

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของ โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยก
จากอาหารหมักพื้นบ้าน
ผู้เขียน นางสาวจุไรรัตน์ ร่วมพันธ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2550

บทคัดย่อ

การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักพื้นบ้านจำนวน 52 ตัวอย่าง โดยวิธี Sandwich test สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินคิเคเตอร์ (*Staphylococcus aureus*) ได้ทั้งหมดจำนวน 230 สายพันธุ์ เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกเหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Broth microdilution assay พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 55 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งได้สูง โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50 AU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi และ *Vibrio parahaemolyticus* พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 8 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งได้สูง คือมีกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 25 AU ต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินคิเคเตอร์ได้ในช่วงกว้าง เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสภาวะที่มีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และลคอิทธิพลของกรดอินทรีย์ พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกได้เพียง 1 สายพันธุ์ ที่แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินคิเคเตอร์ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบและให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งได้สูงที่สุด (20 AU ต่อมิลลิลิตร) เมื่อทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ดังกล่าวคือ *Lactobacillus plantarum* JR21 เมื่อศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นและความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JR21 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 และระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-6 เชื้อมีการเจริญและให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งได้สูง (20 AU ต่อมิลลิลิตร) โดยสารยับยั้งที่ *Lactobacillus plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนได้สูงสุดถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีความคงตัวต่อค่าพีเอชในช่วง 2.0-10.0 ได้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินคิเคเตอร์ภายหลังการทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน อาทิ proteinase K, α -chymotrypsin, trypsin และ pronase E จากการทดสอบคุณสมบัติการเป็น โปรไบโอติกของ *Lactobacillus plantarum* JR21 พบว่าภายหลัง

การทดสอบเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เชื่อสามารถรอดชีวิตได้คือที่ค่าพีเอช 3.0 (6.47 log CFU ต่อมิลลิลิตร) และสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ระคายความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (8.59 log CFU ต่อมิลลิลิตร) และ ร้อยละ 0.3 (7.32 log CFU ต่อมิลลิลิตร) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินคิเคเตอร์ พบว่า *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar Typhi และ *Escherichia coli* ได้อย่างสมบูรณ์ที่เวลา 24 ชั่วโมง

Thesis Title Screening and Characterization of Probiotic Lactic Acid Bacteria
Isolated from Traditional Fermented Foods

Author Miss Jurairat Ruampan

Major Program Biotechnology

Academic Year 2007

ABSTRACT

A total of 52 samples of various traditional fermented foods were screened for lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Staphylococcus aureus* using the "Sandwich" test method. Two hundred and thirty of nonmotile, Gram-positive and catalase-negative colonies were scored positive as they produced clear zones of inhibition against indicator strain on agar media. When broth microdilution assay was performed to screen for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, a total of 55 lactic acid bacteria exhibited high level (50 AU/ml) of the minimum inhibitory concentration (MIC) were selected. Eight strains showed a broad inhibitory spectrum against pathogens including *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Vibrio parahaemolyticus* with the MIC of 25 AU/ml. However, the strain JR21 was the only isolate that displayed the highest level of inhibition (20 AU/ml) under the condition that eliminated hydrogen peroxide and decreased the effects of organic acids. According to the biochemical reaction together with the nucleotide sequence analysis of 16S rDNA, the strain JR21 was identified as *Lactobacillus plantarum* JR21. The effects of initial pH and concentration of NaCl in MRS broth on growth and antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* JR21 were investigated. MRS broth with initial pH 6.5 containing of 0-6 % NaCl showed the best results in bacterial growth and antibacterial activity. The antibacterial substances were stable to heat at 121 °C for 15 min and were stable to pH range of 2.0-10.0 for 2 h. However, the antibacterial activity of the supernatant was not affected by proteolytic enzymes including proteinase K, α -chymotrypsin, trypsin and pronase E. The probiotic potential including acid and bile salt tolerance were also investigated. *Lactobacillus plantarum* JR21 was able to survive at pH 3.0 as well as 0.15 and 0.3% bile salt for 4 h. When coculture study was conducted to investigate the antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Escherichia coli* in the presence of

Lactobacillus plantarum JR21, the complete inhibitions against all pathogens tested were observed at 24 h.