ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือก ลักษณะ และคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติกจากสัตว์ทะเล

ชื่อผู้เขียน นางสาวนันทินา เชิญทอง

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2549

บทคัดย่อ

จากการแยกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารสัตว์ทะเลได้แก่ กุ้ง หอย และปลา ทั้งหมด 14 ตัวอย่างโดยใช้อาหาร MRS ที่เติมน้ำตาล กลูโคส ซูโครส แลคโตส และ ฟรุคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้สี Ruthenium red เป็นสารตรวจสอบการผลิต EPSs ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิต EPSs ได้ 67 สายพันธุ์ซึ่งมีจำนวนใกล้เคียงกันระหว่างสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนโดยพบร้อยละ 52.24 และ 47.76 ตามลำดับ โดยสามารถคัดแยกได้โดยใช้อาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงที่สุดคือร้อยละ 40.27 จากจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้ หลังจากนั้นได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต EPSs ได้สูงโดยใช้อาหารเหลวเพื่อจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ 16S rDNA พบว่าเป็น *Weissella cibaria* A2, *Weissella confusa* A9, *Lactobacillus plantarum* A3 และ *Pediococcus pentosaceus* 5S4 โดยสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิต EPSs ได้ปริมาณ 14, 7.6, 4.9 และ 7 กรัมต่อลิตรตามลำดับโดย EPSs ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลในส่วนที่ละลายเป็น 6120, 5899, 1515 และ 5577 ดาลตัน ตามลำดับโดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว เมื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของ EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 , *W. confusa* A9 , *L. plantarum* A3 และ *P. pentosaceus* 5S4 ในสภาวะกรดสูง (พีเอช 1 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง) และการทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase (1 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง) ซึ่งเป็นการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กตามลำดับ พบว่า EPSs ทั้งหมดสามารถทนต่อการย่อยได้ดีมากโดยมี EPSs มากกว่าร้อยละ 95 สามารถเหลือไปยังลำไส้ใหญ่ได้ เมื่อทดสอบการส่งเสริมการเจริญแบคทีเรียโปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* พบว่า *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ไม่สามารถนำ EPSs ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้โดย *B. bifidum* เท่านั้นที่เจริญได้ในอาหารที่ใช้ EPSs เป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่า EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2 ส่งเสริมการเจริญได้ดีที่สุดโดย *B. bifidum* เพิ่ม

จำนวนจาก 6.17 เป็น 7.54 Log cellต่อมิลลิลิตรและเมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยง *B. bifidum* มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันสายสั้นได้แก่ อะซิติก โพรพิออนิกและ กรดบิวทาริกพบว่ามีการสร้างกรดอะซิติก เป็นหลักและรองลงมาเป็น กรดโพรพิออนิก โดยมีการผลิตกรดบิวทาริกน้อยที่สุดโดยผลิตได้0.159, 0.168, 0.159 และ0.166 mM เมื่อใช้ EPSs ที่ผลิตโดย *W. cibaria* A2, *W. confusa* A9, *L. plantarum* A3 และ *P. pentosaceus* 5S4 เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อนำส่วนใสของน้ำหมักดังกล่าวมาทดสอบกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Staphyolococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. และ *Escherichia coli* พบว่าไม่พบกิจกรรมการยับยั้ง และเมื่อทดสอบเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *B. bifidum* กับแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Stap. aureus*, *Salmonella* Typhi และ *E. coli* โดยใช้ EPSs ทั้ง 4 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ

Thesis Title	Screening, Characterization and Prebiotic Properties of Exopolysaccharides (EPSs) from Lactic Acid Bacteria isolated from Marine Fish
Author	Miss Nantina Cherntong
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2006

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) producing exopolysaccharides (EPSs) were isolated from gastrointestinal tract of fish, shrimp and shellfish using ruthenium red (RR) (0.08 g/l) containing MRS agar under aerobic and anaerobic condition. Sixty-seven EPSs producing strains were isolated from 4 different carbon sources of glucose, fructose, sucrose and lactose and 40.27 % of them were isolated from sucrose containing MRS agar. Addition of ruthenium red in agar plate increased the sensitivity of the EPSs detection. The selected strains showed high EPSs production yields of 14, 7.6, 4.9 and 5 g/l in sucrose containing MRS broth and they were identified as *Weissella cibaria* A2, *Weissella confusa* A9, *Lactobacillus plantarum* A3 and *Pediococcus pentosaceus* 5S4, respectively based on their 16S rDNA sequences. EPSs produced by *W. cibaria* A2, *W. confusa* A9, *L. plantarum* A3 and *P. pentosaceus* 5S4 were tested for the resistance to acidic (pH 1 for 4 h) and enzymatic hydrolysis (which was mimic the condition of upper-gastrointestinal tract in humans). All of EPSs were not hydrolyzed by either HCl buffer pH 1 for 4 h or human pancreatic α-amylase (1U/ml at 37 ^{o}C for 6 h). Anaerobic culture fermentation was performed for *in vitro* study on utilization of EPSs by probiotic bacteria by using glucose as reference sugar. Only *Bifidobacterium bifidum* exhibited the ability to utilize EPSs as carbon source but not *Lactobacillus plantarun* and *Lactobacillus acidophilus*. EPSs from *Weissella cibaria* A2 was shown to be the best substrate for *B. bifidum*, it could increase number of *B. bifidum* from 6.17 to 7.54 log cell/ml. Culture supernatant of EPSs fermentation by *B. bifidum* did not show inhibitory activity against pathogens (*Stap. aureus*, *L. monocytogenes*, *Samonella* sp. and *E. coli*). Butyric acid formation from fermentation of EPSs produced by *W. cibaria* A2, *W. confusa* A9,

L. plantarum A3 and *P. pentosaceus* 5S4 was 0.159, 0.168, 0.159 and 0.166 mM., respectively. *Stap. aureus*, *Sal.* Typhi and *E. coli* were not inhibited by *B. bifidum* in co-culture experiment used EPSs as carbon source.