**รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์**

# การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกทีมีสมบัติโปรไบโอติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตสะตอดอง

# Isolation and Screening of Probiotic Lactic Acid Bacteria for Use as Starter Culture for Fermented Stinky Bean Production (*Sa Taw Dong*)

**รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์**

**โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย**

**มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

**ประจำปีงบประมาณ 2554-2555 รหัสโครงการ AGR540686S**

**รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์**

# การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติโปรไบโอติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตสะตอดอง

# Isolation and Screening of Probiotic Lactic Acid Bacteria for Use as Starter Culture for Fermented Stinky Bean Production (*Sa Taw Dong*)

**รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์**

**โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย**

**มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

**ประจำปีงบประมาณ 2554-2555 รหัสโครงการ AGR540686S**

**ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย)** การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติโปรไบโอติก เพื่อใช้เป็นกล้าเชื่อในการผลิตสะตอดอง

**(ภาษาอังกฤษ)** Isolation and Screening of Probiotic Lactic Acid Bacteria for Use as Starter Culture for Fermented Stinky Bean Production (*Sa Taw Dong*)

**ชื่อคณะผู้วิจัย:**

หัวหน้าโครงการ: รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
โทรศัพท์ : 66-74-446728
E-mail : suppasil.m@psu.ac.th

**สารบัญ**

**หน้าที**

สารบัญ..... (3)
รายการตาราง..... (5)
รายการภาพประกอบ..... (6)
กิตติกรรมประกาศ..... (7)
บทคัดย่อ..... (8)
บทที
1. บทนำ
บทนำ..... 1
บทตรวจเอกสาร..... 4
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย..... 31
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ
วัสดุ และอุปกรณ์..... 32
วิธีการทดลอง..... 34
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง
1.การทดสอบความปลอดภัยทางด้านเคมีและจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์สะตอดอง..... 46
2.การทดสอบคุณภาพทางด้านเคมีและจุลชีววิทยาของสะตอดองระหว่างการหมัก..... 47
3.การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากสะตอดองเบื้องต้น..... 52
4.การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก..... 53
5.การหา Time course ของการเจริญของแบคทีเรียแลกติก..... 70
6.การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติก..... 71
7.การเปรียบเทียบสะตอดองที่ได้จากการผลิตแบบดั่งเดิมและการใช้กล้าเชื่อ..... 75
4. สรุปผลการทดลอง..... 81

**สารบัญ (ต่อ)**

**หน้าที**

เอกสารอ้างอิง……..... 82

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก……..... 97

ภาคผนวก ข……..... 101

# รายการตาราง

**ตารางที่** **หน้า**


1. Species of lactic acid bacteria, which were isolated from raw or spontaneously fermented vegetables and fruit..... 7
2. Contamination and spoilage yeast recovered from foods and beverages…...… 28
3. Principal spoilage effects caused by yeast activity in foods……... 30
4. Primers used in RFLP-PCR …… 42
5. The number of isolates inhibited pathogenic bacteria isolated from *Sa Tow Dong* using overlay method…….. 52
6. Survival rate of selected lactic acid bacteria isolated from *Sa Tow Dong* in the presence of 0.3% bile salt and pancreatin (1 mg/ml) at pH 8.0 after sequential incubation in simulated gastric juice (pH 3)…… 55
7. Specific growth rates of selected lactic acid bacteria bacteria cultivated under microaerobic and anaerobic conditions …….. 61
8. Bile salt hydrolase activity of lactic acid bacteria on MRS agar containing 0.05% L-cysteine and 5 mg/ml bile salts ……..... 64
9. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria using agar spot test …… 67
10. Cholesterol reduction and cell surface hydrophobicity of selected lactic acid bacteria.……..……. 69
11. BLAST results of selected lactic acid bacteria.……...…… 73
12. Microbial population during stink bean fermentation.…… 78
13. Mean scores obtained in the sensory analysis of stink bean fermentation……. 80

# รายการภาพประกอบ

**ภาพที่** **หน้า**


1. pH vaules, total acidity (%) and NaCl concentration (%) of finished *Sa Tow Dong* products in local markets around Hatyai areas…… 47
2. Changes in microbial counts during the fermentation of *Sa Tow Dong*…… 49
3. Determination of Enterobacteriaceae and suspected *S. aureus* in samples during fermentation of *Sa Tow Dong*..…….…….. 50
4. Changes in pH and total acidity (%) during the fermentation of *Sa Tow Dong* 51
5. The pH and total acidity (%) of selected lactic acid bacteria…….. 57
6. Growth curves of lactic acid bacteria cultivated under microaerobic and anaerobic conditions……..... 60
7. Positive plate of bile salt hydrolase activity on MRS agar containing 0.05% L-cysteine and 5 mg/ml glycodeoxycholate …… 63
8. Agar spot test showing antimicrobial activity of lactic acid bacteria ……. 66
9. Growth curve and pH of strain 0/7 in MRS broth …… 71
10. Cluster analysis of RAPD-PCR profiles of lactic acid bacteria by BioNumerics trial versions 7.1…… 74
11. PCR products obtained from multiplex PCR assay …… 75
12. Changes of lactic acid bacteria population and pH values during stink bean fermentation.……..... 76

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2554-2555

รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## บทคัดย่อ

นำสะตอดองจำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ซื่อจากตลาดในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา มาวิเคราะห์หาค่าพีเอช ปริมาณกรดทั่งหมด และปริมาณเกลือ พบว่าสะตอดองมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.5 – 4.0 ปริมาณกรดทั่งหมดอยู่ในช่วง 0.5 – 0.8 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเกลืออยู่ในช่วง 2.0 – 7.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำตัวอย่างสะตอดองมาตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเชื่อจุลินทรีย์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* พบว่าไม่พบเชื่อ *S. aureus* และ *E. coli* ในตัวอย่างสะตอดองทั่งหมด แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างสะตอดองทั่งหมดมีคุณภาพผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของสะตอดองปี พ.ศ. 2547 (มผช. 317/2547)

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมี และทางด้านจุลชีววิทยาในระหว่างการหมักสะตอดอง พบว่าพีเอชของสะตอดองมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจาก 4.0 เหลือ 3.5 ในระยะเวลา 3 วันแรกของกระบวนการหมัก และคงทีจนกระทังสิ่นสุดกระบวนการหมัก ในขณะทีปริมาณกรดทั่งหมดจะเพิมขึ่นจาก 0.08 เป็น 0.43 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 6 วันแรกของกระบวนการหมัก จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื่อแบคทีเรียแลกติก พบว่าจำนวนแบคทีเรียแลกติกจะเพิมขึ่นอย่างรวดเร็วใน 2 วันแรกของการหมัก จาก 7.3 เป็น 8.3 logCFU/ml จากนั่นจำนวนแบคทีเรียแลกติกจะคงทีทีประมาณ 8 logCFU/ml จนกระทังสิ่นสุดกระบวนการหมัก จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากตัวอย่างสะตอดอง พบแบคทีเรียแลกติกจำนวน 238 ไอโซเลต ทีให้กิจกรรมการยับยั่งต่อเชื่อ *S. aureus* และ *E. coli* และมีเพียงแบคทีเรียแลกติก 50 ไอโซเลตให้โซนของการยับยังกว้างทีสุดมากกว่า 7 มิลลิเมตร โดยวิธีการ agar spot และจะนำไปศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกต่อไป

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั่ง 50 ไอโซเลตทีคัดเลือกได้ไปศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ได้แก่ การทนต่อสภาวะทางเดินอาหารในระดับหลอดทดลอง การผลิตกรดอินทรีย์ การเจริญในสภาวะทีมีออกซิเจนน้อย และไม่มีออกซิเจน กิจกรรมของเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) การยับยั่งเชื่อจุลินทรีย์ การลดคอเลสตอรอล และการเกาะติดโดยวิธี cell surface

hydrophobicity พบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 19 ไอโซเลต มีคุณสมบัติทนต่อสภาวะทางเดินอาหารในระดับหลอดทดลอง โดยมีจำนวนลดลงน้อยกว่า 1 logCFU/ml ในขณะที่มีแบคทีเรียแลกติก 18 ไอโซเลต ทีลดพีเอชของอาหารเลี่ยงเชื่อลงเหลือพีเอช 4.0 และมีปริมาณกรดทั่งหมดมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยได้ดีกว่าในสภาวะไม่มีออกซิเจน ถึงแม้ว่าแบคทีเรียแลกติก 7 ไอโซเลต มีกิจกรรมของเอนไซม์ BSH แต่มีแบคทีเรียแลกติกเพียง 5 ไอโซเลต ทีสามารถยับยั้งเชื่อจุลินทรีย์ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *E. coli, Listeria monocytogenes, S. aureus* และ *Candida sorphophila* โดยไอโซเลต S0/7 สามารถลดคอเลสตอรอลได้ 92 เปอร์เซ็นต์ และให้ค่าการเกาะติดโดยวิธี cell surface hydrophobicity ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต S0/7 เป็นเชื่อแบคทีเรียแลกติกทีมีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกทีดีทีสุดในการเป็นกล้าเชื่อเพือหมักสะตอดอง

จากการแยกความแตกต่างของแบคทีเรียแลกติก 19 ไอโซเลต ทีมีคุณสมบัติทนต่อสภาวะทางเดินอาหารในระดับหลอดทดลอง โดยเทคนิค random amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction (RAPD-PCR) พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีการ RAPD-PCR ได้ทั่งหมด 3 กลุ่ม และเมือทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกทั่ง 5 ไอโซเลต ทีมีคุณสมบัติในการยับยั่งเชื่อจุลินทรีย์ได้ดี ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บนสาย 16S rDNA และเทคนิค multiplex PCR พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั่ง 5 ไอโซเลต ได้แก่ E1/18, E5/6, S0/3, S0/7 และ S5/7 มีความใกล้เคียงกับเชื่อ *Lactobacillus plantarum*

เมือเปรียบเทียบการนำเชื่อ *L. plantarum* S0/7 มาใช้เป็นกล้าเชื่อในการหมักสะตอดองทีปริมาณต่างกัน ได้แก่ $10^3$ และ $10^6$ CFU/ml กับชุดทีไม่มีการใช้กล้าเชื่อ พบว่าการใช้กล้าเชื่อ *L. plantarum* S0/7 ปริมาณ $10^6$ CFU/ml ให้การหมักสะตอดองทีดีทีสุด เพราะสามารถลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลง และสามารถยับยั่งการเจริญของเชื่อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในระหว่างกระบวนการหมัก นอกจากนี่ชุดทีใช้กล้าเชื่อ *L. plantarum* S0/7 ปริมาณ $10^6$ CFU/ml ให้ผลการยอมรับของผู้บริโภคทีดีทีสุด จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเชื่อ *L. plantarum* S0/7 มีศักยภาพการเป็นโปรไบโอติกในการใช้เป็นกล้าเชื่อในการหมักสะตอดอง

**ABSTRACT**

The pH, titratable acidity (TA) and salt content of *Sa Tow Dong* samples obtained from retail markets of Hat Yai District, Songkhla Province ranged from 3.5-4.0, 0.5-0.8% and 2-7%, respectively. Neither *Staphylococcus aureus* nor *Escherichia coli* found in all *Sa Tow Dong* samples. It indicates that *Sa Tow Dong* passed for safety and quality regarding to Thai Community Product Standard (TCPS 317/2547).

Chemical and microbiological changes during fermentation of *Sa Tow Dong* were studied. The pH dramatically decreased from 4.0 to 3.5 on the day 3 of fermentation and remained stable until the end of fermentation. On the other hand, TA increased from 0.08 to 0.43% on the day 6 of fermentation. In addition, the number of lactic acid bacteria (LAB) sharply increased in the day 2 of fermentation (7.3 to 8.3 logCFU/ml) and the number of LAB remained stable at about 8 logCFU/ml until the end of fermentation. A total of 238 LAB isolated from *Sa Tow Dong* showing antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* were collected. Among these, 50 isolates exhibited the inhibition zone larger than 7 mm using agar spot test and were further screened for the probiotic properties *in vitro*.

Fifty isolates of LAB were evaluated for probiotic potential with tolerance to transit gastrointestinal tract *in vitro*, the ability to produce organic acid, the growth under microaerobic and anaerobic conditions, bile salt hydrolase (BSH) activity, antimicrobial activity, cholesterol reduction and cell surface hydrophobicity. Nineteen isolates were tolerant to transit gastrointestinal tract *in vitro*. They decreased less than 1 logCFU/ml after passing through the gastrointestinal condition. Eighteen isolates showed the highest acid production (pH 4.0 and TA of more than 1%) after 24 h of incubation. In addition, all 18 isolates grew in microaerobic condition faster than anaerobic conditions. Although 7 isolates exhibited BSH activity, only 5

isolates were able to inhibit against *Bacillus cereus*, *E. coli, Listeria monocytogenes, S. aureus* and *Candida sorphophila*. Strain S0/7 showed significantly cholesterol reduction (92%) and cell surface hydrophobicity (about 20%). Strain S0/7 showed the best probiotic potential for use in fermentation of *Sa Tow Dong.*

The random amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction (RAPD-PCR) with specific primer were used to evaluate the difference of 19 isolates of LAB showing tolerance to transit gastrointestinal tract *in vitro*. The RAPD-PCR patterns of all 19 LAB isolates could differentiate them to three different clusters. Based on 16S rDNA sequence and multiplex PCR assay, five isolates (E1/18, E5/6, S0/3, S0/7 and S5/7) showing the best antimicrobial activity were identified as *Lactobacillus plantarum*.

*Sa Tow Dong* was produced using *L. plantarum* S0/7 ($10^3$ and $10^6$ CFU/ml) as a starter culture compared with spontaneous process. Using of *L. plantarum* S0/7 at $10^6$ CFU/ml was a suitable starter culture for *Sa Tow Dong* fermentation. It could reduce the fermentation time and able to inhibit the growth of coliform during fermentation process. In addition, it produced a good sensory acceptability. From the results, *L. plantarum* S0/7 can be a potential probiotic to use as starter culture in *Sa Tow Dong* fermentation.