

**Thesis Title** Probiotic *Lactobacillus plantarum* LCC 150 Isolated from Thai Fermented Food and Cholesterol Lowering Property of Its Fermented Soybean Milk Product

**Author** Miss Sasithorn Sirilun

**Degree** Doctor of Philosophy (Pharmacy)

**Thesis Advisory Committee**

Asst. Prof. Dr. Chaiyavat Chaiyasut	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Duangporn Kantachote	Co-advisor
Dr. Plearnpis Luxananil	Co-advisor

**ABSTRACT**

*Lactobacillus plantarum* LCC 150 isolated from som pak (pickle mixed leek, cabbage and pork skin) was the best to perform probiotic properties out of total 928 strains of lactobacilli which were isolated from 480 of Thai fermented food samples. *L. plantarum* LCC 150 showed the key probiotic properties such as survived in 0.30% (w/v) bile salt, tolerated to pH ranged 2-8, utilized the nutrients, against the growth of all seven microbial indicators. Moreover, the LCC 150 expressed the ability to obstruct the Caco-2 cell adherence of three bacterial pathogens such as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. with the percentages of inhibition ranged 52.13 to 74.39. For the preliminary safety tests, the

strain was susceptible to 9 antibiotics and was not detected alpha and beta haemolysis.

The  $\beta$ -glucosidase enzyme activity of LCC 150 was greater detected in extracellular form than cell bound form at the activity as  $0.524 \pm 0.007$  U/ml with the significantly ( $P < 0.05$ ) maximum at 24 h of bacterial growth. In addition, LCC 150 exhibited the bile salt hydrolase enzyme activity and showed the ability to decrease cholesterol from culture broth by active or viable cells were significantly ( $P < 0.05$ ) highest than non-active cells (dead and resting cells) with the reduction rate at 79.79%.

The LCC 150 was selected to produce fermented soybean milk and determined properties at 3 days fermented products. The results showed the appropriate levels of soybean milk ingredients, water extraction ratios at 11 per 1 part of soybean (w/w), initial inoculum of LCC 150 starter at 6 log cfu/ml and sucrose added to soybean milk at 10% (w/v) was the significantly ( $P < 0.05$ ) responded the maximum overall sensory score at  $6.95 \pm 0.69$  of sensory evaluation and exhibited maximum enhancing of total acidity at  $0.97 \pm 0.13$  (w/v), viable cell of starter at  $3.97 \pm 1.12$  log cfu/ml,  $\beta$ -glucosidase enzyme activity at  $3.362 \pm 0.057$  U/ml and isoflavone aglycones contents such as daidzein at  $1.582 \pm 0.124$  mg/100ml and genistein at  $1.324 \pm 0.066$  mg/100ml. The viable cells of LCC 150 with the concentration at least 6 log cfu/ml in fermented soybean milk and fermented soybean product's properties after 3-7 days fermentation could maintain in 2-8°C of storage for 1 month.

The LCC 150 and its fermented soybean milk were detected for the efficacy to reduce cholesterol in Sprague-Dawley rats. The level of serum

cholesterol, triglyceride, HDL and LDL cholesterol of normal rats within LCC 150 and its fermented soybean milk treated group compare to untreated group were reported with percentage of lowering ranged 1.10-2.21, 6.49-10.16, 2.35-10.63 and 2.98-4.08, respectively. In case of cholesterol supplemented rats, serum cholesterol, triglyceride and LDL cholesterol within treated group compare to untreated group were reported with percentage of lowering ranged 18.11-28.29, 21.39-27.63 and 22.64-26.56, respectively. Only HDL cholesterol was detected enhancing within cholesterol supplemented group with the percentage of increment as 8.38-21.96.

According to the results obtained in this research, the LCC 150 and its fermented soybean milk showed the probiotic property *in vitro* and cholesterol lowering property *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, the biotransformation activity of the strain which enhanced the isoflavone aglycones content in its fermented soybean milk products could be further carried out as selective way to use probiotic strain and its products in human who has high cholesterol problem, aging people and/or menopausal women.

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** โพรไบโอติก แลคโตบาซิลลัส แพลนทาร์ม LCC 150 ที่แยกจากอาหารหมักไทยและสมบัติลดโคเลสเตอรอลของผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองหมักที่ได้

**ผู้เขียน** นางสาวศศิธร ศิริคุณ

**ปริญญา** วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

ผศ.ดร. ไชยวัฒน์ ไชยสุด

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รศ.ดร. ดวงพร คันทโชติ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร. เพลินพิศ ลักษณะนิล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

**บทคัดย่อ**

แบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส แพลนทาร์ม LCC 150 แยกจากส้มฝักที่มีส่วนผสมของต้นหอม กระหล่ำปลี และหนังกหมู ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ผ่านการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกโดยคัดเลือกจากแบคทีเรียชนิดแลคโตบาซิลไลทั้งหมด 928 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากอาหารหมักคองของไทยจำนวน 480 ตัวอย่าง โดยแบคทีเรีย *L. plantarum* LCC 150 มีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่สำคัญ คือ การเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีร้อยละ 0.30 (มวลโดยปริมาตร) ความสามารถทนต่อสภาวะค่าความเป็นกรดต่างที่ 2 ถึง 8 ความสามารถในการใช้สารอาหาร การมีฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบสายพันธุ์มาตรฐาน 7 ชนิด นอกจากนี้ สายพันธุ์ LCC 150 สามารถยับยั้งการเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ของแบคทีเรียทดสอบชนิด เอสเซอริเซีย โคลไล ซาลโมเนลลา และ ชิเจลลา โดยมีค่าร้อยละของการยับยั้งเป็น 52.13 ถึง 74.39 และในการประเมินความปลอดภัย

เบื้องต้น พบว่า สายพันธุ์ดังกล่าวไม่แสดงการติดต่อยาปฏิชีวนะทดสอบ 9 ชนิด และตรวจไม่พบลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงชนิดแอลฟาและเบต้า

เมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของ LCC 150 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์สูงกว่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ต้องอาศัยเซลล์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $0.524 \pm 0.007$  หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งกิจกรรมเอนไซม์นี้ ตรวจพบสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ที่ 24 ชั่วโมงของการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ พบว่า LCC 150 มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไพล์ ซอลท์ ไฮโดรเลส และมีคุณสมบัติในการลดโคเลสเตอรอลที่ผสมในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งสามารถลดโคเลสเตอรอลโดยเซลล์ที่มีชีวิตได้สูงกว่าเซลล์ตายหรือเซลล์พักตัว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยการลดระดับโคเลสเตอรอลคิดเป็นค่าร้อยละเท่ากับ 79.79

แบคทีเรียสายพันธุ์ LCC 150 ถูกคัดเลือกเป็นต้นเชื้อผลิตนมถั่วเหลืองหมัก และศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ที่อายุหมัก 3 วัน จากผลการศึกษาที่ได้ พบว่า นมถั่วเหลืองหมักที่ผลิตโดยใช้ส่วนผสมน้ำในอัตราส่วน 11 ส่วน ต่อถั่วเหลือง 1 ส่วน ใช้ต้นเชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น  $6 \log \text{ cfu/มิลลิลิตร}$  และเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 ของนมถั่วเหลือง และหมักเป็นเวลา 3 วัน พบว่าเมื่อประเมินทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคต่อนมถั่วเหลืองหมักสูตรดังกล่าว พบว่ามีคะแนนการยอมรับโดยรวมสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ที่ค่า  $6.95 \pm 0.69$  และตรวจพบปริมาณกรดโดยรวมสูงสุดเท่ากับร้อยละ  $0.97 \pm 0.13$  (น้ำหนักโดยปริมาตร) ตรวจพบการเจริญของต้นเชื้อโดยมีการเพิ่มปริมาณสูงสุดเท่ากับ  $3.97 \pm 1.12 \log \text{ cfu/มิลลิลิตร}$  ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุดเท่ากับ  $3.362 \pm 0.057$  หน่วยต่อมิลลิลิตร และตรวจพบปริมาณไอโซฟลาโวน อะกลัยโคน ที่เป็น daidzein เท่ากับ  $1.582 \pm 0.124$  มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ genistein เท่ากับ  $1.324 \pm 0.066$  มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองหมักที่อายุหมัก 3-7 วัน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลาสูงสุด 1 เดือน จะยังคงรักษาสภาพของคุณสมบัติและสารสำคัญเหล่านี้ รวมทั้งปริมาณเซลล์แบคทีเรีย LCC 150 ยังคงเหลือรอดชีวิตไม่ต่ำกว่า  $6 \log \text{ cfu}$  ต่อมิลลิลิตร

เมื่อทดสอบความสามารถในการลดระดับโคเลสเตอรอลของสายพันธุ์ LCC 150 และผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองหมักที่ได้ ในหนูทดลอง Sprague-Dawley พบว่าในหนูทดลองกลุ่มปกติที่ถูกป้อนด้วยสายพันธุ์ LCC 150 และผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองหมักที่ได้มีปริมาณโคเลสเตอรอลโดยรวม ไตรกลีเซอไรด์ โคเลสเตอรอลชนิด เอชดีแอล และแอลดีแอล ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ

หนูที่ไม่ได้รับการป้องกันสายพันธุ์ LCC 150 และผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองหมักที่ได้ คิดเป็นค่าร้อยละ การลดระดับโคเลสเตอรอลเป็น 1.10-2.21, 6.49-10.16, 2.35-10.63 และ 2.98-4.08 ตามลำดับ ส่วน ในหนูกลุ่มที่ถูกทำให้มีโคเลสเตอรอลสูงนั้น พบว่า ในหนูทดลองที่ถูกป้องกันด้วยสายพันธุ์ LCC 150 และผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองหมักที่ได้มีปริมาณโคเลสเตอรอลโดยรวม ไตรกลีเซอไรด์ และ โคเลสเตอรอลชนิด แอลดีแอล ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับการป้องกันสายพันธุ์ LCC 150 และผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองหมักที่ได้ คิดเป็นค่าร้อยละการลดระดับโคเลสเตอรอลเป็น 18.11-28.29, 21.39-27.63 และ 22.64-26.56 ตามลำดับ ซึ่งมีเพียงปริมาณโคเลสเตอรอลชนิด เอชดีแอลที่ ตรวจพบมีระดับเพิ่มสูงขึ้นอยู่ในช่วงร้อยละ 8.38-21.96

จากผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ LCC 150 และผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองหมักที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ มีคุณสมบัติโพรไบโอติกจากการทดสอบในหลอดทดลอง และพบคุณสมบัติในการลดโคเลสเตอรอลทั้งในการทดสอบในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ คุณสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ในการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพที่สามารถเพิ่มปริมาณสารไอโซฟลาโวน อะกลัยโคนในผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองหมัก สามารถนำไปศึกษาต่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสายพันธุ์โพรไบโอติกและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโพรไบโอติกสายพันธุ์นี้ เพื่อใช้สำหรับผู้ที่ปัญหาโคเลสเตอรอลสูง ผู้สูงอายุ และ/หรือในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้ต่อไป