

Thesis Title Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria from
Pickles and Fermented Plant Products

Author Miss. Yodsawee Duangchitchareon

Degree Master of Science (Pharmaceutical Sciences)

Thesis Advisory Committee Asst. Prof. Dr. Chaiyavat Chaiyasut Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Duangporn Kantachote Member
Dr. Metta Ongsakul Member

ABSTRACT

A total of 327 representative and dominant strains of lactic acid bacteria (LAB) were isolated from 90 samples of fermented plant juice products (FMPJ) as pickles and plant fermented juice products. For this study, 3 LAB-selected strain, SS2, SK14, and SK15, were selected for potentially probiotic lactic acid bacteria. *In vitro* and *in vivo* studies has been used to evaluate various characters of potentially probiotic bacteria. In order to be used as human probiotic, they tolerated to 0.15% and 0.30% bile salt and showed more than 90% of survival rate at pH 3 and 4, especially SS2 and SK15 showed >50% of survival rate at pH 8. In addition, the strains were also examined for ability to utilize protein and starch and then performed growth in both aerobic and anaerobic conditions with no significant difference ($p>0.05$). Beside that, they did not employ vitamin B12, the nutrition is used in common mode of human life, for their growth. The controlled condition of organic acid and hydrogen peroxide production at hrs18, all probiotic-selected strains had showed ability to inhibit growth of spoilage and enteropathogenic bacteria using agar spot. A further investigation

using associative culture technique, their inhibition to enteropathogenic bacteria showed percentage between 70 to nearly 100. An *in vitro* for application use, they were observed for antibiotic susceptibility test that they exhibited resistant to antibiotic as follows : vancomycin (30 mcg), bacitracin (10 mcg), gentamycin (10 mcg), kanamycin (30 mcg), streptomycin (10 mcg), norfloxacin (10 mcg), and polymyxin B (300 mcg) and then they showed correlation coefficient level ($r > 0.8$) from culture in MRS and SPY2 medium that the SPY2 medium is the culture medium free from animal-derived ingredients. All of 3 probiotic-selected strains, SS2, SK14, and SK15, showed 50.67, 58.85, and 55.78 mins. for their generation time and all of them were identified to *Lactobacillus plantarum*. Beside *in vitro* study, they showed safety for acute oral toxicity test in animal experimental. Thereafter, intestinal persistence observations by daily fecal LAB count and flow cytometry were performed. All of probiotic-selected strains showed persistence in the mice intestine at least 1 day and could be found in all part of mice intestine.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจากผักดองและผลิตภัณฑ์น้ำหมักพืช

ผู้เขียน นางสาวศวีร์ ดวงจิตต์เจริญ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เกษตรกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. ไชยวัฒน์ ไชยสุด	ประธานกรรมการ
รศ.ดร. ดวงพร คันทโชติ	กรรมการ
อ.ดร. เมตตา องค์กรสกุล	กรรมการ

บทคัดย่อ

แบคทีเรียแลคติก ทั้งสิ้น 327 สายพันธุ์ คัดแยกมาจากผลิตภัณฑ์น้ำหมัก คือ ผักดอง และน้ำหมักพืช รวมทั้งสิ้น 90 ตัวอย่าง จากการศึกษาครั้งนี้แบคทีเรียแลคติกดังกล่าวจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ SS2, SK14 และ SK15 ได้รับการคัดเลือกเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก ทั้งนี้ การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวจากการศึกษาคุณลักษณะของโปรไบโอติกแบคทีเรีย โดยการทดลองในระดับหลอดทดลอง และในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งขั้นตอนการทดลองนั้นได้เรียงตามลำดับก่อนหลังเช่นเดียวกับโปรไบโอติกสำหรับใช้ในมนุษย์ ทั้งนี้ โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่ได้รับการคัดเลือกดังกล่าว สามารถทนต่อเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 ได้ และมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3 และ 4 โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ SS2 และ SK15 มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 50 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 รวมทั้งมีความสามารถในการใช้สารอาหาร โปรตีนและแป้ง และโปรไบโอติกดังกล่าวสามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนั้น โปรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่ต้องอาศัยวิตามินบี 12 ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อมนุษย์ สำหรับการเจริญ และภายใต้สภาวะต่างๆ ที่มีการควบคุมการสร้างกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเป็นเวลา 18 ชั่วโมงนั้น โดยวิธีการทดสอบ agar spot โปรไบโอติกดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนและแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารเป็นอีกวิธีที่ให้ความสนใจในการนำมาเป็นแนวทางการศึกษา ทั้งนี้ผลการทดสอบแสดงถึงผลการยับยั้งได้ร้อยละ 70 ถึง เกือบยับยั้งได้ทั้งหมด และผลการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ โปรไบโอ

ติกได้แสดงถึงความทนต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด กล่าวคือ vancomycin (30 mcg), bacitracin (10 mcg), gentamycin (10 mcg), kanamycin (30 mcg), streptomycin (10 mcg), norfloxacin (10 mcg) และ polymyxin B (300 mcg) และผลการเจริญในอาหารเพาะเลี้ยงเหลว MRS และ อาหารเพาะเลี้ยงที่ปราศจากส่วนผสมจากเนื้อสัตว์ คือ SPY2 นั้น โปรไบโอติกที่คัดเลือกได้ความสามารถเจริญในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งสองได้ โดยมีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกันมาก ($r > 0.8$) และในการศึกษาอัตราการเจริญของโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์นั้น SS2, SK14 และ SK15 มีช่วงเวลาการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า คือ 50.67, 58.85 และ 55.78 นาที ตามลำดับ และจากการเทียบเคียงชนิดพบว่า โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus plantarum* และนอกจากการทดสอบในระดับหลอดทดลอง แล้วยังได้ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในการศึกษาระดับสัตว์ทดลองต่อหนูถีบจักร ซึ่งพบว่ามีความปลอดภัย และการทดสอบการคงอยู่ในลำไส้เล็กของหนูถีบจักรโดยอาศัยวิธีการนับปริมาณแบคทีเรียแลคติกจากมูลของหนูทดลองที่ขับถ่ายออกมา และโดยวิธีการทาง flow cytometry ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการคงอยู่ในลำไส้เล็กของหนูถีบจักรได้อย่างน้อย 1 วัน และสามารถพบได้ตลอดความยาวของลำไส้เล็ก