นิพนธ์ต้นฉบับ

การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสำหรับมนุษย์จากอาหารหมักของไทย

อัจฉรา หนูเพชร[1] ดวงพร คันธโชติ[2] และ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล[3]

Abstract

Nuphet, A., Kantachote, D. and Charernjiratrakul, W.

Screening of probiotic lactic acid bacteria from Thai fermented foods for human.

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(5) : 659-670

Total of 327 strains of lactic acid bacteria were isolated from 179 samples of various Thai fermented foods. The strains were investigated for their probiotic properties based on stability in bile salt (0.15%) and high acidity (pH 2, 3 and 4). Moreover, utilization of protein or fat or starch, growth in the absence of vitamin B12 and growth under both aerobic and anaerobic conditions with no significant difference were also considered. According to the above criteria, 67 strains were selected for antibiotics sensitivity test. The selected strains were susceptible to following antibiotics: ampicillin, cephalothin, cefoperazone, tetracycline and chloramphenicol; however the strains were resistant to vancomycin, kanamycin, streptomycin, norfloxacin and polymyxin B. Using agar spot method, only 5 strains were able to inhibit 13 strains of manifest by a bacteria indicator as clear zone greater than 10 mm. A further investigation using co-culture technique showed inhibition of the tested organisms was between 80 and 100 percent. The strains grew under media of MRS and SPY2 (no materials from animal) over 36 hours with no significant difference. The strains were investigated for survival in condition of high acidity within 3 hours. It was found that at pH 4 almost 100% were maintained but at pH 2 and 3 the survival reduced approximately 1 log cycle. The strain LA71 which showed the highest survival was identified as *Lactobacillus plantarum*.

Key words : lactic acid bacteria, probiotic, Thai fermented food, *Lactobacillus*

Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

[1]วท.ม.(จุลชีววิทยา) [2]Ph.D.(Soil Science), รองศาสตราจารย์ [3]วท.ม.(จุลชีววิทยา), รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: jrwilawa@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 27 ตุลาคม 2546 รับลงพิมพ์ 7 เมษายน 2547

บทคัดย่อ

อัจฉรา หนูเพชร ดวงพร คันธโชติ และ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล

การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสำหรับมนุษย์จากอาหารหมักของไทย

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2547 26(5) : 659-670

การแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย 22 ชนิด จำนวน 179 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 327 สายพันธุ์ นำเชื้อมาทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกได้แก่ การทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้น 0.15% ทนต่อกรดที่ระดับพีเอช 2 3 และ 4 สามารถย่อยโปรตีนหรือไขมันหรือแป้ง เจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนโดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเจริญในสภาวะที่ปราศจากวิตามินบี 12 สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีสมบัติดังกล่าวได้ 67 สายพันธุ์ เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบกับยาปฏิชีวนะ พบว่าทุกสายพันธุ์ไวต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin, cephalothin, cefoperazone, tetracycline และ chloramphenicol แต่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ polymyxinB, kanamycin, streptomycin, norfloxacin และ vancomycin และเมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งโดยวิธี agar spot พบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 13 สายพันธุ์ โดยมีขอบวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 มม. และเมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 13 สายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่ามีการยับยั้งอยู่ระหว่าง 80-100% แบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์มีการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ SPY2 (อาหารที่ปราศจากแหล่งที่มาจากเนื้อสัตว์) ภายในเวลา 36 ชั่วโมง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบความสามารถในการอยู่รอดที่ระดับพีเอช 2 3 และ 4 ในเวลา 3 ชั่วโมงพบว่าสามารถอยู่รอดที่ระดับพีเอช 4 ได้เกือบ 100% ส่วนที่พีเอช 2 และ 3 มีจำนวนลดลงประมาณ 1 log cycle โดยสายพันธุ์ LA71 สามารถอยู่รอดได้ดีที่สุด และเมื่อบ่งชี้ชนิด พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum*

ปัจจุบันผู้บริโภคได้หันมาดูแลสุขภาพของตนเองมากขึ้น ดังนั้นจึงให้ความสนใจเกี่ยวกับความปลอดภัยในการบริโภคอาหาร ทั้งความปลอดภัยจากยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ สารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร รวมทั้งเชื้อก่อโรคที่มีในอาหาร แนวทางหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษากันคือ การนำจุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกมาใช้เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและสุขภาพที่ดีของผู้บริโภค

โปรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งก่อประโยชน์ให้กับสุขภาพของผู้บริโภคในการคงไว้หรือช่วยปรับสภาพความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Saarela *et al*., 2000) กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็ง ลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือด ป้องกันและรักษาโรคท้องร่วงทั้งที่เกิดจากแบคทีเรียและไวรัส เป็นต้น (Kaur *et al*., 2001; Reid, 1999) จุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้ทนกรดและเกลือน้ำดีเพื่อทำให้สามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญในการเป็นโปรไบโอติก (Reid, 1999; Vinderola and Reinheimer, 2003; Cebeci and Gurakan, 2003) รวมทั้งสามารถสร้างกรด เปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอซินในการต่อต้านการเติบโตของเชื้อก่อโรค (Saarela *et al*., 2000)

อาหารที่เสริมด้วยโปรไบโอติกโดยปกติจะเป็นอาหารหมัก ซึ่งในปัจจุบันที่พบกันมากที่สุดคือผลิตภัณฑ์ประเภทนมหมัก (Saarela *et al*., 2000) ดังนั้นการประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในอาหารที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์นม เช่น ผลิตภัณฑ์ธัญพืช เครื่องดื่ม หรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทยให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ นำมาคัดเลือกสมบัติซึ่งทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการว่าเหมาะสมสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติกและบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ เพื่อเป็นแนวทางในการหาแบคทีเรียแลกติกที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักอื่นๆ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและสุขภาพที่ดีของผู้บริโภคต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. อาหารหมักของไทยที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียแลกติก

อาหารหมักที่ใช้มีทั้งอาหารหมักจากสัตว์ ได้แก่ ปลาแป้งแดง จิ้งจัง บูดู ไตปลา ปลาร้า กุ้งส้ม หนาง น้ำเคย ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาส้มฟัก แหนม และกะปิ จำนวน 129 ตัวอย่าง อาหารหมักจากพืช ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง ข้าวหมาก ซีเซ็กฉ่าย สะตอดอง ขนมจีน หัวไชโป๊ หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง และตั้ง-ฉ่าย จำนวน 50 ตัวอย่าง รวม 179 ตัวอย่าง (Table 1, 2) ตัวอย่างเหล่านี้เก็บจากตลาดสดหรือตลาดนัดใน อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

2. การตรวจนับและการแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทยให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างอาหารหมักของไทยมา 10 กรัม หรือ 10 มล. ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เติม normal saline solution 0.85% ปริมาตร 90 มล. เจือจางลง 10 เท่าตามลำดับ ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกด้วยวิธี pour plate โดยใช้ De Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Difco) ที่เติม bromocresol purple 0.04% ทำ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 48 ชม. นับจำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด เก็บโคโลนีเชื้อที่รอบโคโลนีเป็นสีเหลือง และมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ streak บนอาหาร MRS agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 24 ชม. นำมาย้อมสีแกรม ดูการติดสี รูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ถ้าเป็นแบคทีเรียแลกติกติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน MRS agar slant ในตู้เย็น ถ่ายเชื้อทุก 2 สัปดาห์

3. การทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ไปทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้โปรไบโอติก

Table 1. Lactic acid bacteria in Thai fermented foods (from animal).

Thai fermented foods (from animal)	No. of collected samples	No. of detected samples	Percent detected samples	No. of lactic acid bacteria (CFU/g)	No. of isolates
Fermented fish (Pla-pang-dang)	17	13	76.5	$9.4x10^5$	49
Fermented fish (Jing-jung)	17	13	76.5	$10x10^5$	36
Fermented fish (Bu-du)	5	2	40.0	$8.0x10^5$	4
Fermented fish (Tai-pla)	28	5	17.9	$4.2x10^6$	6
Fermented fish (Pla-ra)	22	5	22.7	$5.7x10^7$	21
Fermented fish (Pla-som)	3	3	100.0	$4.4x10^7$	2
Fermented shrimp (Kung-som)	16	10	62.5	$5.4x10^6$	48
Fermented shrimp (Num-koei)	3	3	100.0	$3x10^6$	7
Fermented shrimp (Ka-pi)	3	0	0	0	0
Fermented beef (Nhang)	3	2	66.7	$4x10^9$	4
Fermented pork (Nham)	9	6	66.7	$9.5x10^7$	50
Fermented pork (Isan sausage)	3	3	100.0	$1.5x10^7$	7
Total	129	65	50.4	-	234

Table 2. Lactic acid bacteria in Thai fermented foods (from vegetable).

Thai fermented foods (from vegetable)	No. of collected samples	No. of detected samples	Percent detected samples	No. of lactic acid bacteria (CFU/g)	No. of isolates
Fermented vegetable (Puk-sian-dong)	3	3	100.0	$7.2x10^7$	9
Fermented vegetable (Puk-gard-dong)	14	9	64.3	$6.5x10^9$	30
Fermented vegetable (Naw-mai-dong)	7	3	42.9	$5.9x10^6$	24
Fermented vegetable (Sa-taw-dong)	2	2	100.0	$5.5x10^6$	18
Fermented vegetable (Kra-tium-dong)	5	1	100.0	$6.0x10^6$	3
Fermented vegetable (Hao-chai-po)	9	1	11.1	$5.6x10^6$	1
Fermented vegetable (See-jek-sai)	2	0	0	0	0
Fermented vegetable (Tang-sai)	1	0	0	0	0
Fermented rice (Khao-mark)	3	2	66.7	$4.2x10^7$	4
Fermented rice (Thai noodle)	4	1	25.0	$5.6x10^6$	2
Total	50	22	44	-	93

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายในท้องตลาด คือเชื้อรหัส LA1 เป็นตัวเปรียบเทียบ แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ ดังนี้

3.1 การทนต่อเกลือน้ำดี (Conway *et al*., 1987)

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากข้อ 2 มา streak ลงบน MRS agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี (bile salt) 0.15% แล้วนำเชื้อมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 24 ชม. แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร

3.2 การทนต่อกรด (Conway *et al*., 1987)

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 ถ่ายลงใน MRS broth ปริมาตร 6 มล ที่มีการปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้ได้ 2, 3 และ 4 นำเชื้อมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร

3.3 ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง (Michael and Pelezar, 1995)

1) การย่อยโปรตีน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Milk agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 48-72 ชม. ถ้ามีการย่อยโปรตีนจะเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อ

2) การย่อยไขมัน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 48-72 ชม. ถ้ามีการใช้ไขมันจะเกิดวงใสรอบๆ โคโลนี

3) การย่อยแป้ง

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มา streak บนอาหาร Starch agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 48-72 ชม. ทดสอบการย่อยโดยหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีการย่อยแป้งเกิดวงใสรอบๆ โคโลนี

3.4 การเจริญในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 ถ่ายลงใน MRS broth เชื้อละ 4 หลอด แบ่งเชื้อเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 คลายฝาเกลียว เก็บใน anaerobic jar แล้วนำไปบ่มที่ 35ºC เป็นเวลา 24 ชม. ชุดที่ 2 นำไปบ่มที่ 35ºC ภายใต้สภาวะที่มีอากาศเป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญทั้ง 2 สภาวะ โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.5 การเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน B12

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ถ่ายลงในหลอดอาหาร vitamin B12 assay medium (Difco) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร โดยใช้ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* เป็นเชื้อเปรียบเทียบ

3.6 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ (ดัดแปลงจาก Charteris *et al*., 1998)

ใช้ cotton swab ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5 ที่เลี้ยงใน MRS broth อายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง ปรับให้มีความขุ่น 0.5 Mc Farland (จำนวนประมาณ 10^8 CFU/มล) นำไปป้าย (swab) ให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร MRS agar แล้วปล่อยให้แห้ง 3-5 นาที จากนั้นวาง antibiotic discs จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ penicillin G (10 µg), ampicillin (10 µg), cephalothin (30 µg), ceftazidime (30 µg), cefoperazone (75 µg), vancomycin (30 µg), bacitracin (10 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), norfloxacin (10 µg) และ polymyxin B (30 µg) วางลงบนบริเวณที่ป้ายเชื้อไว้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 24 ชม. รายงานผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อดูว่าเชื้อดังกล่าว ไว (sensitive) หรือต้านทาน (resistant) ต่อยาปฏิชีวนะนั้นๆ

3.7 ความสามารถของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

1) การยับยั้งบนอาหารแข็ง (agar spot method) (Spelhaug and Harlander, 1989)

ทดสอบการยับยั้งโดย ใช้แบคทีเรียแลกติกจากข้อ 3.6 ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชม. นำมาปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland (จำนวนประมาณ 10^8 CFU/มล.) จากนั้นเจือจางลงอย่างเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อ 10^7 CFU/มล. หยดลงบนอาหาร MRS agar เชื้อละ 5 ไมโครลิตร แต่ละเชื้อห่างกัน 3 ซม. จานละ 4 เชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้ง บ่มเชื้อที่ 35ºC เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำมาเททับด้วย BHI soft agar มีวุ้น 0.7% ปริมาตร 7 มล ซึ่งมีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จำนวนประมาณ 10^6 CFU/มล (แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้มีจำนวน 13 สายพันธุ์ โดยมีแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์เป็นตัวควบคุม ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 แบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* แบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *S. typhimurium, S. typhi, S. sonei, P. rettgeri, E. coli* O157 : H7, *V. parahemolyticus, E. cloacae, E. aerogenes, P. vulgari* และ *S. flexneri*) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจผลการยับยั้ง คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทั้ง 13 สายพันธุ์ได้ดีคือมีวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) จากขอบแบคทีเรียแลกติกจนสุดขอบวงใสมากกว่า 10 มม. ไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

2) การยับยั้งโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (Gonzalez *et al*., 1993)

นำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เลี้ยงใน MRS broth ปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland จากนั้นเจือจางลงอย่างเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^4 CFU/มล และนำแบคทีเรียแลกติกที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชม. แล้วทำการปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland จากนั้นเจือจางลงอย่างเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อ 10^7 CFU/มล. นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มๆ ละ 2 มล. มาเพาะเลี้ยงร่วมกัน ส่วนชุดควบคุมจะไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลกติก หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 6 ชม. ตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย

อินดิเคเตอร์ในชุดควบคุมและชุดทดสอบด้วยวิธี pour plate ความเจือจางละ 2 ซ้ำ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ดังต่อไปนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (MCA) สำหรับ *E. coli* O157 : H7, *E. coli* ATCC 25922, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris* และ *P. rettgeri* อาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella-Shigella agar (SS) สำหรับ *S. typhimurium*, *S. typhi*, *S. flexneri* และ *S. sonnei* อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt agar (TCBS) สำหรับ *V. parahaemolyticus* อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Egg-Yolk Polymyxin agar (MYP) สำหรับ *B. cereus* อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Salt agar (MSA) สำหรับ *S. aureus* ATCC 25923 หาเปอร์เซนต์การยับยั้ง โดยใช้สูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{CFU/ml in control})-(\text{CFU /ml in associative culture})}{(\text{CFU/ml in control})} \times 100$$

3.8 การเจริญในอาหารที่ปราศจากแหล่งอาหารจากสัตว์ (ดัดแปลงจาก Heenan *et al*., 2002)

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7 ซึ่งมีจำนวนประมาณ 10^4 CFU/มล. ถ่ายเชื้อลงใน MRS broth และ soy peptone yeast extract agar (SPY2) (อาหารที่ปราศจากแหล่งอาหารจากสัตว์ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย soy peptone, yeast extract และน้ำตาลกลูโคส อย่างละ 25 กรัม) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 36 ชม. เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 36 ชม. มาวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดความขุ่นที่มีความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร และนับจำนวนเชื้อโดยวิธี spread plate บน MRS agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 48 ชม. และเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญใน MRS broth และ SPY2 โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.9 การอยู่รอดของแบคทีเรียแลกติกในระดับ pH 2, 3 และ 4

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.8 ถ่ายลงใน MRS broth ที่มีระดับ pH 2, 3 และ 4 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 3 ชม. ตรวจนับเชื้อก่อนและหลังบ่มโดยวิธี pour plate ด้วย MRS agar เพื่อดูจำนวนเชื้อที่เหลือรอด

4. การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ ตาม Bergey's manual determinative bacteriology volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และวิธีของ Salminen and Wright (1993)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเก็บตัวอย่างอาหารหมักของไทย 22 ชนิด จาก อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา เป็นอาหารหมักจากสัตว์ 129 ตัวอย่าง จากพืช 50 ตัวอย่าง รวม 179 ตัวอย่าง พบว่าอาหารหมักของไทยที่พบแบคทีเรียแลกติกมี 87 ตัวอย่าง เป็นอาหารหมักจากสัตว์ 65 ตัวอย่าง คิดเป็น 50.4% โดยมีจำนวนแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง 9.5×10^5 - 4.0×10^9 CFU/กรัม ส่วนอาหารหมักจากพืชพบแบตทีเรียแลกติก 22 ตัวอย่าง คิดเป็น 44% โดยมีจำนวนแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง 5.5×10^6 - 6.5×10^9 CFU/กรัม และจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มี 327 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักจากสัตว์มี 234 สายพันธุ์ (Table 1) และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักจากพืชมี 93 สายพันธุ์ (Table 2) อาหารหมักที่ตรวจไม่พบแบคทีเรียแลกติกในครั้งนี้ ได้แก่ กะปิ ซีเซ็กฉ่าย และตั้งฉ่าย เนื่องจากอาหารหมักเหล่านี้มีความเข้มข้นเกลือสูง (อรตรี, 2542) ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไม่มีการเติมเกลือ ดังนั้นอาหารหมักที่มีเฉพาะแบคทีเรียแลกติกชอบเกลือจึงไม่สามารถตรวจพบได้

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ 327 สายพันธุ์ ไปทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายในท้องตลาดคือเชื้อรหัส LA1 เป็นเชื้อเปรียบเทียบ สมบัติเบื้องต้นในการทดสอบคือการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารโดยการทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.15% และทนต่อกรดในกระเพาะอาหารซึ่งเมื่อรับประทานอาหารเข้าไปจะมีระดับพีเอชประมาณ 3-4 (Erkkila and Petaja, 2000) จากการทดสอบพบว่าแบคทีเรียแลกติก

สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้จำนวน 291 สายพันธุ์คิดเป็น 88.7% ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้ สามารถทนต่อกรดพีเอช 3-4 ได้ 290 สายพันธุ์คิดเป็น 99.7% ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้แยกมาจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักซึ่งส่วนใหญ่มีระดับพีเอชต่ำคือประมาณ 3-4 (อรตรี, 2542)

นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 290 สายพันธุ์ มาทดสอบการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่าเชื้อสามารถย่อยโปรตีน หรือไขมันหรือแป้งได้จำนวน 165 สายพันธุ์ คิดเป็น 56.9% ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ โดยแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้งส่วนใหญ่แยกได้จากอาหารหมักจากสัตว์ซึ่งมีสารอาหารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ การที่แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และแป้ง จะช่วยในการทำงานของระบบย่อยอาหาร ทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้เร็วขึ้น (Austin *et al*., 1995)

นำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 165 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากความสามารถในการใช้โปรตีนหรือไขมันหรือแป้งซึ่งคัดเลือกได้ มาทดสอบการเจริญทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน เพื่อความสะดวกในการผลิตเชื้อจำนวนมากรวมถึงการเก็บรักษาเชื้อ และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อความจำเป็นในการนำไปใช้ในระบบทางเดินอาหารซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบในระบบทางเดินอาหารไม่ต้องการออกซิเจน (Salminen and Wright, 1993) พบว่า เชื้อจำนวน 83 สายพันธุ์คิดเป็น 50.3% ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบเจริญทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำแบคทีเรียแลกติก 83 สายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้ มาทดสอบการเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 พบว่า มีเชื้อจำนวน 67 สายพันธุ์สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 ซึ่งคิดเป็น 80.7% ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ ซึ่งวิตามินนี้เป็นสารที่มีความสำคัญในการเป็นโคเอนไซม์ในการสังเคราะห์สารต่างๆ ในร่างกาย ดังนั้นในการคัดเลือกโปรไบโอติกเพื่อเสริมในอาหารเชื้อดังกล่าวจะต้องไม่แย่งวิตามินบี 12 ในระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภค

การใช้ยาปฏิชีวนะในทางการแพทย์และใช้ในการกระตุ้นการเติบโตของสัตว์ ทำให้ลักษณะการดื้อยาของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่น่าเป็นห่วงเป็นอย่างมากในการรักษาโรคติดเชื้อแต่สำหรับแบคทีเรียแลกติกพวกแลกโตแบซิลัสแม้มีการดื้อยาโดยธรรมชาติอย่างกว้างขวางแต่การดื้อยาส่วนใหญ่ของแลกโตแบซิลัสไม่ใช่ลักษณะที่ถ่ายทอดได้ นอกจากนี้พลาสมิดที่เกี่ยวกับการดื้อยาก็พบได้ยากในแลกโตแบซิลัส (Saarela *et al*., 2000) สำหรับรูปแบบการดื้อยาของแลกโตแบซิลัสแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค เช่น โรคท้องร่วง โรคติดเชื้อกับระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิง และโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (Charteris *et al*., 1998) ซึ่งจากการนำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 67 สายพันธุ์ มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดย disc diffusion ตามวิธีของ Charteris และคณะ (1998) พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ไวต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin, cephalothin, cefoperazone, tetracycline และ chloramphenicol และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ polymyxin B, kanamycin, streptomycin, norfloxacin และ vancomycin (Table 3) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ Charteris และคณะ (1998) ซึ่งรายงานว่าแลกโตแบซิลัสส่วนใหญ่ต้านต่อยา vancomycin แต่ลักษณะการดื้อยาของแลกโตแบซิลัสดังกล่าวไม่พบการถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่นและปลอดภัยต่อการใช้เป็นโปรไบโอติก (Saarela *et al*., 2000)

นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 67 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นรวม 13 สายพันธุ์ เช่น แบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหาร พบว่าเมื่อทดสอบโดยวิธี agar spot มีแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 13 สายพันธุ์ โดยมีวงใสการยับยั้งจากขอบเชื้อจนสุดวงใสมากกว่า 10 มม. และเมื่อทดสอบการยับยั้งโดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกดังกล่าวร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 13 สายพันธุ์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เหลือรอดหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกันเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียแลกติก พบว่ามีเปอร์เซนต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 80-100 (Figure 1) การยับยั้งดังกล่าวทำในสภาวะที่ไม่จำกัดการสร้างกรดอินทรีย์และ

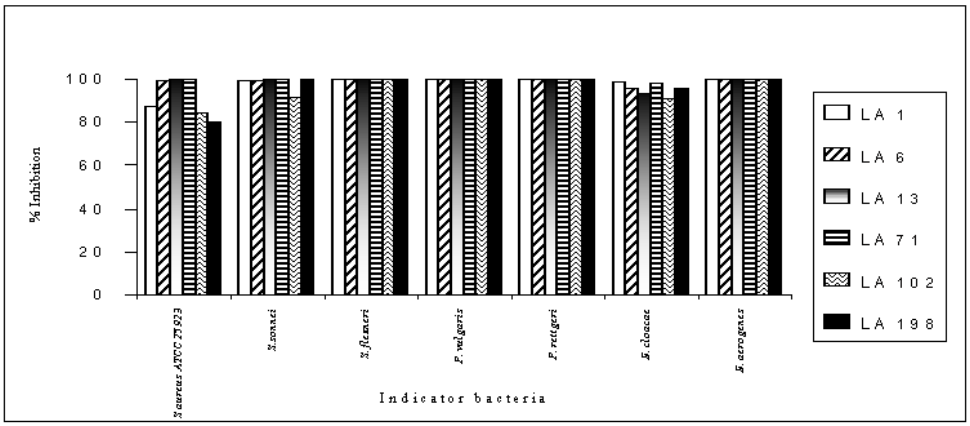
Table 3. Antibiotic susceptibility of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented foods.

Antibiotics	No. of isolates of lactic acid bacteria		
	Resistant (R)	Moderately susceptible (M)	Susceptible (S)
Penicillin G (10 µg)	2	22	43
Ampicillin (10 µg)	0	0	67
Cephalothin (30 µg)	0	0	67
Ceptazidime (30 µg)	6	12	49
Cefoperazone (75 µg)	0	0	67
Vancomycin (30 µg)	67	0	0
Bacitracin (10 µg)	45	2	20
Gentamicin (10 µg)	62	0	5
Kanamycin (30 µg)	67	0	0
Streptomycin (10 µg)	67	0	0
Tetracycline (30 µg)	0	0	67
Chloramphenicol (30 µg)	0	0	67
Erythromycin (15 µg)	8	2	57
Norfloxacin (10 µg)	67	0	0
Polymyxin B (30 µg)	67	0	0

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ดังนั้นการยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียแลกติกสร้างกรดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน หรือสร้างสารยับยั้งตัวอื่นๆ (วิลาวัณย์, 2543) ทั้งนี้แม้โปรไบโอติกหลายสายพันธุ์สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ แต่แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น ดังนั้นสารยับยั้งพวกกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติกที่โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น จึงมีความสำคัญมากกว่าเนื่องจากมีความสามารถในการยับยั้งได้กว้างกว่าโดยสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค (Ogawa *et al*., 2001; Saarela *et al*., 2000) และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวเป็นสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของโปรไบโอติก (Saarela *et al*., 2000)

ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกส่วนใหญ่ที่จำหน่ายในท้องตลาดมักอยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์นม (Saarela *et al*., 2000) ในขณะที่ในปัจจุบันมีผู้นิยมบริโภคอาหารมังสะวิรัติเพิ่มมากขึ้น (Heenan *et al*., 2000) ดังนั้นจึงทำให้เกิดความต้องการผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมังสะวิรัติ ซึ่งผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกดังกล่าวต้องปราศจากส่วนประกอบที่มาจากเนื้อสัตว์ รวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์โปรไบโอติกด้วย การวิจัยครั้งนี้จึงได้ทดลองนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ไปเลี้ยงในอาหาร SPY2 ซึ่งเป็นอาหารที่ปราศจากส่วนผสมที่มาจากเนื้อสัตว์ มีส่วนประกอบคือ soy peptone, yeast extract และน้ำตาลกูลโคส อย่างละ 25 กรัม/ลิตร (Heenan *et al*., 2000) โดยเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหาร MRS broth พบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญใน SPY2 และ MRS broth ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 4) จึงสามารถนำแบคทีเรียแลกติกดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกสำหรับผู้บริโภคอาหารมังสวิรัติได้

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ข้างต้นมาศึกษาการอยู่รอดในสภาวะเป็นกรดเป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่ระดับ pH 2 ซึ่งเป็นระดับ pH ในกระเพาะอาหารเมื่อท้องว่าง และระดับ pH 3 และ 4 ซึ่งเป็นระดับ pH ของกระเพาะอาหารเมื่อรับประทานอาหารเข้าไป พบว่าเชื้อสามารถอยู่รอดที่ระดับ pH 4 เกือบ 100% ส่วนที่ระดับ pH 2 และ 3 ในเวลา 3 ชั่วโมงเชื้อลดจำนวนลงประมาณ 1 log cycle โดยที่สายพันธุ์ LA71 สามารถมีชีวิตรอดได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ (Figure 2) ทั้งนี้เนื่อง



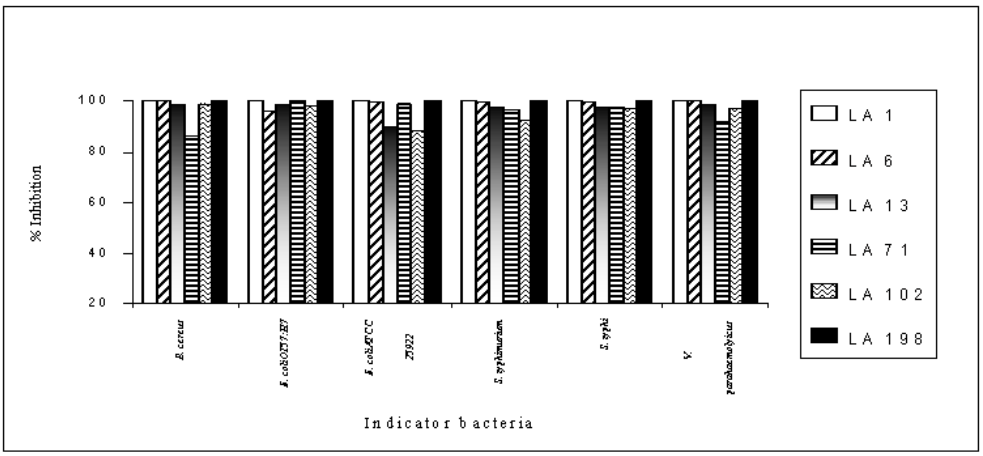


Figure 1. Inhibition percentage of the reference strain (LA1) and selected lactic acid bacteria from Thai fermented foods on bacterial indicators after 6 hrs of incubation of associative cultures in MRS broth at 37ºC.

Table 4. Growth of selected strains of lactic acid bacteria in vegetarian medium (SPY2) and MRS medium based on viable cells.

Lactic acid bacteria	Log_{10}CFU/ml							
	6 hrs		12 hrs		24 hrs		36 hrs	
	MRS	SPY2	MRS	SPY2	MRS	SPY2	MRS	SPY2
LA1[1]	6.24	6.23	7.26	7.25	8.28	8.28	8.28	8.28
LA6	6.24	6.23	7.25	7.25	8.27	8.28	8.27	8.28
LA13	6.20	6.20	7.23	7.22	8.26	8.26	8.26	8.26
LA71	6.29	6.28	7.30	7.29	8.32	8.32	8.32	8.32
LA102	6.15	6.13	7.18	7.17	8.20	8.20	8.21	8.20
LA198	6.18	6.18	7.20	7.20	8.23	8.23	8.24	8.24

[1]**The reference strain, was selected from commercial fermented milk**

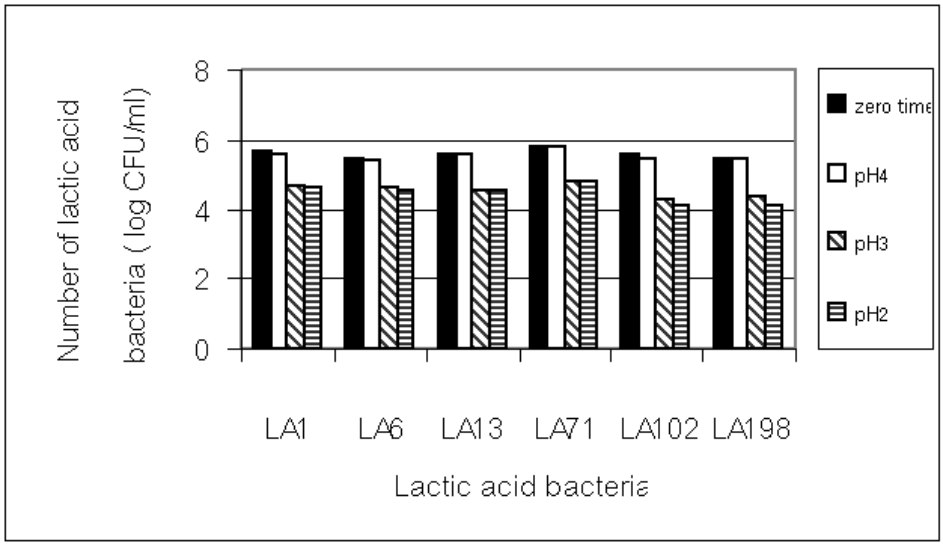


Figure 2. Survival of the reference strain (LA1) and selected strains of lactic acid bacteria at pH 2, 3 and 4 after 3 hrs of incubation at 37ºC.

จากเมื่อรับประทานอาหารเข้าไป pH ก็จะเพิ่มเป็น 3-4 การรับประทานอาหารเข้าไปอาหารจะช่วยป้องกันแบคทีเรียแลกติกจากกรดและเอนไซม์ต่างๆ ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้แบคทีเรียแลกติกมีชีวิตรอดได้ หลังจากการย่อยของอาหารซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-4 ชม. กระเพาะอาหารก็จะว่างทำให้ภายในกระเพาะอาหารมีค่า pH ลดลงต่ำกว่า 2 ซึ่งมีค่าต่ำมากสามารถทำลายแบคทีเรียแลกติกได้ (Erkkila and Petaja, 2000)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ LA71 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากแหนม เป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติที่สามารถทดลองได้ในระดับห้องปฏิบัติการว่าเหมาะสมในการใช้เป็นโปรไบโอติกคือสามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในระดับ pH 2-4 มีความสามารถในการย่อยแป้ง โปรตีนและไขมัน ไม่ต้องการวิตามินบี 12 ในการเติบโต สามารถเติบโตได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหารได้ดี สามารถเติบโตได้ดีในอาหารที่ปราศจากแหล่งอาหารที่มีที่มาจากเนื้อสัตว์ เติบโตได้ในที่มีเกลือสูงถึง 18% (Table 5) และเมื่อนำไปบ่งชี้ชนิดพบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* (Table 5) ในขณะที่โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่ใช้กันในทางการค้าในปัจจุบันส่วนใหญ่ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus, L. casei, L .rhamnosus* และ *Bifidobacterium* spp. (Saarela *et al*., 2000; Kaur *et al*., 2001 and Ouwehand *et al*., 2001) โดยผลิตจำหน่ายในรูปของแคปซูล เม็ด หรือเสริมในอาหารประเภทนมหมัก (Kaur *et al*., 2001) เช่นเดียวกับสายพันธุ์ LA1 ซึ่งแยกจากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในรูปของนมเปรี้ยวที่จำหน่ายในทางการค้าที่ใช้เป็นเชื้อเปรียบเทียบในการทดลองครั้งนี้ก็บ่งชี้ได้เป็น *Lactobacillus casei* (Table 5) จึงเห็นได้ว่าถ้ามีการนำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปทดลองใช้ในการผลิตอาหารประเภทอื่นที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์นมเพื่อเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภคจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทบวงมหาวิทยาลัย ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่กองบรรณาธิการฯ เรียนเชิญให้ตรวจสอบงานชิ้นนี้เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาตรวจสอบและแก้ไขงานชิ้นนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์

Table 5. Characteristics of the reference strain (LA1) and selected strain of lactic acid bacteria (LA71) isolated from Thai fermented foods.

Characteristic	LA1	LA71
Source of isolation	Commercial fermented milk	fermented pork (Nham)
Morphology	rod	rod
Gram stian	+	+
Catalase test	-	-
Growth at 10ºC	-	-
Growth at 35, 40ºC	+	+
Growth at 45ºC	-	-
Growth at pH 4.4, 8.5	+	+
Growth at pH 9.6	-	-
Growth in 6.5 %NaCl	+	+
Growth in 18 %NaCl	-	+
Fermentation of		
- amygdalin	+	+
- arabinose	-	+
- cellobiose	+	+
- esculin	+	+
- fructose	+	+
- galactose	+	+
- lactose	+	+
- maltose	+	+
- mannitol	+	+
- raffinose	-	+
- rhamnose	-	-
- sorbitol	+	+
- sucrose	+	+
- trehalose	+	+
Identification	*Lactobacillus casei*	*Lactobacillus plantarum*

+ = positive; - = negative

เอกสารอ้างอิง

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 22: 177-189.

อรตรี รอดเจริญ. 2542. การแยกเชื้อและลักษณะของเชื้อ *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, D.A.W., Effendi, I. And Griffith, D.R.W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases by *Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish disc., 18: 93-96.

Cebeci, A. and Gurakan, C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiol. 20: 511-518.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus species*. J. Food Prot., 61: 1636-1643.

Conway, P.L., Corback, S.L. and Goldin, B.R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell. J. Dairy Sci., 70: 1-12.

Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. J. Meat Science, 55: 297-300.

Gonzalez, S.N., Apella, M.C., Romero, N.C., De maciae, M.E. and Oliver, G. 1993. Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strain used in fermented milk. J. Food Prot., 56: 773-776.

Heenan, C.N., Adams, M.C., Hosken, R.W. and Flect, G.H. 2002. Growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian food products. J. Lebensm-Wiss.u.-Technol., 35: 171-176.

Kandler and Weiss. 1986. Bergey's manual determinative bacteriology. Vol.2. William & Wilkin. Baltimore.

Kaur, I.P., Chopra, K. and Saini, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. Eur. J. of Pharmace. Sci., 15: 1-9.

Michael, J. and Pelezar, J. 1995. Hydrolysis of polysaccharide protein and lipid. **In** laboratory exercises in microbiology. New York: MC GrawHill. pp.126-188.

Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Ymasaki, S., Takeda, T. and Takeda, Y. 2001. Inhibition of in vitro growth of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 by probiotic Lactobacillus strains due to production of lactic acid. Int. J. Food Microbiol., 68: 135-140.

Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tolkko, S. and Salminen, S. 2001. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. Inter. J. of Food Micro., 64: 119-126.

Reid, G. 1999. The scientific basis for probiotics strains of Lactobacillus. Appl. Environ. Microbio., 60: 3763-3766.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. of Biotechnology, 84: 197-215.

Salminen, S. and Wright, A.V. 1993. Lactic acid bacteria. Marcel Dekker Inc. New York.

Spelhaug, S.R. and Halander, S.K. 1989. Inhibition of foodborne bacteria pathogens by bacteriocin from *Lactococcus lactic* and *Pediococcus pentasaceous*. J. Food Prot., 52: 856-862.

Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research Inter., 36: 895-904.