

Thesis Title	Selection of Oligosaccharides from Some Local Plants for Utilizing as Prebiotics	
Author	Mr. Pairote Wongputtisin	
Master of Science	Biotechnology	
Examining Committee	Lect. Dr. Chartchai Khanongnuch	Chairman
	Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Member
	Lect. Dr. Piyanuch Niamsup	Member

ABSTRACT

The objective of this research was investigation on the possibility for utilization of the oligosaccharides prepared from Thai-local plants as prebiotic substances.

Oligosaccharides from 6 local plants including 2 varieties of onion (*Allium cepa*) that were called Hom-hua-yai and Hom-kaek in Thai, hairy basil (Med-mang-luk; *Ocimum basilicum*), bael (Ma-toom; *Aegle marmelos*), cabbage (*Brassica oleracea*), and okra (Ka-jiep-keaw; *Abelmoschus esouletus*) were prepared with different methods depending on type of plants. The sugar extracted from cabbage, Hom-hua-yai, and Hom-kaek were small molecules with 1-10 DP and used directly as oligosaccharides for investigation on prebiotic properties. While sugar extracted from slime around hairy basil seeds, slime inside okra pods, and bael gum were large molecules with DP over 20, therefore, they were hydrolyzed to be oligosaccharide before using.

Investigation for prebiotic properties of prepared oligosaccharides was performed. *In vitro* study with defined microorganisms including *Lactobacillus casei*, *Pediococcus acidilactici*, and *Enterococcus faecium* as probiotics, *E. coli* as normal flora, and *Salmonella havana* as pathogenic bacteria was carried out as preliminary experiment. Cultivation of bacterial strains separately in basal medium containing each oligosaccharide as a sole carbon source showed that oligosaccharides prepared

from Hom-hua-yai, Hom-kaek, and Med-mang-luk exhibited the highest potential to be used as prebiotic and have to be studied in more details. TLC analysis was demonstrated and confirmed the oligosaccharide components in the sugar extracts prepared from those selected plants. According to the results from HPLC analysis, glucose and fructose were detected in the completely hydrolyzed oligosaccharides from Hom-hua-yai and Hom-kaek, while xylose, rhamnose, and galactose were detected in the hydrolyzed oligosaccharide prepared from Med-mang-luk.

Oligosaccharides prepared from three selected plants were investigated for an inhibitory effect on growth of pathogenic bacteria by cultivation of lactic acid bacteria in mixed cultures of five strains listed above. It was found that growth of *S. havana* and *E. coli* could be inhibited in basal medium containing those oligosaccharides as carbon source in mixed cultures study. While an inhibitory effect was not observed on growth of *S. havana*, and *E. coli*, in the inhibition test on agar plate with culture broth of lactic acid bacteria grew in medium containing different oligosaccharide as a sole carbon source.

Addition of 0.7%(w/v) of prepared oligosaccharides separately as a sole carbon source for cultivation in human fecal slurry medium comparing to glucose addition was performed. Microbial population difference between 0 and 12 h cultivation were evaluated as log(cfu/g feces). The results showed that lactic acid bacteria numbers were increased significantly ($p < 0.05$) in all groups, Enterobacteriaceae were also increased significantly ($p < 0.05$) in group that added with oligosaccharide from Med-mang-luk, while increasing non-significantly ($p < 0.05$) was observed in glucose, Hom-hua-yai, and Hom-kaek addition groups. Significantly reduction ($p < 0.05$) in numbers of *Salmonella-Shigella* spp. was obtained in Hom-hua-yai, Hom-kaek, and Med-mang-luk groups, while non-significantly increasing ($p < 0.05$) was obtained in glucose addition group.

In vivo study with male Wistar rats was investigated. Oligosaccharides and glucose were daily administered to rat with 150 mg/day dose by force feeding for 21 days with water administration as a control group. The results showed that FCR value of oligosaccharide feeding groups was higher than that of glucose feeding group, but lower than the control. The dynamic of microbial population in rat feces showed that total lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae, and *Salmonella-Shigella* spp. were not clearly affected by oligosaccharides administration. From blood analysis of rats, it was found that blood glucose and cholesterol level were not also affected by oligosaccharides administration.

According to the selectively promotion on lactic bacteria growth and unabsorbed character in host gastrointestinal system, it could be concluded that oligosaccharides prepared from Hom-hua-yai, Hom-Kaek, and Med-mang-luk have potential to be used as prebiotic substances.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชในท้องถิ่นบางชนิดเพื่อใช้เป็นสารพรีไบโอติก	
ชื่อผู้เขียน	นายไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน	
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	อ.ดร. ชาดิชาช โจนงนุช	ประธานกรรมการ
	รศ.ดร. สายสมร ถ้ายอง	กรรมการ
	อ.ดร. ปิยะนุช เนียมทรัพย์	กรรมการ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ประโยชน์ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมจากพืชในท้องถิ่นของประเทศไทย เป็นสารพรีไบโอติก

ทำการเตรียม โอลิโกแซคคาไรด์จากพืชในท้องถิ่นจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ หัวหอม (*Allium cepa*) สองสายพันธุ์ คือหอมหัวใหญ่ และหอมแขก (*Allium cepa*) แมงลัก (*Ocimum basilicum*) มะตูม (*Aegle marmelos*) กะหล่ำปลี (*Brassica oleracea*) และกระเจี๊ยบเขียว (*Abelmoschus esouletus*) โดยวิธีการที่ใช้เตรียมขึ้นกับชนิดของพืช พบว่าคาร์โบไฮเดรตที่สกัดได้จากกะหล่ำปลี หอมหัวใหญ่ และหอมแขกเป็นน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก โดยมีค่า DP อยู่ในช่วง 1-10 ซึ่งเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกได้โดยตรง ในขณะที่คาร์โบไฮเดรต หรือน้ำตาลที่สกัดได้จากเมื่อกรอบเมล็ดแมงลัก เมือกในฝักกระเจี๊ยบเขียว และยางจากผลมะตูม นั้นมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ โดยมีค่า DP มากกว่า 20 ดังนั้นจึงต้องมีการย่อยให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ก่อนที่จะนำไปศึกษาต่อไป

ในการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมได้ ในขั้นต้นเป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ โดยโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมได้จะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus casei*, *Pediococcus acidilactici* และ *Enterococcus faecium* จุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหารทั่วไปคือ *E. coli* และจุลินทรีย์ก่อโรคคือ *Salmonella havana* ผลการทดลองพบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมจาก

หอมหัวใหญ่ หอมแขก และเมล็ดแมงลัก สามารถกระตุ้นให้มีการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกได้ดี และจัดเป็นสารที่มีศักยภาพที่อาจจะสามารถใช้เป็นสารพรีไบโอติกได้ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาในขั้นต่อไป ผลการวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) พบว่าคาร์โบไฮเดรตที่เตรียมจากพืชทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวมีโอลิโกแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบหลัก และนอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโดย HPLC พบว่าน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสเป็นองค์ประกอบหลักในโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมจากหอมหัวใหญ่ และหอมแขก ในขณะที่โอลิโกแซคคาไรด์จากเมล็ดแมงลักพบน้ำตาลไซโลส แรมโนส และกาแลคโตส เป็นองค์ประกอบสำคัญ

ทำการทดสอบใช้โอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมได้จากพืชทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวข้างต้นในการศึกษาถึงคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเชื้อจุลินทรีย์แลคติกในการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดข้างต้น ผลการทดลองพบว่าการเจริญของ *S. havana* และ *E. coli* สามารถถูกยับยั้งโดยจุลินทรีย์แลคติกที่เจริญในอาหารที่ประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์เหล่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่การทดสอบบนอาหารวุ้นโดยใช้น้ำเลี้ยงจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แลคติกที่เจริญในอาหารที่ประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์เหล่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอน ไม่พบผลการยับยั้งการเจริญของ *S. havana* และ *E. coli*

Fecal slurry จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรงถูกนำมาใช้เป็นแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากธรรมชาติ โดยมีการเติมโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมได้ลงไปในปริมาณ 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับการเติมน้ำตาลกลูโคส ทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มระหว่างชั่วโมงที่ 0 และ 12 ในรูปค่า $\log(\text{cfu/ กรัม feces})$ ผลการทดลองพบว่า จำนวนจุลินทรีย์แลคติกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในทุกกลุ่มทดลอง ส่วนจำนวน Enterobacteriaceae นั้นมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในกลุ่มที่เติมโอลิโกแซคคาไรด์จากเมล็ดแมงลัก ในขณะที่อีก 3 กลุ่มมีการเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จำนวนของ *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ลดลงในกลุ่มที่เติมโอลิโกแซคคาไรด์จากหอมหัวใหญ่ หอมแขก และเมล็ดแมงลัก อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่พบการเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในกลุ่มที่เติมกลูโคส

จากการศึกษาในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar จะมีการป้อน โอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาล กลูโคสแก่หนูทุกวันวันละ 150 มิลลิกรัม เป็นเวลา 21 วันโดยวิธี force feeding และมีการป้อนน้ำเปล่าในกลุ่มควบคุม ผลการทดลองพบว่าค่าอัตราการแลกเนื้อ (FCR) ในกลุ่มที่มีการป้อน โอลิโกแซคคาไรด์มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ป้อนกลูโคส แต่มีค่าน้อยกว่ากลุ่มที่ป้อนน้ำเปล่าการเปลี่ยนแปลง ประชากรของจุลินทรีย์ในมูลหนู พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ไม่มีผลต่อจำนวน Total lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae และ *Salmonella-Shigella* spp. จากการวิเคราะห์เลือดของหนูทดลอง พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ไม่มีผลต่อระดับกลูโคสและโคเลสเตอรอลในเลือดเช่นกัน

จากการที่โอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมได้สามารถเร่งการเจริญของแบคทีเรียแลคติก และเป็น สารที่ไม่สามารถถูกย่อยและดูดซึมในระบบทางเดินอาหารได้ ทำให้สามารถสรุปได้ว่า โอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมจากหอมหัวใหญ่ หอมแขก และเมล็ดแมงลัก มีศักยภาพที่จะใช้เป็นสารพรีไบโอติกได้