

Thesis Title Effect of Some Phytonutrients on the Antimicrobial
Activity Against *Vibrio parahaemolyticus* *in vitro*
After Synbiotic Cultured with the Potent
Lactobacillus

Author Mr. Yothin Kumsang

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Dr. Siriwoot Sookkhee Chairperson
Asst. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn Member
Dr. Somphob Leetachewa Member

ABSTRACT

The aim of present study was to screen and identify the antimicrobial-producing lactic acid bacteria (LAB), prepare the phytonutrient extract and then culture with such LAB, select the potent synbiotics and characterize the active substances contained in these synbiotics. Among 584 LAB isolates, 3 isolates possessed the strong inhibitory activity against the tested pathogenic bacteria. They, namely 87/6, 9/5 and 89/4, were identified to be *Lactobacillus curvatus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *L. plantarum*, respectively. Seventy three synbiotics of each lactobacillus isolate cultured with the selected phytonutrient extracts were performed and determined for their antimicrobial activities against *Vibrio parahaemolyticus*.

Strong antimicrobial activities were shown in the cell-free supernatant harvested from the synbiotics of *L. curvatus* 87/6 with nashi pear, *L. paracasei* subsp. *paracasei* 9/5 with purple table grapes, and *L. plantarum* 89/4 with sapodilla. Their inhibition zones were demonstrated after tested by agar-cup diffusion. The increases of lactobacillus growth in these synbiotic cultures were also exhibited. The large productions of lactic acid and hydrogen peroxide could be found in the synbiotics of *L. paracasei* subsp. *paracasei* 9/5 cultured with purple table grapes. In addition, high total protein concentrations could be detected in the cell-free supernatants of these synbiotics. The highest protein yield was demonstrated from the protein extract of *L. curvatus* 87/6 cultured with nashi pear. After compared between the proteins extracted from the synbiotic and lactobacillus cultures, different protein patterns on SDS-PAGE gels were observed. It may be suggested that some phytonutrient extracts possessed the prebiotic effect to increase the growth and antimicrobial activity of the potent bacteria in the synbiotic cultures. The increase of the activity may be due to such different proteins which supposed to be the antimicrobial proteins or bacteriocins. They should be carried out to purify, characterize and identify in the further proteomic study.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ผลของสารอาหารบางชนิดจากพืชต่อฤทธิ์ต้านจุลชีพ

Vibrio parahaemolyticus ในหลอดทดลองภายหลังการ

เพาะเลี้ยงร่วมกับแลคโตบาซิลลัส

ผู้เขียน

นายโยธิน คำแสง

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร. ศิริวุฒิ สุขจี

ประธานกรรมการ

ผศ. ดร. สุมาลี พุกษากร

กรรมการ

ดร. สมภพ ลีตะชีวะ

กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรอง และจำแนกชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารต้านจุลชีพ เตรียมสารอาหารจากพืช และเพาะเลี้ยงร่วมกับแลคติกแอซิดแบคทีเรียข้างต้น คัดเลือกซินไบโอติกที่ดี และศึกษาคุณลักษณะของสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในซินไบโอติก ในจำนวนเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 584 ไอโซเลท พบว่า 3 ไอโซเลทมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบ

ดีที่สุด เชื้อเหล่านี้ได้แก่ 87/6 9/5 และ 89/4 ซึ่งจำแนกได้เป็น *Lactobacillus curvatus* *L. paracasei* subsp. *paracasei* และ *L. plantarum* ตามลำดับ ซินไบโอติกจำนวน 73 ชนิดของเชื้อแต่ละ

ไอโซเลทเพาะเลี้ยงร่วมกับสารอาหารสกัดจากพืชที่คัดเลือกได้ถูกเตรียมและทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อ *Vibrio parahaemolyticus* ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ตีพบได้ในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์จากซินไบโอติกของ *L. curvatus* 87/6 กับสาเล่หิมะ *L. paracasei* subsp. *paracasei* 9/5 กับองุ่นม่วง และ *L. plantarum* 89/4 กับละมุด โดยแสดงขอบเขตของการยับยั้งที่กว้างภายหลังการทดสอบด้วยวิธีอะการ์ คัพ ดิฟฟิวชัน มีการเจริญของแลคโตบาซิลลัสที่เพิ่มขึ้นในการเพาะเลี้ยงแบบซินไบโอติก การผลิตกรดแลคติก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีปริมาณมากในซินไบโอติกระหว่าง *L. paracasei* subsp. *paracasei* 9/5 กับองุ่นม่วง นอกจากนี้ยังพบความเข้มข้นที่สูงโปรตีนรวมในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของซินไบโอติกเหล่านี้ และผลิตภัณฑ์โปรตีนสุทธิสูงสุดพบได้ในสารสกัดโปรตีนของ *L. curvatus* 87/6 กับสาเล่หิมะ หลังจากการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดโปรตีนจากซินไบโอติก และจากการเพาะเลี้ยงแลคโตบาซิลลัสพบว่ามีรูปแบบโปรตีนบนเจล SDS-PAGE ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาจากกล่าวได้สารอาหารสกัดจากพืชเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นโปรไบโอติกในการเพิ่มการเจริญและเพิ่มฤทธิ์ต้านจุลชีพของแลคโตบาซิลลัสที่เพาะเลี้ยงร่วมแบบซินไบโอติก ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นผลมาจากโปรตีนที่แตกต่างกันดังกล่าวซึ่งอาจเป็นโปรตีนต้านจุลชีพหรือแบคทีริโอซิน โปรตีนเหล่านี้ควรนำไปทำให้บริสุทธิ์ ศึกษาคุณลักษณะ และวิเคราะห์ชนิดโปรตีนในระดับโปรตีโอมิกส์ต่อไป