View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Srinakharinwirot University: SWU e-Journals System

ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร โดยแบคทีเรียกรดแลกทิกจากลูกแป้งข้าวหมาก

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์* และอัฐวิทย์ อุเทนสุต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ 10600
*E-mail: arunchan_57@hotmail.com

รับบทความ: 18 สิงหาคม 2556 ยอมรับตีพิมพ์: 3 ตุลาคม 2556

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลกทิก *Pediococcus pentosaceus* AUB1 ATB1 SRB1 และ LBB1 ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร คือ *Escherichia coli Staphylococcus aureus Salmonella typhi Shigella flexneri Shigella boydii* และ *Shigella sonnei* ที่ภาวะค่าความเป็นกรด–เบส และอุณหภูมิแตกต่างกัน ทดสอบประสิทธิภาพโดยวิธี well test และตรวจสอบการอยู่รอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกทิกที่ภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารด้วยวิธี viable cell count ผลการทดลองพบว่า ค่าความเป็นกรด–เบสและอุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งของ *Pediococcus pentosaceus* โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรด–เบส 5.0 และ 7.0 ให้ผลการยั้บยั้งในภาพรวมดีที่สุด ซึ่งที่ภาวะนี้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกทิก AUB1 ATB1 SRB1 และ LBB1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารได้ 5 ชนิด ยกเว้น *Staphylococcus aureus* และเมื่อทดสอบความสามารถในการอยู่รอด-ชีวิตของ *P. pentosaceus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า ไม่สามารถทนต่อภาวะที่มีเอนไซม์เพปซินเข้มข้น 3.0 mg/mL ที่ภาวะความเป็นกรด–เบส 3.0 และ 2.5 และภาวะมีน้ำดีร้อยละ 1.0–7.0 ที่ค่าความเป็นกรด–เบส 8.0 มีผลทำลาย *Pediococcus pentosaceus*

คำสำคัญ: *Pediococcus pentosaceus* แบคทีเรียกรดแลกทิก แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร เพปซิน น้ำดี

Inhibitory Efficacies of Lactic Acid Bacteria Isolated from LoogPang KaoMark against Enteropathogenic Bacteria

Arun Chanchaichaovivat* and Atthawit Utiansut

Microbiology Program, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok 10600, Thailand
*E-mail: arunchan_57@hotmail.com

Abstract

This research aimed to analyze and compare inhibitory effects of lactic acid bacteria, *Pediococcus pentosaceus* AUB1, ATB1, SRB1 and LBB1, which was isolated from LoogPang Kaomark on enteropathogenic bacteria, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexeri*, *Shigella boydii* and *Shigella sonnei*. Well test with viable cell count of lactic acid bacteria and survival detection in enteric simulation system were investigated. In overall, the results of bioassay showed that lactic acid bacteria, *Pediococcus petosaceus* AUB1, ATB1 and SRB1, which were cultivated at temperatures of 30 ^{o}C as well as pH 5.0 and 7.0, performed the highest inhibitory effects against 5

enteropathogenic bacteria, except *Staphylococcus aureus*. However, 4 strains of *P. petosaceus* can not survive in 3 mg/mL pepsin at pH 3.0 and 2.5. Moreover, bile solution at the concentration of 1–7% (pH 8.0) showed bactericidal agent for the four strains of *P. petosaceus*.

Keywords: *Pediococcus pentosaceus*, Lactic acid bacteria, Enteropathogenic bacteria, Pepsin, Bile

บทนำ

ลูกแป้งเป็นแหล่งจุลินทรีย์ย่อยแป้งและน้ำตาล เกิดจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของชาวเอเชียรวมทั้งคนไทยที่สามารถทำลูกแป้งไว้ใช้เป็นหัวเชื้อหมักข้าวนึ่งสำหรับทำขนมหวานที่มีแอลกอฮอล์เล็กน้อย คือ ข้าวหมาก และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น สาโท กระแช่ และอุ ลูกแป้งสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานนับเดือน ในลูกแป้งข้าวหมากประกอบด้วยจุลินทรีย์ 3 ประเภท คือ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยมีองค์ประกอบของสมุนไพรแต่ละท้องถิ่นผสม เช่น กานพลู พริกไทยดีปลี กระเทียม และขิง สมุนไพรเหล่านี้มีสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดรสชาติของข้าวหมากไม่ดีโดยยอมให้จุลินทรีย์บางชนิดที่ใช้วัตถุดิบซึ่งเป็นข้าวพื้นเมืองของแต่ละประเทศได้และให้กลิ่นดี (วีระสิทธิ์ กัลยากฤต และวรศักดิ์ ช่างภา, 2553; Rajsekhar et al., 2012) จากการศึกษาวิจัยจุลินทรีย์ในลูกแป้งพบชนิดของรายย่อยแป้งที่สำคัญ ได้แก่ *Amylomyces rouxii*, *Endomycopsis fibuligera*, *Hansenula anomala* และ *Rhizopus oryaze* สำหรับยีสต์ในลูกแป้งมีหน้าที่ใช้น้ำตาลที่เป็นผลผลิตจากการย่อยแป้งโดยราแล้วเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ (เอทานอล) และบางชนิดให้ผลผลิตเป็นเอสเทอร์ (ester) ซึ่งให้กลิ่นเฉพาะกับผลิตภัณฑ์ ลูกแป้งจากบางท้องถิ่นอาจพบแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคทิก (lactic acid) เช่น *Pediococcus pentosaceus* และ *Lactobacillus* spp. นอกจากนี้บ่อยครั้งที่พบแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู (acetic acid) เช่น *Acetobacter* spp. และ *Gluconobacter* spp. แบคทีเรียในลูกแป้งมีบทบาทในรสชาติของผลิตภัณฑ์อาหารหมักด้านกลิ่นและรสชาติเปรี้ยว ซึ่งบางประเทศจะยอมรับในกลิ่นและรสชาติที่เกิดจากการเจริญของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามหากพบแบคทีเรียกลุ่มอื่นนอกเหนือจาก 2 กลุ่มดังกล่าว เช่น *Bacillus* spp. มักทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติไม่ดี ซึ่งทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ด้อยลง (นภา โล่ห์ทอง, 2537)

ปัจจุบันมีการศึกษาสมบัติและประโยชน์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotic) ค่อนข้างมาก จนกระทั่งผลิตเป็นการค้าในรูปของเป็นอาหารเสริมโพรไบติก ซึ่งพบว่ามีประโยชน์ต่อผู้บริโภคโดยช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของการย่อยอาหารและลดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร แบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกทิก (lactic acid bacteria) ที่สำคัญ ได้แก่ *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. crispatus* และ *Bifidobacterium* spp. (ไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2554; Holzapfel and Schillinger, 2002) แบคทีเรียกรดแลกทิกที่พบในอาหารหมักส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ จุลินทรีย์พวกนี้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่มแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และกรดแลกทิกยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมทั้งมีสมบัติถนอมอาหารไม่ให้เน่าเสียเร็ว จึงมีความพยายามผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อใช้ยืดอายุของอาหารแทนสารเคมีกันบูด (Cleveland et al., 2001) แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลกทิก เช่น *Lactococcus lactis* ผลิตแลกทิซิน (lacticin) *L. sake* ผลิตซาคาซิน (sakasin) และ *Pediococcus acidilactici* ผลิตเพดิโอซิน (pediocin) (Henderson et al., 1992; Holck et al., 1992; Ryan et al., 1996) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่แลกทิกแบคทีเรียที่พบในลูกแป้งข้าวหมากของไทยจะมีสมบัติเป็นโพรไบโอติก สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้ในอนาคต

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลกทิก *Pediococcus pentosaceus* AUB1 ATB1 SRB1 และ LBB1 ซึ่งแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากต่อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *Escherichia Staphylococcus aureus Salmonella typhi Shigella flexneri Shigella boydii* และ *Shigella sonnei* ที่ภาวะค่าความเป็นกรด–เบสและอุณหภูมิต่างกัน และตรวจสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกทิกที่ภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร เพื่อเป็นข้อมูลแสดงสมบัติความเป็นโพรไบโอกติกของแบคทีเรียกรดแลกทิก *P. pentosaceus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ และเป็นข้อมูลในการพิจารณานำแบคทีเรียกรดแลกทิกนี้ไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์

1. แบคทีเรียกรดแลกทิก ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ AUB1 LBB1 ATB1 และ SRB1 คัดแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากที่ผลิตในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ลพบุรี อ่างทอง และสระบุรี ของประเทศไทย ตามลำดับ (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ และคณะ, 2555) โดยเก็บรักษาไว้ในอาหารแข็ง MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* และ *Salmonella typhi* จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย โดยเก็บรักษาไว้ในอาหารแข็ง NA (nutrient agar) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียกรดแลกทิกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ค่าความเป็นกรด–เบสและอุณหภูมิต่างกัน

1. เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียโดยเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกทิก *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ AUB1 LBB1 ATB1 และ SRB1 ในอาหารเหลว MRS และแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร (เชื้อทดสอบ) ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* และ *Salmonella typhi* ในอาหารเหลว NB (nutrient broth) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลกทิกด้วยวิธี well test โดยดูดเชื้อทดสอบด้วยปิเปต (pipette) ปลอดเชื้อ ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อ (plate) ที่มีอาหารแข็ง NA (nutrient agar) ที่ปรับค่าความเป็นกรด–เบส เท่ากับ 5.0, 7.0 และ 9.0 แล้วกระจายเชื้อ (spread) ด้วยแท่งแก้วงอที่ฆ่าเชื้อ รอจนผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นเจาะอาหารแข็งด้วยแท่งโลหะกลวง (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร ดูดหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลกทิกแต่ละสายพันธุ์ด้วยปิเปต ปริมาณ 20 μL ใส่ลงในหลุมบนอาหารแข็ง NA ที่มีเชื้อทดสอบแต่ละชนิดอยู่ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 28 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3. วัดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) ที่เกิดจากฤทธิ์ยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลกทิกต่อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารแต่ละชนิดในแนวตั้ง (x) และแนวนอน (y) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย คือ $\frac{(x+y)}{2}$

4. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลกทิกจำนวน 3 ซ้ำ และใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นตัวควบคุม (control) แทนการใช้แบคทีเรียกรดแลกทิก

ตรวจสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกทิกในภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร

ตรวจสอบความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกทิกในภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร ได้แก่ ภาวะที่มีเอนไซม์เพปซิน (pepsin from porcine gastric mucosa, Sigma, Singapore) และมีน้ำดี (bile, bovine, Fluka, Singapore) ดังนี้

1. เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียโดยเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกทิก *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ ATB1 LBB1 AUB1 และ SRB1 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ดูดหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลกทิกแต่ละสายพันธุ์ด้วยปิเปต จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ (centrifuge tube) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ไปทดสอบความสามารถในการอยู่รอด

3. ทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในภาวะที่มีเอนไซม์เพปซินและน้ำดี

3.1 นำเซลล์แบคทีเรียกรดแลกทิกที่เตรียมไว้มากระจายในหลอดสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ซึ่งปรับค่าความเป็นกรด–เบสเท่ากับ 3.0 และ 2.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (M) และมีเอนไซม์เพปซินปริมาณ 3.0 มิลลิกรัม หรือที่ภาวะมีน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 1.0–7.0 ที่ปรับค่าความเป็นกรด–เบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.01 นอร์มัล (N) อยู่ด้วย

3.2 นำหลอดแบคทีเรียกรดแลกทิกไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 0 3 6 9 และ 12 ชั่วโมง

3.3 ตรวจการรอดชีวิตโดยวิธีกระจายเชื้อบนจาน (spread plate) ที่มีอาหาร NA (ค่าความเป็นกรด–เบส เท่ากับ

7.0) บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนคอโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งในรูปแบบค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี One–way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้การทดสอบแบบ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ .05

ผลการวิจัย

จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียกรดแลกทิก *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ AUB1 LBB1 ATB1 และ SRB1 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากที่ผลิตใน 4 จังหวัดภาคกลางของประเทศไทย คือ จังหวัดพระนครศรีพระนครศรีอยุธยา ลพบุรี อ่างทอง และจังหวัดสระบุรี ตามลำดับ ในภาวะความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิต่างกัน รวมทั้งตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกทิกที่ภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ได้ผลการวิจัยดังนี้

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลกทิกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (เชื้อทดสอบ) ได้แก่ *Escherichia coli Staphylococcus aureus Shigella boydii Shigella flexneri Shigella sonnei Salmonella typhi* โดยแบคทีเรียกรดแลกทิก *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ ATB1 BB1 AUB1 และ SRB1 ใช้วิธี well test ในอาหาร NA ที่ปรับค่าความเป็นกรด–เบส เท่ากับ 5.0 7.0 และ 9.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลตามตาราง 1–4

ตาราง 1 เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ค่าความเป็นกรด–เบส เท่ากับ 5.0 และ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง

ชนิดของแบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)							
	P. pentosaceus ATB1		*P. pentosaceus* LBB1		*P. pentosaceus* AUB1		*P. pentosaceus* SRB1	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
S. boydii	12.66^{a} ±1.15	12.00^{a}±0.00	26.50^{b}±0.50	–	28.33±1.52^{b}	–	25.66^{c}±0.28	12.00^{c}±0.00
S. flexneri	15.00^{b}±1.00	12.00^{a}±0.00	26.00^{b}±1.80	13.83^{b}±0.28	28.83±0.57^{b}	13.50^{a}±0.50	21.83^{b}±0.28	6.66^{ab}±0.57
S. sonnei	13.16^{a}±0.28	12.00^{a}±0.00	23.50^{a}±0.50	11.66^{a}±0.57	24.00±1.00^{a}	–	21.16^{b}±0.76	12.66^{c}±0.28
S. typhi	21.33 ^{c}±1.04	12.66^{b}±0.57	30.66^{c}±1.15	13.33^{b}±0.57	30.33±0.57^{b}	15.50^{b}±0.50	26.00^{c}±3.46	7.16^{b}±1.04
S. aureus	–	–	–	–	–	–	18.00^{a} ±1.00	–
E. coli	13.66 ^{ab}±0.76	12.66^{b}±0.28	22.83^{a}±1.89	–	23.16^{a}±0.28	–	19.16^{ab}±0.76	5.83^{a}±0.67

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$ ±SD) ตามด้วยอักษร a , b, c... ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ (–) ไม่พบวงใสของการยับยั้ง

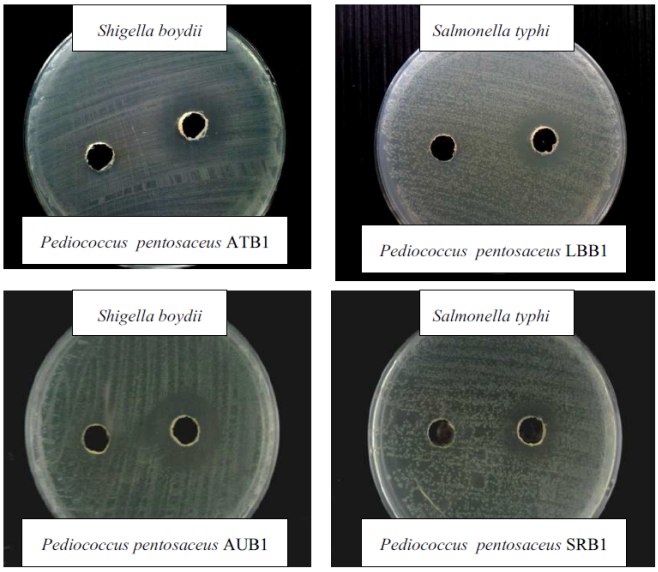
จากผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกทิก 4 สายพันธุ์ ดังในตาราง 1 พบว่า แบคทีเรียกรดแลกทิก *P. pentosaceus* SRB1 ที่เพาะเลี้ยงในภาวะค่าความเป็นกรด–เบส 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารได้จำนวนชนิดมากที่สุด คือ 6 ชนิด ได้แก่ *S. boydii S. flexneri S. sonne S. typhi S. aureus* และ *E. coli* นอกจากนี้ผลทดสอบในภาวะค่าความเป็นกรด–เบส 7.0 พบว่า สายพันธุ์ SRB1 และ ATB1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารได้จำนวนชนิดมากกว่า *P. pentosaceus* สายพันธุ์ LBB1 และ AUB1 ซึ่งในภาพรวมที่ค่าความเป็นกรด–เบส 5.0 ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบดีกว่าที่ค่าความเป็นกรด–เบส 7.0 โดยสังเกตจากจำนวนและขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น โดยที่ภาวะความเป็นกรด–เบสเท่ากับ 9.0 ไม่พบวงใสในทุกตัวอย่างของแบคทีเรียทดสอบ

จากผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลกทิก (ตาราง 2) พบว่า *P. pentosaceus* ATB1 AUB1 LBB1 และ SRB1 ที่เพาะเลี้ยงในภาวะค่าความเป็นกรด–เบส 5.0 และ 7.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้ง *S. boydii S. flexneri S. sonnei S. typhi* และ *E. coli* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้โดยสังเกตจากเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ปรากฏ และในภาวะความเป็นกรด–เบส เท่ากับ 9.0 ไม่พบวงใสในทุกตัวอย่างของแบคทีเรียทดสอบ

ตาราง 2 เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ค่าความเป็นกรด–เบส 5.0 และ 7.0 ที่อุณหภูมิ 30°C

ชนิดของแบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)							
	P. pentosaceus ATB1		*P. pentosaceus* LBB1		*P. pentosaceus* AUB1		*P. pentosaceus* SRB1	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
S. boydii	14.00^{b}±1.32	13.33^{d}±0.28	14.50^{c}±0.86	11.66^{c}±0.57	19.16^{c}±0.28	13.50^{bc}±0.50	13.00^{a}±0.00	12.83^{ab}±0.28
S. flexneri	14.33^{b}±0.57	12.66^{c}±0.57	12.66^{b}±0.75	10.83^{b}±0.28	14.83^{b}±1.44	13.00^{bc}±0.50	14.83^{b}±0.76	12.66^{ab}±0.57
S. sonnei	13.83^{b}±0.76	12.00^{b}±0.00	12.66^{b}±0.38	10.00^{a}±0.00	13.50^{ab}±0.86	11.66^{a}±0.76	13.00^{a}±0.50	13.50^{c}±1.00
S. typhi	16.83^{c}±0.28	12.00^{b}±0.00	16.00^{d}±0.86	11.50±0.50	18.16^{c}±1.52	14.00^{c}±1.00	18.00^{c}±0.86	13.66^{c}±0.57
S. aureus	–	–	–	–	–	–	–	–
E. coli	11.66^{a}±0.28	11.16^{a}±0.57	10.00^{a}±0.00	10.00^{a}±0.00	12.66^{a}±0.57	12.50^{ab}±0.50	13.66^{ab}±1.15	12.00^{a}±0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$ ±SD) ตามด้วยอักษร a , b, c… ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ (–) ไม่พบวงใสของการยับยั้ง



ภาพที่ 1 วงใสจากฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกทิก *P. pentosaceus* ATB1 LBB1 AUB1 และ SRB1 ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร *S. boydii* และ *S. typhi* (ด้านขวา) ที่ค่าความเป็นกรด–เบส เท่ากับ 5.0 และอุณหภูมิ 37°C เปรียบเทียบกับภาวะควบคุม (ด้านซ้าย)

จากผลการตรวจวัดวงใสที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อทดสอบ (ตาราง 3 และภาพที่ 1) พบว่า สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกทิก *P. pentosaceus* LBB1 AUB1 และ SRB1 ที่เพาะเลี้ยงในภาวะค่าความเป็นกรด–เบส 5.0 ที่อุณหภูมิ 37 °C สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 4 ชนิด คือ *S. boydii S. flexneri S. typhi* และ *E. coli* ในขณะที่ *P. pentosaceus* ATB1 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียง 2 ชนิด คือ *S. boydii* และ *S. flexneri* นอกจากนี้ที่ภาวะค่าความเป็นกรด–เบส 7.0 พบว่า *P. pentosaceus* SRB1 สามารถยับยั้งเชื้อได้มากชนิดที่สุด คือ *S. boydii S. flexneri S. sonnei S. typhi* และ *E. coli* ยกเว้น *S. aureus* ซึ่งในภาพรวมที่ค่าความเป็นกรด–เบส 5.0 ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบดีกว่าที่ค่าความเป็นกรด–เบส 7.0 โดยสังเกตจากขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น และที่ค่าความเป็นกรด–เบส เท่ากับ 9.0 นั้นไม่พบวงใสในทุกตัวอย่างของเชื้อทดสอบ

จากตาราง 4 สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกทิก *P. pentosaceus* ATB1 AUB1 LBB1 และ SRB1 ที่เพาะเลี้ยงในภาวะค่าความเป็นกรด–เบสเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 40°C สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ 5 ชนิด คือ *E. coli S. aureus S. boydii S. flexneri* และ *S. sonnei* ซึ่งยกเว้นเพียง 1 ชนิด คือ *S.a typhi* และที่ภาวะค่าความเป็นกรด–เบสเท่ากับ 7.0 พบว่า *P. pentosaceus* SRB1 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากชนิดที่สุด คือ *S. boydii S. flexneri S. sonnei* และ *E. coli* โดยในภาพรวมที่ค่าความเป็นกรด–เบส เท่ากับ 5.0 ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบมากว่าที่ค่ากรด–เบส เท่ากับ 7.0 ทั้งในด้านจำนวนและฤทธิ์การยับยั้ง โดยสังเกตขนาดวงใสที่ปรากฏ และที่ค่าความเป็นกรด–เบส เท่ากับ 9.0 ไม่พบวงใสในทุกตัวอย่างของเชื้อทดสอบ

การทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกทิกในสภาวะเลียนแบบระบบทางเดินอาหาร

ความสามารถในการทนกรดและเอนไซม์เพปซิน

จากการทดลองนำสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกทิกที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากที่ทำในจังหวัดอ่างทอง ลพบุรี พระนครศรีอยุธยา และสระบุรี ได้แก่ *P. Pentosaceus* ATB1

ตาราง 3 เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ค่าความเป็นกรด–เบส 5.0 และ 7.0 ที่อุณหภูมิ 37°C

ชนิดของแบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)							
	P. pentosaceus ATB1		*P. pentosaceus* LBB1		*P. pentosaceus* AUB1		*P. pentosaceus* SRB1	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
S. boydii	26.33^{b}±1.15	–	22.66^{b}±1.25	–	25.33^{d}±0.57	–	20.33^{b}±1.15	11.00^{a}±0.00
S. flexneri	17.83^{a}±1.04	–	22.00^{b}±2.64	12.00^{b}±0.00	18.33^{c}±1.52	–	15.00^{a}±1.00	10.66^{a}±0.57
S. sonnei	–	–	–	–	–	–	–	11.33^{a}±0.57
S. typhi	–	11.66^{a}±0.57	22.66^{b}±0.76	11.00^{a}±0.00	12.16^{a}±0.28	11.00^{a}±0.50	21.66^{c}±0.57	11.33^{a}±0.57
S. aureus	–	–	–	–	–	–	–	–
E. coli	–	–	14.33^{a}±1.89	11.66^{b}±0.57	15.50^{b}±0.50	11.00^{a}±0.00	16.00^{a}±0.00	11.00^{a}±0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$ ±SD) ตามด้วยอักษร a , b, c... ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ (–) ไม่พบวงใสของการยับยั้ง

ตาราง 4 เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารที่ค่าความเป็นกรด–เบส 5.0 และ 7.0 ณ อุณหภูมิ 40°C

ชนิดของแบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)							
	P. pentosaceus ATB1		*P. pentosaceus* LBB1		*P. pentosaceus* AUB1		*P. pentosaceus* SRB1	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
S. boydii	31.83^{c}±1.52	11.33^{b}±0.57	35.66^{c}±1.15	-	35.83±0.28^{c}	14.00^{b}±1.32	30.83^{c}±2.02	14.66^{b}±1.04
S. flexneri	27.50^{b}±1.32	7.50^{a}±0.50	22.66^{b}±2.15	-	22.33±1.15^{b}	12.33^{a}±0.57	25.83^{b}±3.25	11.66^{a}±0.28
S. sonnei	14.00^{a}±0.86	–	16.16^{a}±2.20	12.00±1.00^{b}	15.33±1.04^{a}	–	17.66^{a}±0.76	12.33^{a}±0.28
S. typhi	–	–	–	–	–	–	–	–
S. aureus	15.33^{a}±2.08	–	16.50^{a}±0.86	11.00±0.00^{a}	17.00^{a}±2.17	–	15.50^{a}±1.00	–
E. coli	14.16^{a}±0.28	–	15.00^{a}±1.00	11.16±0.28^{a}	15.33^{a}±1.15	–	14.83^{a}±0.76	12.00^{a}±1.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$ ±SD) ตามด้วยอักษร a , b, c... ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ (–) ไม่พบวงใสของการยับยั้ง

LBB1 AUB1 และ SRB1 มาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดที่ค่าความเป็นกรด–เบส 2.5 และ 3.0 โดยมีเอนไซม์เพปซินผสมอยู่ในอาหารเหลว NB ความเข้มข้น 3 mg/mL ซึ่งเป็นภาวะเลียนแบบระบบในกระเพาะอาหาร พบว่า แบคทีเรียกรดแลกทิกทั้ง 4 ชนิดไม่สามารถทนต่อสภาวะนี้ได้

ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี

จากการทดลองนำสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกทิกที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากที่ทำในจังหวัดอ่างทอง ลพบุรี พระนครศรีอยุธยา และสระบุรี ได้แก่ *P. pentosaceus* ATB1 LBB1 AUB1 และ SRB1 มาทดสอบ มีความสามารถในการทนเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 ที่สภาวะค่าความเป็นกรด–เบส 8.0 ซึ่งเป็นสภาวะเลียนแบบระบบลำไส้เล็ก พบว่า สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกทิกทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่สามารถทนต่อภาวะนี้ได้

สรุปผลวิจัย

จากการศึกษาผลประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลกทิก *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ AUB1 LBB1 ATB1 และ SRB1 ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากที่ผลิตในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ลพบุรี อ่างทอง และสระบุรี ตามลำดับ ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร คือ *Escherichia coli Staphylococcus aureus Shigella boydii*, *Shigella flexneri Shigella sonnei* และ *Salmonella typhi* ที่ภาวะความเป็นกรด–เบส 5.0 7.0 และ 9.0 และอุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 28 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า *P. pentosaceus* AUB1 ATB1 SRB1 และ LBB1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารได้จำนวนมากชนิดที่สุด (ยกเว้น *Staphylococcus aureus*) ที่ค่าความเป็นกรด–เบสเท่ากับ 5.0 และ 7.0 ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *S. boydii* และ *S. flexneri* ถูกยับยั้งโดย *P. pentosaceus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ค่าความเป็นกรด–เบสเท่ากับ 5.0 และ 7.0 และทุกอุณหภูมิที่ใช้ทดสอบ สำหรับความเป็นกรด–เบส เท่ากับ 9.0 ไม่พบวงใสของการยับยั้งที่ทุกอุณหภูมิของการทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่า *P. pentosaceus* AUB1 ATB1 SRB1

และ LBB1 ไม่สามารถเจริญได้ที่สภาวะเลียนแบบระบบทางเดินอาหารซึ่งมีเอนไซม์เพปซินเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเป็นกรด–เบส เท่ากับ 3.0 และ 2.5) และภาวะมีน้ำดีร้อยละ 1.0–7.0 (ค่าความเป็นกรด–เบส เท่ากับ 8.0)

อภิปรายผล

การวิจัยในครั้งนี้ได้ทดสอบสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกทิก คือ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ ATB1 LBB1 AUB1 และ SRB1 คัดแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากในประเทศไทย (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ และคณะ, 2555) ในด้านประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus Shigella boydii Shigella flexneri Shigella sonnei* และ *Salmonella typhi* และความสามารถทนต่อภาวะเลียนแบบในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งพบว่า *P. pentosaceus* 4 สายพันธุ์ มีความสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบเหล่านี้ได้ ขึ้นอยู่กับสภาพความเป็นกรด–เบส และอุณหภูมิ โดยสามารถทนความเป็นกรดได้ที่ 5.0 และอุณหภูมิสูงถึง 40°C และยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้บางชนิด ดังนั้น *P. pentosaceus* จึงมีโอกาสที่จะเจริญในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ได้หลายชนิด (Duangjitcharoen et al., 2009) อย่างไรก็ตามที่ค่าความเป็นกรด–เบสเท่ากับ 9.0 พบว่า *P. pentosaceus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ (ไม่ได้แสดงผลไว้ในที่นี้) นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียแลกทิก *P. pentosaceus* ที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้อาจมาจากความสามารถในการสร้างกรดแลกทิกและสร้างแบคเทอริโอซิน (เพดิโอซิน) ที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น (Henderson et al., 1992; Ryan et al., 2002; Rittiplang et al., 2005) และถ้า *P. pentosaceus* จากลูกแป้งข้าวหมากเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารโดยสามารถเจริญและเกาะติดกับเนื้อเยื่อบุผิวลำไส้ได้ สารที่เชื้อผลิตขึ้นเหล่านี้จะมีประโยชน์ในการป้องกันหรือลดการติดเชื้อจากแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารได้ (Duangjitcharoen et al., 2009; Grajek et al., 2005; Holzapfel and Schillinger, 2002; Zubillaga et al., 2001) แบคทีเรียกรดแลกทิก *P. pentosaceus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้มากในลูกแป้งข้าวหมากทั่วไป ซึ่งอาจพบได้มากถึง 10^4–10^7 เซลล์ต่อกรัม (นภา โล่ห์ทอง, 2537) ดังนั้นการรับประทานข้าวหมากจึงมีโอกาสได้รับแบคทีเรียแลกทิก *P. pentosaceus* เข้าสู่ร่างกาย เชื้อนี้จึงมีส่วนสำคัญต่อประโยชน์ของข้าวหมากในด้านเป็นอาหารโพรไบโอติกที่ส่งเสริมสุขภาพ อย่างไรก็ตามจากการตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ *P. pentosaceus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ในภาวะเลียนแบบระบบทางเดินอาหารโดยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์โดยตรงในอาหารเหลวผสมเอนไซม์เพปซินหรือน้ำดี พบว่า เชื้อไม่สามารถเจริญได้ แต่หากว่า *P. pentosaceus* อยู่ในข้าวหมาก การรอดชีวิตของเชื้อนี้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์อาจพบได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากข้าวหมากจะช่วยในการปกป้องเซลล์แบคทีเรียไม่ให้สัมผัสกับน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารโดยตรง และถึงแม้ว่าเซลล์ *P. pentosaceus* จะตายเมื่ออยู่ในระบบทางเดินอาหารก็ตาม แต่จากการวิจัยหลายแหล่งพบว่า เซลล์ตายของแบคทีเรียกรดแลกทิกสามารถกระตุ้นและปรับสมดุลของภูมิคุ้มกันร่างกายได้ (Sashihara et al., 2006) ป้องกันสารก่อมะเร็ง และกระตุ้นการสร้างอินเทอฟีรอน (interferon) (Maeda et al., 2009; Murosaki et al., 1998) รวมทั้งสามารถลดระดับคอเลสเทอรอล (cholesterol) ในเลือด (Sirilun et al., 2010) ปัจจุบันจึงมีแนวคิดผลิตโพรไบโอติกในรูปแบบจุลินทรีย์เซลล์ตายเป็นการค้า (ไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2554) นอกจากนี้ในอนาคตอาจนำ *P. pentosaceus* AUB1 ATB1 SRB1 และ LBB1 มาศึกษาความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะแบคเทอริโอซินเพื่อใช้ประโยชน์เป็นสารถนอมอาหารแทนสารเคมีกันบูดได้อีกทางหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ในปี พ.ศ. 2555

เอกสารอ้างอิง

ไชยวัฒน์ ไชยสุต. (2554). **โพรไบโอติก: จุลินทรีย์เพื่อชีวิต**. จังหวัดเชียงใหม่: นวัตกรรมสุขภาพ.

นภา โล่ห์ทอง. (2537). **กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต**. กรุงเทพมหานคร: ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง.

วีระสิทธิ์ กัลยากฤต และวรศักดิ์ ช่างภา. (2553). อิทธิพลของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อจุลินทรีย์ในลูกแป้ง. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48**, หน้า 211–217. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ วันทนี สว่างอารมณ์ สุวินัย เกิดทับทิม และอนัตยา ผาสุข. (2555). วิทยาศาสตร์บูรณาการกับภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อสุขภาพและชุมชนในการ

ศึกษาด้านประสิทธิภาพของสารสกัดข้าวหมาก: อาหารโพรไบโอติกต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

Cleveland, J., Montvile, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology** 71: 1–20.

Duangjitcharoen, Y., Kantachote, D., Ongsakul, M., Poosaran, N., and Chaiyasut, C. (2009). Potential use of probiotic *Lactobacillus plantarum* SS2 isolated from a fermented plant beverage: Safety assessment and persistence in the murine gastrointestinal tract. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 25: 315–321.

Grajek, W., Olejnik, A., and Sip, A. (2005). Probiotics prebiotics and antioxidants as functional foods. **Acta Biochimca Polonica** 52: 665–671.

Henderson, J. T., Chopko, A. L., and Wassenaar, P. D. (1992). Purification and primary structure of pediocin PA–1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC–1.0. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 295: 5–12.

Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S. E., Aukrust, T., and Blom, H. (1992). Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* LB706. **Journal of General Microbiology** 138: 2715–2720.

Holzapfel, W. H., and Schillinger, U. (2002). Introduction to pre and probiotics. **Food Research International** 35: 109–116.

Maeda, N., Nakamura, R., Hirose, Y., Murosaki, S., Yamamoto, Y., Kase, T., and Yoshikai, Y. (2009). Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L–137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. **International Immunopharmacology** 9: 1122–1125.

Murosaki, S., Yamamoto, Y., Ito, K., Inokuchi, T., Kusaka, H., Ikeda, H., and Yoshikai, Y. (1998). Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L–137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 102: 57–64.

Rajsekhar, S., Kuldeep, B., Chandaker, A., and Upmanyu, N. (2012). Spices as antimicrobial agents: A review. **International Research Journal of Pharmacology** 3(2): 4–9.

Rittiplang, J., Laopaiboon, P., Vichitpan, K., and Danvirutai, P. (2005). Lactic acid bacteria from indigeneous Loog-Pang samples of northeastern Thailand and their lactic acid production ability. **The 1st International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products**. Khon Kaen, Thailand.

Ryan, M. P., Hill, C., and Ross, R. P. (2002). In: Dutton, C. J., Haxell, M. A., McAuthor, H. A. and Wax, R. G. (Eds.), **Peptides Antibiotics: Discovery, Modes of Action and Applications**. New York: Marcel Dekker.

Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C., and Ross, R.P. (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad spectrum bacteriocin lacticin **3147. Applied and Environmental Microbiology** 62: 612–619.

Sashihara, T., Sueki, N., and Ikegami, S. (2006). An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. **Journal of Dairy Science** 89: 2846–2855.

Sirilun, S., Chaiyasut, C., Kantachote, D., and Luxananil, P. (2010). Characterization of non human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property. **African Journal of Microbiology Research** 4: 994–1000.