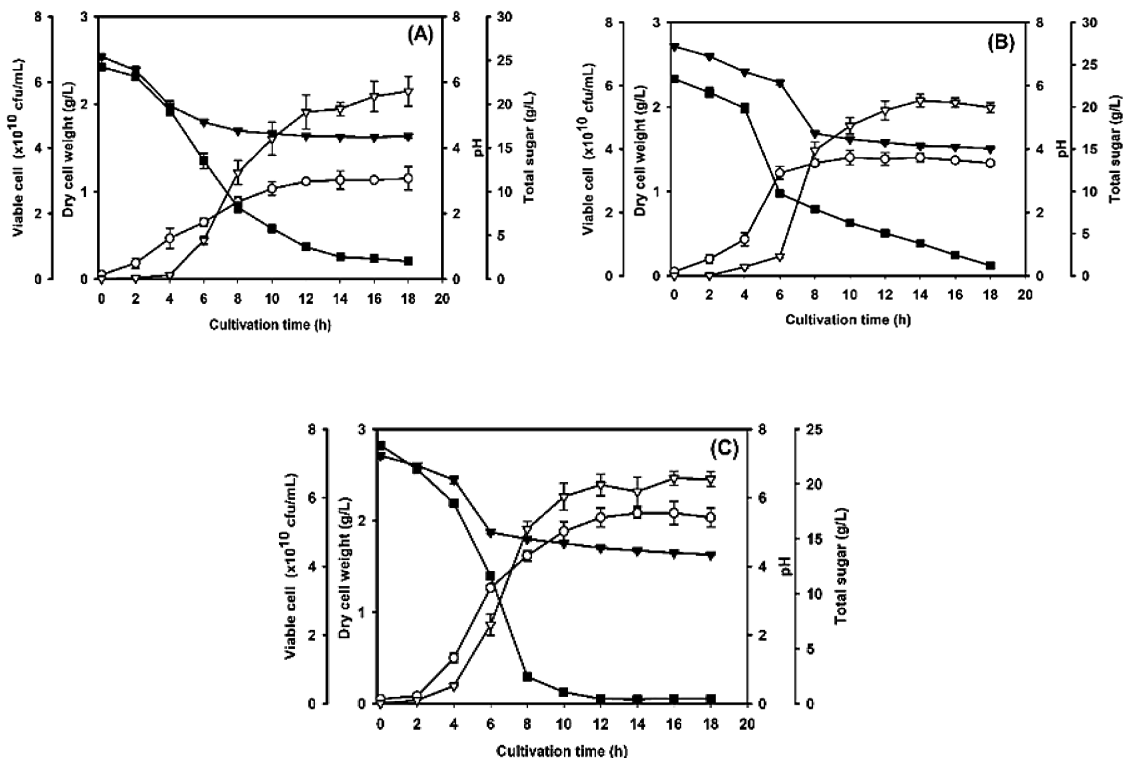
## ผลการทดลอง

### 1. การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteriodes* TISTR053

การศึกษานี้ศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteriodes* TISTR053 ทำโดยใช้อาหารเหลว 3 ชนิด ได้แก่ อาหารเอ็มอาร์เอส อาหารสังเคราะห์กลูโคส และอาหารสังเคราะห์ชูโครส ผลการทดลองพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ทันทีโดยไม่มีระยะปรับตัว (lag phase) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน คือ อาหารเอ็มอาร์เอส และอาหารสังเคราะห์กลูโคส ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ชูโครสเชื้อมีระยะปรับตัวประมาณ  $1.48 \pm 0.33$  ชั่วโมง ทั้งนี้ การใช้ชูโครสของแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteriodes* TISTR053 ต้องอาศัยเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครสในการสลายชูโครสเป็นกลูโคสและฟรุคโตส ประกอบกับเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครสเป็นเอนไซม์ที่จะสร้างเมื่อมีชูโครสเป็นตัวเหนี่ยวนำ ดังนั้น เชื้อจึงต้องใช้เวลาในการสร้างและผลิตเอนไซม์ดังกล่าวก่อนส่งออกมายังบริเวณผนังเซลล์ (Chuchan, 2014 ; Prechtl et al., 2018)

เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงอาหารสังเคราะห์ชูโครส โดยมีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.43 \pm 0.00$  ต่อชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดมีค่าเท่ากับ  $1.88 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตสูงสุดมีค่าเท่ากับ  $(6.03 \pm 0.39) \times 10^{10}$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ อาหารสังเคราะห์กลูโคส และให้การเจริญเติบโตน้อยที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอส (ตารางที่ 1) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรตและอัตราการใช้สับสเตรตเชิงปริมาณที่มีค่ามากที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteriodes* TISTR053 ในอาหารสังเคราะห์ชูโครส นอกจากนี้ พีเอชของน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิด มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจาก พีเอช 7.0 ลดลงอยู่ในช่วง 4.80-4.50 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้น การลดลงของค่า พีเอชมีอัตราที่ช้าลง (รูปที่ 1) สอดคล้องกับการรายงานของ (Han et al., 2014) ที่กล่าวว่า ในระหว่างที่เชื้อเจริญเติบโตโดยเพิ่มจำนวนจาก  $7.5 \log_{10}$  เป็น  $9.3 \log_{10}$  พีเอชของน้ำหมักมีค่าลดลงจาก 5.72 เป็น 3.88 เนื่องจากการสะสมของกรดอินทรีย์

ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งการลดลงของพีเอชจะส่งผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลง ทั้งนี้ ค่าพีเอชเป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ (Nopphakao, 2010 ; Chaikulsareewath, 2008)



**รูปที่ 1** รูปแบบการเจริญเติบโต การใช้น้ำตาล และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteroides* TISTR053 ในอาหาร (A) อาหารเอ็มอาร์เอส (B) อาหารสังเคราะห์กลูโคส และ (C) อาหารสังเคราะห์ซูโครส โดยมีค่าที่แสดง คือ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (วงกลมโปร่ง) ค่าพีเอช (สามเหลี่ยมทึบ) ค่าความเข้มข้นเซลล์มีชีวิต (สามเหลี่ยมโปร่ง) และค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (สี่เหลี่ยมทึบ)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อาหารสังเคราะห์ชูโครสเป็นอาหารที่เหมาะสมในการใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติด *L. mesenteroides* TISTR053 ซึ่งนอกจากจะสามารถให้ผลผลิตของเซลล์ที่เสมือนกับเป็นโรงงานในการสร้างผลิตภัณฑ์ (cell factory) ให้ได้ปริมาณที่สูงแล้ว ยังเป็นอาหารที่มีราคาถูกเมื่อเทียบกับอาหารเอ็มอาร์เอส จึงสามารถช่วยลดต้นทุนในส่วนของการเลี้ยงเชื้อได้เป็นอย่างดี ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้อาหารสังเคราะห์ชูโครสสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

**ตารางที่ 1** ข้อมูลและค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติด *L. mesenteroides* TISTR053 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ\*

| ค่าพารามิเตอร์                                                     | ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ** |                          |                          |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                                                    | อาหารเอ็มอาร์เอส          | อาหารสังเคราะห์กลูโคส    | อาหารสังเคราะห์ชูโครส    |
| น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)                                     | 1.03 ± 0.08 <sup>c</sup>  | 1.40 ± 0.09 <sup>b</sup> | 1.88 ± 0.10 <sup>a</sup> |
| ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิต (x 10 <sup>10</sup> โคโลนีต่อมิลลิลิตร) | 4.28 ± 0.51 <sup>b</sup>  | 4.73 ± 0.26 <sup>b</sup> | 6.03 ± 0.39 <sup>a</sup> |
| อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)                                  | 0.37 ± 0.01 <sup>c</sup>  | 0.41 ± 0.00 <sup>b</sup> | 0.43 ± 0.00 <sup>a</sup> |
| ผลได้ของเซลล์จากสับสเตรต (กรัมต่อกรัมสับสเตรต)                     | 0.05 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.08 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.08 ± 0.00 <sup>a</sup> |
| อัตราการใช้สับสเตรตเชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร*ชั่วโมง)               | 0.54 ± 0.03 <sup>c</sup>  | 0.80 ± 0.14 <sup>b</sup> | 1.10 ± 0.05 <sup>a</sup> |
| ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)                                  | 18                        | 18                       | 12                       |

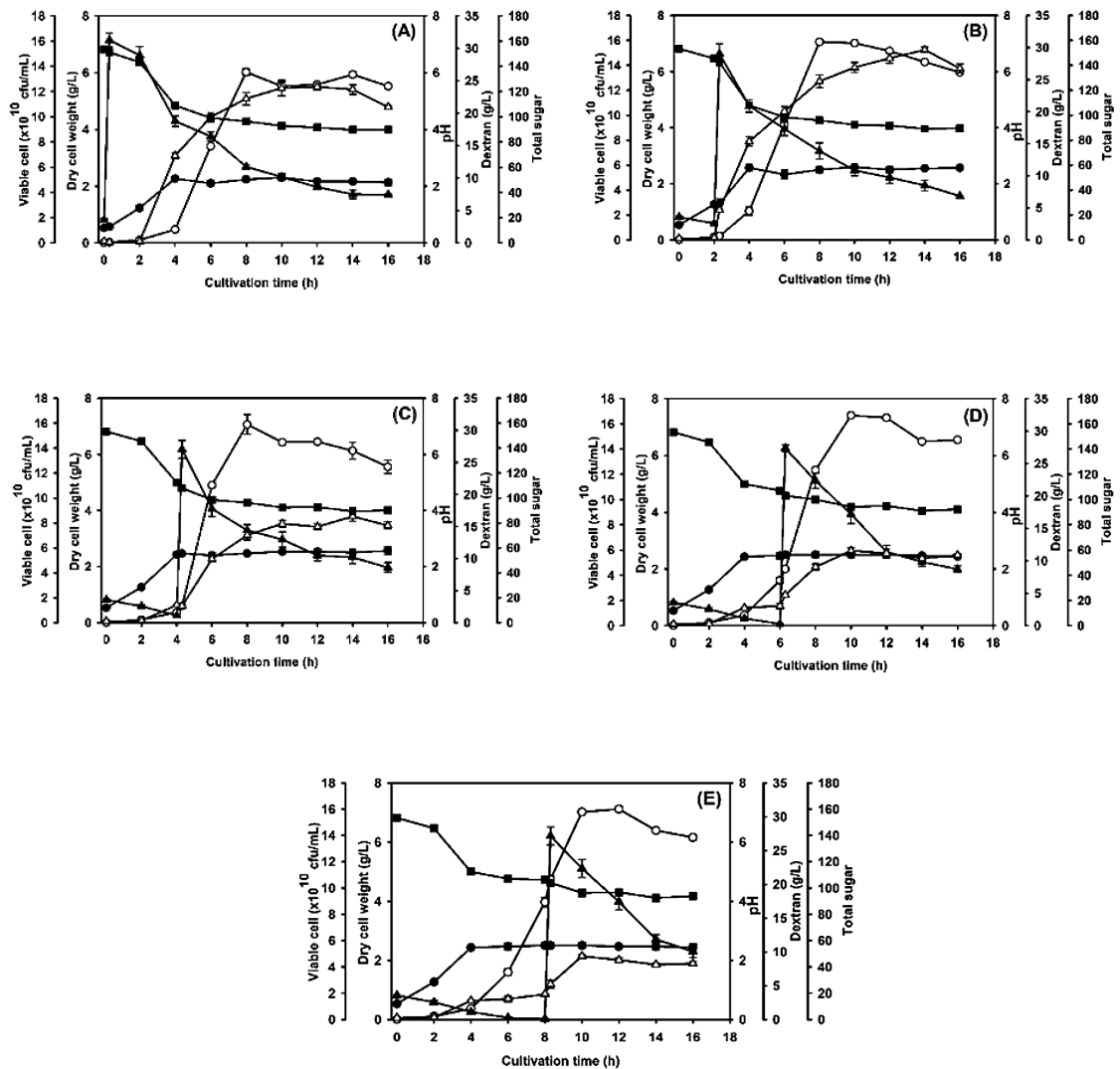
**หมายเหตุ :** \* ค่าในตาราง คือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ยกเว้นระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

\*\* ตัวอักษรยกกำลัง a, b และ c ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p ≥ .05) ของ ค่าที่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอส อาหารสังเคราะห์กลูโคส และอาหารสังเคราะห์ชูโครส

## 2. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมซูโครสต่อการผลิตเดกซ์แทรนด้วยกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์

สำหรับการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมซูโครสต่อการผลิตเดกซ์แทรนของแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteroides* TISTR053 ได้ทำการศึกษาโดยใช้อาหารสังเคราะห์ซูโครสโดยแปรผันระยะเวลาในการเติมซูโครสที่ 0 2 4 6 และ 8 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ผลการทดลองพบว่า ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตสูงสุดที่ได้จากแต่ละช่วงเวลาของการเติมซูโครสให้ค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 2.30 – 2.60 กรัมต่อลิตร และ  $(12.43 - 16.67) \times 10^{10}$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของการเติมซูโครสที่ระยะเวลา 0 2 4 6 และ 8 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง มีค่าอยู่ในช่วง 0.36 – 0.39 ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 1) ทั้งนี้ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตมีค่าใกล้เคียงกันในทุกระยะเวลาของการเติมซูโครสอาจเนื่องมาจากพีเอชของน้ำหมักมีค่าที่ลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วง 4.10 – 4.28 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 - 10 ชั่วโมง ซึ่งพีเอชดังกล่าวเป็นค่าพีเอชที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (Vettori et al., 2012)

อย่างไรก็ตาม แม้น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตจะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ระยะเวลาในการเติมซูโครสส่งผลโดยตรงต่อการผลิตเดกซ์แทรนของแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteroides* TISTR053 กล่าวคือ เมื่อมีการเติมซูโครสเข้าสู่ระบบในระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential growth phase) และพีเอชของน้ำหมักมีค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (พีเอช 5.0-6.3) เซลล์สามารถผลิตเดกซ์แทรนได้มากที่สุด และเมื่อพีเอชมีค่าต่ำลง (พีเอช ~ 4) ประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตเดกซ์แทรนมีค่าลดลง ดังนั้น การเติมซูโครสที่เวลา 2 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงจึงให้ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนและอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาณสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ  $29.63 \pm 0.42$  กรัมต่อลิตร และ  $2.69 \pm 0.08$  กรัมต่อลิตร•ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเติมซูโครสที่ระยะเวลาอื่น ๆ (ตารางที่ 2) รองลงมาคือการเติมซูโครสที่เวลา 0 4 6 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 2) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการรายงานของ Vanichwongwan (2002) ที่กล่าวว่า การผลิตเดกซ์แทรนจากแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* 6715 เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth associated product) นอกจากนี้ Netsopa et al. (2018) ได้รายงานว่าการผลิตเดกซ์แทรนจากเชื้อ *Weissella confuse* R003 มีค่าลดลงเมื่อค่าพีเอชของน้ำหมักมีความเป็นกรดมากขึ้น รวมถึง Santos et al. (2000) ได้รายงานว่าการเติมซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. mesenteroides* NRRL B512(f) คือ พีเอช 6.7 ในขณะที่พีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครสเพื่อผลิตเดกซ์แทรน คือ พีเอช 5.5



รูปที่ 2 รูปแบบการเจริญเติบโต การใช้น้ำตาล และการผลิตเดกซ์แทรนของแบคทีเรีย *L. mesenteroides* TISTR053 เมื่อมีการแปรผันระยะเวลาในการเติมซูโครสที่เวลาต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยง (A) 0 ชั่วโมง (B) 2 ชั่วโมง (C) 4 ชั่วโมง (D) 6 ชั่วโมง และ (E) 8 ชั่วโมง โดยมีค่าที่แสดง คือ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (วงกลมทึบ) ค่าความเข้มข้นเซลล์มีชีวิต (วงกลมโปร่ง) ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (สามเหลี่ยมทึบ) ค่าความเข้มข้นเดกซ์แทรน (สามเหลี่ยมโปร่ง) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยมทึบ)

**ตารางที่ 2** ข้อมูลและค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteroides* TISTR053 โดยการแปรผันระยะเวลาการเติมซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรน\*

| ค่าพารามิเตอร์                                                       | ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ** |                    |                      |                      |                      |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                                                      | 0                         | 2                  | 4                    | 6                    | 8                    |
| น้ำหนักเซลล์แห้ง<br>(กรัมต่อลิตร)                                    | $2.30 \pm 0.10^b$         | $2.60 \pm 0.10^a$  | $2.53 \pm 0.06^{ab}$ | $2.50 \pm 0.10^{ab}$ | $2.50 \pm 0.10^{ab}$ |
| ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิต<br>( $\times 10^{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร) | $12.43 \pm 0.37^d$        | $15.78 \pm 0.22^b$ | $14.47 \pm 0.17^c$   | $16.67 \pm 0.03^a$   | $15.78 \pm 0.15^b$   |
| อัตราการเติบโตจำเพาะ<br>(ต่อชั่วโมง)                                 | $0.36 \pm 0.03^a$         | $0.39 \pm 0.02^a$  | $0.36 \pm 0.03^a$    | $0.38 \pm 0.02^a$    | $0.38 \pm 0.02^a$    |
| ความเข้มข้นเดกซ์แทรน<br>(กรัมต่อลิตร)                                | $24.07 \pm 0.50^b$        | $29.63 \pm 0.42^a$ | $16.57 \pm 0.74^c$   | $11.57 \pm 0.46^d$   | $9.37 \pm 0.21^e$    |
| ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเตรต<br>(กรัมเดกซ์แทรน ต่อกรัมสับสเตรต)      | $0.22 \pm 0.02^{ab}$      | $0.24 \pm 0.02^a$  | $0.18 \pm 0.03^{ab}$ | $0.13 \pm 0.01^b$    | $0.19 \pm 0.08^{ab}$ |
| ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์<br>(กรัมเดกซ์แทรน ต่อกรัมเซลล์)            | $10.35 \pm 0.82^a$        | $8.55 \pm 0.20^b$  | $5.06 \pm 0.10^c$    | $2.74 \pm 0.37^d$    | $1.65 \pm 0.11^d$    |
| อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์<br>เชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร•ชั่วโมง)          | $2.39 \pm 0.12^b$         | $2.69 \pm 0.08^a$  | $1.54 \pm 0.06^c$    | $1.16 \pm 0.05^d$    | $0.94 \pm 0.02^e$    |

หมายเหตุ : \* ค่าที่ในตาราง คือ ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\*\* ตัวอักษรยกกำลัง a, b, c, d และ e ที่แตกต่างแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p \geq .05$ ) ของค่าที่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซูโครสและมีการเติมซูโครสที่ 0 2 4 6 และ 8 ชั่วโมงของการหมัก

## สรุปและวิจารณ์ผล

ความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิตถือเป็นปัจจัยที่ส่งผลโดยตรงต่อผลสำเร็จของการสร้างผลผลิตผ่านกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *Leuconostoc mesenteroides* TISTR053 จึงถือเป็นสิ่งสำคัญต่อการพัฒนากระบวนการผลิตเดกซ์แทรน โดยอาหารสังเคราะห์ซูโครสเป็นอาหารที่มีความเหมาะสมซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีและใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจนสิ้นสุดกระบวนการที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้อาหารสังเคราะห์กลูโคสและอาหารเอ็มอาร์เอสต้องใช้เวลามากถึง 18 ชั่วโมง การศึกษานี้จึงเลือกใช้อาหารสังเคราะห์ซูโครสสำหรับศึกษาระยะเวลาในการเติมซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรน พบว่าการเติมซูโครสที่ระยะเวลาในช่วง 0 - 8 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการเจริญเติบโตน้อยมาก อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาในการเติมซูโครสเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเดกซ์แทรนเป็นอย่างมาก โดยการเติมซูโครสที่เวลา 2 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่มีความเหมาะสมที่สุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากช่วงระยะเวลา 2 ชั่วโมงเซลล์เจริญเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณและมีค่าพีเอชของน้ำหมักอยู่ในช่วง 5.0 - 6.3 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเดกซ์แทรน ซึ่งการเติมซูโครสที่ 2 ชั่วโมง ให้ค่าความเข้มข้นของเดกซ์แทรนสูงกว่าการเติมที่เวลา 0 4 6 และ 8 ชั่วโมง ประมาณ 1.2 1.8 2.6 และ 3.2 เท่า ตามลำดับสอดคล้องกับการรายงานของ Miljkovic et al. (2017) ที่กล่าวว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครสของเชื้อ *L. mesenteroides* T3 มีค่าอยู่ในช่วง 5.0 - 5.6

จากผลของงานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเดกซ์แทรนของแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteroides* TISTR053 ดังนั้น เพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตและประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตให้มากยิ่งขึ้น สามารถนำกระบวนการดังกล่าวไปประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตเดกซ์แทรนในถึงปฏิกิริยาชีวภาพที่สามารถควบคุมค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้อย่างแม่นยำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการผลิตเดกซ์แทรน ซึ่งทำให้กระบวนการผลิตดังกล่าวมีประสิทธิภาพมากขึ้น

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตามสัญญาเลขที่ ทบ 2/11/2561 และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่สำหรับการทำงานวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- Abdul, J., Salman, S. & Salim, M.Z. (2016). Production and characterization of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* isolated from Iraqi fish intestine. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**. 3(8), 62-69.
- Baruah R., Deka B., Niharika Kashyap N. & Goyal A. (2018). Dextran utilization during its synthesis by *Weissella cibaria* RBA12 can be overcome by fed-batch fermentation in a bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 184, 1–11.
- Brown, C.F. & Inkerman, P.A. (1992). Specific method for quantitative measurement of the total dextran condition of raw sugar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 40, 227-233.
- Chaikulsareewath, A. (2008). Isolation and screening of antibacterial substances of lactic acid bacteria. Thesis. Siam University. (in Thai)
- Chauvatcharin, S. (1999). Development of the cultivation of high cell density of lactic acid bacteria: application of metabolic control. Thesis. Department of Biotechnology. Mahidol University. (in Thai)
- Chuchan, S. (2014). **Microbial polymers**. Bangkok: Samnakphim Chulalongkon University. (in Thai)
- Cote, G.L. & Robyt, J.F. (1982). Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating 1-6, 1-3- $\alpha$ -D-glucan. **Carbohydrate Research**. 101(1), 57–74.
- Han, J., Hang, F., Guo, B., Liu, Z., You, C. & Wu, Z. (2014). Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. **Carbohydrate Polymers**. 122, 556-562.
- Katina, K., Maina, N.H., Juvonen, R., Flander, L., Johansson, L., Virkki, L., Tenkanen, M. & Laitila, A. (2009). In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. **Food Microbiology**. 26, 734–743.
- Keereewan, P. (2015). Selection of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* from Thai fermented food for conjugated linoleic acid production. M.Sc. Master of Science. Department of Biotechnology. Thammasat University. (in Thai)
- Kotharia, D., Dasb, D., Patelc, S., & Goyala, A. (2014). Dextran and food application. Springer International Publishing Switzerland. 1-16.

- Miljkovic, M.G., Davidovic, S.Z., Kralj, S., Siler-Marinkovic, S.S., Rajilic-Stojanovic, M.D. & Dimitrijevic-Brankovic, S.I. (2017). Characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*T3, water kefir grains isolate. **Hemijaska Industrija**. 71(4), 351-360.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.M. & Remaud, S.M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**. 11, 675-685.
- Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W. & Vandamme J.E. (2005). *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 80, 845–860.
- Netsopa, S., Niamsanit, S., Sakloetsakun, D. & Milintawisamai, N. (2018). Characterization and rheological behavior of dextran from *Weissella confuse* R003. **International Journal of Polymer Science**. 6, 1-10.
- Nopphakao, C. (2010). **Optimization of media components and fermentation conditions for lactic acid production from whey by lactic acid bacteria**. M.Sc. Master of Science. Department of Microbiology. Silpakorn University. (in Thai)
- Nuwan, P., Phakphimol, P., Adisak, J. & Phimchanok, J. (2016). Production of dextran by *Leuconostoc mesenteroides* TISTR053 in fed batch fermentation. **KKU research journal**. 22(1), 366-375.
- Parichat, S. (2014). **Reducing the activity of trypsin inhibitors for silage fermentation by lactic acid bacteria obtained from raw soybean meal**. M.Sc. Master of Science. Department of Biotechnology. Kasetsart University. (in Thai)
- Precht, R.M., Dorothee, J.D.; Behr, J., Ludwig, C., Kuster, B., Vogel, R.F. & Jakob, F. (2018). Sucrose-induced proteomic response and carbohydrate utilization of *Lactobacillus sakei* TMW 1.411 during dextran formation. **Frontiers in Microbiology**. 9, 1-13.
- Rueangyotchanthana, K. (2013). **Screening of lactic acid bacteria isolated from animal feces for multistrains probiotics and their application in chickens**. M.Sc. Master of Science. Department of Biotechnology, Srinakharinwirot University. (in Thai)
- Santos, M., Teixeira, J. A. & Rodrigues, A. (2000). Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). **Biochemistry and Engineering Journal**. 4, 177-188.

- Sarwat, F., Qader, S.A.U., Aman, A. & Ahmed, N. (2008). Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. **International Journal of Biological Sciences**. 4(6), 379-386.
- Vanichwongwan, N. (2002). Production of dextran by streptococcus sobrinus 6715 for use as inducer for dextranase production in *Arthrobacter* sp. AG-2. M.Sc. Master of Science. Department of Microbiology. Chulalongkorn University. (in Thai)
- Vettori, M.H., Blanco, K.C., Cortezi, M., Lima, C. & Contiero, J. (2012). Dextran: effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent applications. **Dialogos and Ciencia**. 31, 171-186.

.....