วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2559 : 34 (2) : 67-76

การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

Preliminary Screening and Selection of Lactic Acid Bacteria with Potential Probiotic Properties from Fermented Meat Products

ผุสดี ตังวัชรินทร์[1] จิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์[1] และกานต์ สุขสุแพทย์[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นจากผลิต -ภัณฑ์เนื้อหมัก โดยแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจำนวน 42 ตัวอย่าง ได้แก่ แหนมหมู แหนมไก่ แหนมเนื้อ และไส้กรอกอีสาน ที่วางจำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพมหานคร จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจำนวนทั้งหมด 325 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียแลคติกที่เจริญได้ดีเยี่ยม และเจริญได้ดีจำนวน 237 ไอโซเลท (72.92%) และ 17 ไอโซเลท (5.23%) ตามลำดับ จากนั้นทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium และ *Escherichia coli* ด้วยวิธีการ agar spot พบว่าแบคทีเรียแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท (10.24%) มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษทุกสายพันธุ์ โดยมีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 3 และ 26 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตในสภาวะกรดที่ค่า pH 2 และ 3 โดยมีปริมาณ 10^1 - 10^2 cfu/ml และ 10^1 – 10^4 cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียแลคติกทุกไอโซเลทสามารถทนและเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3%, 0.6% และ 1% โดยมีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลท ที่สามารถทนในสภาวะที่ค่า pH 2 - 3 และเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 1% ได้มากกว่า 60% ซึ่งมีสมบัติของโปรไบโอติกเบื้องต้นที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอ-ติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักต่อไป

คำสำคัญ : การคัดเลือก การคัดแยก แบคทีเรียแลคติก โปรไบโอติก ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

Abstract

The aims of this study were preliminary screen and select for preliminary property of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented meat products. The LABs were isolated from fermented meat products 42 samples such as pork Nham, chicken Nham, beef Nham and fermented sausages that in Bangkok 's local markets. Among 325 LAB isolates obtained, 237 isolates (72.92%) and 17 isolates (5.23 %) showed excellent and well growth rate, respectively. The antibacterial activity of LABs against 4 pathogenic bacteria namely, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli*, was detected by agar spot test. The growth of all pathogens was inhibited by 26 LAB isolates (10.24%). In acid condition at pH 3 and 4, the 3 and 26 LAB isolates survived in range of 10^1 - 10^2 and 10^1 – 10^4 cfu/ml, respectively. However, all LAB isolates tolerated and grew in 0.3, 0.6 and 1% bile salt conditions. The 8 LAB isolates tolerated at pH 2-3 condition and grew more than 60% in 1% bile salt condition that are preliminary probiotic property. These LABs are suitable probiotic culture for application in fermented meat products.

Keywords: selection, screening, lactic acid bacteria, probiotic, fermented meat products

1 ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

โปรไบโอติก (probiotic) เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งช่วยปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหาร โดยช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษเกาะติดผนังลำไส้ และหลั่งสารพิษที่มีผลทำให้เยื่อบุลำไส้อักเสบ จากสมบัติดังกล่าวจึงได้มีการนำเอาโปรไบโอติกมาใช้ในการรักษาหรือบรรเทาอาการท้องเดิน และลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด โดยแบคทีเรียโปรไบโอติกที่สำคัญ ได้แก่ *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp.ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวกไม่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นท่อนยาว หรือสั้น และกลม หรือเกาะกันเป็นสายยาว รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปตามสิ่งแวดล้อม สามารถทนกรดได้ดี (Erkkilä and Petäjä, 2000) ส่วนมากแบคทีเรียแลคติกต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) แต่มีเพียงบางชนิดที่ไม่ต้องการอากาศสำหรับการเจริญ มักพบในอาหารหมักดอง เช่น เนื้อหมัก นมหมัก ผักดอง และปลาหมัก โดยมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก เช่น การผลิตกรดอินทรีย์ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในผลิตภัณฑ์ลดลง การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซินช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษและผลิตไดอะเซติลเป็นสารให้กลิ่นรส (Ammor et al., 2006) ในปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญต่อสุขภาพและความปลอดภัยมากขึ้น ดังนั้นการใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจึงช่วยส่งเสริมกระบวนการหมัก ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่อาจปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ โดยแบคทีเรียที่มีสมบัติโปรไบโอติกต้องมีลักษณะทนต่อสภาวะในกระบวนการหมัก ทนต่อความเป็นกรด-ด่าง และเกลือน้ำดี จึงได้มีการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก และนำมาประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Leroy et al., 2006) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่จำหน่ายในตลาดสดในกรุงเทพมหานคร

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักท้องถิ่นที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร จำนวน 42 ตัวอย่าง ได้แก่ แหนมหมู แหนมซี่โครงหมู แหนมเนื้อ แหนมเอ็นไก่ และไส้กรอกอีสาน โดยการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกตามวิธีการของ Murray *et al*. (1994) และ Axelsson (1993) โดยชั่งตัวอย่างอาหารที่เป็นของแข็ง 25 กรัม ลงในสารละลายน้ำเกลือเข้มข้นที่ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร streak plate บนอาหาร de man Rogosa and Sharp (MRS) agar แล้วนำสารละลายตัวอย่างมาทำการเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้น pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีขนาด รูปร่างและสีที่แตกต่างกัน ตรวจสอบสมบัติแบคทีเรียแลคติกเบื้องต้นโดยการย้อมสีแกรม ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และการสร้างเอนไซม์คะตะเลส จากนั้นเก็บรักษาแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการเติมสารละลาย glycerol ความเข้มข้นสุดท้าย 20% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไอโซเลทที่มีสมบัติเป็นแบคทีเรียแลคติกเบื้องต้นไปศึกษาความสามารถในการเจริญต่อไป

2. การวิเคราะห์ค่า pH ของผลิตภัณฑ์

การวิเคราะห์ค่า pH ของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โดยดัดแปลงวิธีการ AOAC. (1984) ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจำนวน 10 กรัม ผสมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องตีปั่นไฟฟ้า (Stomacher Bag Mixer 400 model VW, France) ทำการวัดค่า pH ของผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องวัด pH Mettler Toledo 320 (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) และบันทึกค่า pH ของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักต่างๆ

3. การวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกดัดแปลงจากวิธีการของ ภณิดา และคณะ (2557) โดยถ่ายแบคทีเรียแลคติกที่ได้จากการคัดแยกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดการเจริญด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Shimadzu model UV – 1601, Japan) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยวิเคราะห์ค่าความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกจำนวน 3 ซ้ำต่อไอโซเลท เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ตั้งแต่ 1 ถึง 1.5 และทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษต่อไป

4. ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษด้วยวิธี agar spot (Schillinger and Lucke, 1989) โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง นำเชื้อ 1 ลูป แตะบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการผสมเชื้อ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium และ *Escherichia coli* เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE soft agar โดยแบคทีเรีย 1 ชนิดต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีจำนวนแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษเริ่มต้นที่ 10^6 cfu/ml เท soft agar ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วจานอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบันทึกข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ และคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง เพื่อนำไปคำนวณหาค่าประสิทธิภาพของการยับยั้ง ดังสมการด้านล่างโดยดัดแปลงวิธีการของ Makras and Vuyst (2006)

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ

= ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี – ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี

ทำการแปลงค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษเป็น 4 ระดับ ดังนี้ คือ (-) คือ ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่ 0 มิลลิเมตร (+) คือ ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่ 1 - 8 มิลลิเมตร (++) คือ ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่ 8 - 12 มิลลิเมตร (+++) คือ ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่มากกว่า 12 มิลลิเมตร ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีค่าประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้ง 4 สายพันธุ์ เพื่อทำการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่ pH ต่าง ๆ และระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีต่าง ๆ ต่อไป

5. การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในสภาวะค่า pH ต่าง ๆ

การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในค่า pH ต่างๆ ดัดแปลงวิธีการของ Erkkilä and Petäjä (2000) โดยนำแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่ได้มาทำการศึกษาการรอดชีวิตในค่า pH ต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ทำการปรับค่า pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ด้วยสารละลาย 5 N NaOH และ 8 N HCl โดยมีแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นประมาณ 10^6 cfu/ml และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนับปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิต ด้วยวิธี pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่มีค่า pH 2 - 8 ร่วมกับสภาวะที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้น เพื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติโปรไบโอติกเบื้องต้นไปเก็บรักษา และนำไปศึกษาการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติกต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติก

การศึกษาการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติก ดัดแปลงวิธีการของ Erkkilä and Petäjä (2000) และ Garcia-Ruiz *et al*. (2014) โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (กลุ่มควบคุม) และที่มีการเติมเกลือน้ำดี (bile salts) ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6 และ 1.0% ซึ่งทำการปรับค่า pH 8 ด้วยสารละลาย 5 N NaOH โดยมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นประมาณ 10^5 cfu/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นหาจำนวนของแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตทุกระดับความเข้มข้นเกลือน้ำดีด้วยวิธี pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียแลคติกแต่ละกลุ่ม และคำนวณหาร้อยละการเจริญดังสมการ

$$\text{ร้อยละการเจริญของแบคทีเรียแลคติก} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่างๆ}}{\text{จำนวนแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติโปรไบโอติกเบื้องต้น และทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 1.0 % โดยมีร้อยละการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่มากกว่าร้อยละ 60 ขึ้นไป เพื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพมหานคร จำนวน 42 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ได้ทั้งหมด 375 ไอโซเลท เพื่อทำการทดสอบสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกด้วยการย้อมสีแกรม การสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสจำนวน 354 ไอโซเลท และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 325 ไอโซเลท โดยมีเซลล์ที่มีรูปท่อน 259 ไอโซเลท และทรงกลมจำนวน 66 ไอโซเลท (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สมใจ และคณะ (2550) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักชนิดต่างๆ จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จำนวน 131 ไอโซเลต มีรูปร่างท่อน 110 ไอโซเลท รูปไข่ 7 ไอโซเลท และทรงกลมจำนวน 14 ไอโซเลท เช่นเดียวกับ ภณิดา และคณะ (2557) ทำการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างผัก และอาหารหมักรวมจำนวน 32 ตัวอย่าง โดยคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้ 10 ไอโซเลท และจากผลิตภัณฑ์อื่นๆ 99 ไอโซเลท ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง หรือกลม และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยจากการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูได้มากที่สุด รองลงมาคือ แหนมหมู ไส้กรอกอีสานหมู แหนมเนื้อวัว และแหนมเอ็นไก่ ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มีค่าเฉลี่ย 10.00, 8.00, 7.63, 6.50 และ 6.00 ไอโซเลทต่อตัวอย่าง ตามลำดับ (Table 2)

เนื่องจากผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรหมัก ได้แก่ ไส้กรอกอีสาน แหนมหมู และแหนมซี่โครงหมูมีค่า pH อยู่ในช่วง 4.1 – 4.7 อาจแสดงได้ว่า ผลิตภัณฑ์มีกิจกรรมกระบวนการหมัก และจำนวนแบคทีเรียแลคติกมาก ส่งผลให้ผลิตกรดมาก ทำให้ค่า pH ของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วงค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อวัว และแหนมเอ็นไก่ มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.5 – 4.9 แสดงได้ว่าผลิตภัณฑ์มีกิจกรรมกระบวนการหมักและจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่น้อยกว่า จึงส่งผลให้พบแบคทีเรียแลคติกน้อยกว่าแหนมหมูและไส้กรอกอีสาน นอกจากนี้ Ruiz-Moyano *et al.* (2008) ยังได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแห้งไอบีเรีย ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้จำนวนทั้งหมด 363 ไอโซเลท เป็น *Lactobacillus* spp., *Lactococci* spp. และ *Enterococci* spp. จำนวน 263, 44 และ 56 ไอโซเลท ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1. Screening number of LAB isolated from fermented meat products collected from local market in Bangkok.

Fermented meat product	Expected LAB colony number			LAB isolate number	
	MRS agar	Catalase test (-)	Gram stain (+)	Bacilli	Cocci
Nham (pork)	220	216	206	160	46
Nham (pork ribs)	24	22	20	19	1
Nham (beef)	20	15	13	11	2
Nham (chicken tendon)	10	6	6	6	-
Thai fermented sausage	101	95	80	63	17
Total	375	354	325	259	66

Table 2 Number of LAB isolated from fermented meat products collected from local market in Bangkok.

Traditional fermented meat product	pH value of samples	Sample number	LAB isolate number	LAB isolate number per sample
Thai fermented sausage (pork)	4.3 – 4.7	10	80	8.00
Nham (pork)	4.1 – 4.7	27	206	7.63
Nham (pork ribs)	4.2 – 4.6	2	20	10.00
Nham (beef)	4.7 – 4.9	2	13	6.50
Nham (chicken tendon)	4.5 – 4.6	1	6	6.00
Total		42	325	

2. การวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

การวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกใน Table 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียแลคติกที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Abs_{600nm}) โดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกจำนวน 237 ไอโซเลท (72.92%), 17 ไอโซเลท (5.23%) และ 71 ไอโซเลท (21.85%) สามารถเจริญได้ดีเยี่ยม เจริญได้ดี และเจริญได้ไม่ดี ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 254 ไอโซเลท ที่มีค่า Abs_{600nm} ตั้งแต่ 1 ขึ้นไป เพื่อทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษต่อไป

Table 3 LAB growth isolated from fermented meat products in Bangkok's markets.

Absorbance (Abs_{600nm})	Growth levels	Isolate number	Isolate Percentages
> 1.5	Excellent-growth	237	72.92
1.0 – 1.5	Well- growth	17	5.23
< 1.0	Poor-growth	71	21.85
Total		325	100.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S.* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยเทคนิค agar spot assay (Schillinger and Lucke, 1989) พบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้งหมดจำนวน 254 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S.* Typhimurium และ *E. coli* จำนวน 53, 57, 45 และ 57 ไอโซเลท ตามลำดับ (Table 4) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tharmaraj and Shah (2009) พบว่า โปรไบโอติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีบริเวณการยับยั้งการเจริญ 19 และ 14 มิลลิเมตร ตามลำดับ อีกทั้งสอดคล้องกับ Shanthya *et al*. (2011) ที่ทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมลบของแบคทีเรียแลคติก พบว่า เชื้อ Lactobacilli สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* ได้โดยมีค่าความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญอยู่ที่ 26 และ 28 มิลลิเมตร ตามลำดับ อีกทั้ง Hwanhlem *et al.* (2011) ยังได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากปลาส้มจำนวน 14 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ *S. salivarius* LD219, *Enterococcus faecalis* LPS04, LPS17 และ LPS18 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* sp., *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีที่สุด

Table 4 Inhibition zone[1] of LAB isolated from fermented meat products in Bangkok's markets.

Pathogen growth inhibition	Inhibition zone (mm)	(+++)	(++)	(+)	(-)
L. monocytogenes	isolate no.	1	9	43	201
	percentages	0.39	3.54	16.93	79.13
S. aureus	isolate no.	5	10	42	197
	percentages	1.97	3.94	16.54	77.56
S. Typhimurium	isolate no.	2	9	34	209
	percentages	0.79	3.54	13.39	82.28
E. coli	isolate no.	2	4	51	197
	percentages	0.79	1.57	20.08	77.56

[1] (-) : ≤ 0 mm; (+) : 1 - 8 mm; (++) : 8 - 12 mm; (++) : > 12 mm.

Table 5 แสดงความสามารถของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ โดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S.* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้เป็นจำนวน 42 และ 36 ไอโซเลท ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lima *et al.* (2007) ที่ทำการคัดแยกเชื้อ Lactobacilli จากกระเพาะพักและไส้ติ่งของลูกไก่ พบว่าเชื้อ Lactobacilli จำนวน 265 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบโดยเชื้อ *Lactobacillus* spp. โดยเฉพาะเชื้อ *L. reuteri* และ *L. salivarius* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* และ *Salmonella* spp. ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้ง 4 สายพันธุ์ (26 ไอโซเลท) เพื่อนำไปศึกษาการรอดชีวิตในช่วง pH ต่างๆ และการทนต่อเกลือน้ำดีต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 5 Isolated number of LAB on pathogens growth inhibition.

Pathogens growth inhibition[1]	Isolate number of LAB
0 strain (no inhibition zone)	29
1 strain (each single of positive and negative gram)	44
2 stains (each single of positive and negative gram)	54
2 stains of positive gram	42
2 stains of negative gram	36
3 stains	23
4 stains	26

[1] indicator strains (*S. aureus, L. monocytogenes, S.* Typhimurium and *E. coli*).

4. การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในสภาวะค่า pH ต่าง ๆ

จากการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่ช่วง pH ต่างๆ โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก 26 ไอโซเลท ใน MRS broth ที่มีการปรับค่า pH ที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 พบว่า ที่สภาวะค่า pH 2 มีแบคทีเรียแลคติกเพียงจำนวน 3 ไอโซเลท ที่สามารถในการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 10^1 ถึง 10^2 cfu/ml ในขณะที่สภาวะค่า pH 3 มีแบคทีเรียแลคติก จำนวน 26 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตอยู่ในช่วง 10^1 ถึง 10^4 cfu/ml (Table 6) ที่สภาวะค่า pH 4 มีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 18 และ 8 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตอยู่ในช่วง 10^4 ถึง 10^5 และมากกว่า 10^6 cfu/ml ตามลำดับ และที่สภาวะค่า pH 5 - 8 แบคทีเรียแลคติกทั้ง 26 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตและเจริญได้มากกว่า 10^6 cfu/ml ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียแลคติกมีค่า pH เหมาะสมต่อการเจริญโดยอยู่ในช่วง 5.58 - 6.20 แต่จะมีอัตราการเจริญลดลงเมื่อมีค่า pH ลดลง หรือเพิ่มขึ้น (Salminen *et al*., 1993) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ Ruiz - Moyano *et al.* (2008) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากไส้กรอกหมักแห้งไอบีเรียโดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญได้ดีที่ค่า pH 5 และ 5.5 โดยมีความสามารถในการรอดชีวิตได้ถึง 34.6 % โดยมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่ 6 - 8 log cfu/g ภายหลังการบ่ม 24 ชั่วโมง ในขณะที่สภาวะค่า pH 4 แบคทีเรียแลคติกสามารถรอดชีวิตได้ลดลงเหลือเพียง 10 %

Table 6 Survival of LABs at different pH level conditions.

pH	Isolates No. at difference growth levels (cfu/ml)					
	$< 10^1$	10^1-10^2	10^2-10^3	10^3-10^4	10^4-10^5	$> 10^6$
2	23	3	-	-	-	-
3	-	9	11	6	-	-
4	-	-	-		18	8
5	-	-	-	-	-	26
6	-	-	-	-	-	26
7	-	-	-	-	-	26
8	-	-	-	-	-	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติก

จาก Table 7 แสดงความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติก โดยดัดแปลงวิธีการจาก Erkkilä and Petäjä (2000) และ Garcia-Ruiz *et al*. (2014) พบว่า ที่ทุกระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่สามารถทนและเจริญได้ จากแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 26 ไอโซเลท มีแบคทีเรียแลคติกที่สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 1.0% และมีการเจริญร้อยละ 100 มีจำนวน 10, 7 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Bao *et al.* (2010) โดยพบว่า การคัดเลือกโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus fermentum* จากผลิตภัณฑ์นมจำนวน 11 สายพันธุ์โดย *L. fermentum* F6 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้มากที่สุด ในขณะที่ *L. fermentum* IMAU60151, IMAU60083, IMAU20080 และ IMAU60120 มีความสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ต่ำกว่า เช่นเดียวกับ Zoumpopoulou *et al*. (2007) พบว่า *L. fermentum* ACA-DC 179 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ถึงความเข้มข้น 2% ในขณะที่ Lin *et al*. (2007) ทำการคัดแยก *L. fermentum* SGM3 จากเนื้อไก่ พบว่าสามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 0.3% ได้ 100% และเมื่อพิจารณาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่สภาวะ pH 2 - 3 ร่วมกับเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 % ซึ่งสามารถเจริญได้มากกว่า 60% มีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลท ที่มีสมบัติดังกล่าว ได้แก่ 1011C2, 1011-1C2, 1012C2, 2021B1, 5031A2, 601-21B1, 73-21A2 และ 8031C1

Table 7 Growth percentages of LABs at different bile salt concentrations.

Strain	% Growth in bile salt concentration			Strain	% Growth in bile salt concentration		
	0.30%	0.60%	1.00%		0.30%	0.60%	1.00%
1011B1	99.55	100.00	100.00	2021B1	98.88	98.01	82.95
1011B2	98.42	86.54	54.66	4011A1	12.20	13.20	12.60
1011C2	100.00	100.00	91.42	43-11A2	97.86	92.44	21.42
1011-1C2	100.00	98.77	68.41	5031A2	97.13	100.00	79.67
1012C2	100.00	100.00	100.00	601-12A2	100.00	60.59	14.50
1031B1	90.19	83.02	72.39	601-22B1	12.00	13.20	12.80
1031C2	11.77	15.44	18.76	601-21B1	100.00	96.04	85.97
1032A1	94.19	67.99	29.94	612-32C1	100.00	66.33	56.98
12-11A3	100.00	100.00	8.22	73-21A2	100.00	75.04	61.76
13-12B1	100.00	93.46	64.14	73-11C2	100.00	100.00	100.00
13-12B2	45.43	25.61	12.80	73-11A1	88.72	100.00	38.80
14-21A2	98.83	84.84	30.38	8031C1	93.43	95.42	66.26
14-22B1	97.37	65.70	22.43	9011B1	98.31	93.75	30.41

อีกทั้งการศึกษานี้ยังพบว่า แบคทีเรียแลคติกบางไอโซเลทสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจาก เกลือน้ำดีส่งผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นความสามารถในการทนต่อน้ำดีจึงถือเป็นลักษณะสำคัญของ *Lactobacillus* ซึ่งช่วยให้รอดชีวิตได้ในการย่อยและการดูดซึมของระบบทางเดินอาหาร (Sanders *et al*., 1996) นอกจากนี้เกลือน้ำดีมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ *Lactobacillus* แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และความเข้มข้นของเกลือน้ำดี ซึ่งความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในลำไส้มีแปรปรวนตั้งแต่ 1.5 % ถึง 2.0 % (w/v) ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร และหลังจากนั้นลดลงประมาณ 0.3 % (w/v) โดยการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แลคติกขึ้นอยู่กับความสามารถในการไฮโดรไลซ์เกลือน้ำดีของแต่ละสายพันธุ์ เพื่อลดความเป็นพิษเกลือน้ำดีต่อเซลล์ของแบคทีเรียแลคติก (Noriega *et al.*, 2004) และเมื่อพิจารณาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่สภาวะ pH 2 - 3 ร่วมกับเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 % ซึ่งสามารถเจริญได้มากกว่า 60% มีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลท ที่มีสมบัติดังกล่าว ได้แก่ 1011C2, 1011-1C2, 1012C2, 2021B1, 5031A2, 601-21B1, 73-21A2 และ 8031C1

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษา สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้ 325 ไอโซเลท แต่มีแบคทีเรียแลคติกเพียง 26 ไอโซเลท ที่มีความสามารถการเจริญได้ดี และยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ และมีแบคทีเรียแลคติก 8 ไอโซเลท ที่สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะ pH 3 และเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 1% ซึ่งเป็นสมบัติเบื้องต้นของโปรไบโอติกที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ภณิดา เกื้อสุวรรณ, วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล และดวงพร คันธโชติ. 2557. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง. รายงานประชุมวิชาการเสนอผลงานระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 15. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 667-676.

สมใจ ศิริโภค, ประวัติ อังประภาพรชัย, ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 23: 92-114.

AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.

Ammor, S., G. Tauveron, E. Dofour and L. Chevallier. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1. Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control. 17 : 454-461.

Axelsson, L.T. 1993. Lactic Acid Bacteria : Classification and physiology. *In* Salminen, S., Ed. Von Wright, A. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, New York.

Bao, Y., Y.C. Zhang, Y. Zhang, Y. Liu, S.Q. Wang, X.M. Dong, Y.Y. Wang and H.P. Zhang. 2010. Screen of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional daily products. Food Control. 21: 695-701.

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

García-Ruiz, A., D.G. de Llano, A. Esteban-Fernández, T. Requena, B. Bartolomé and M.V. Moreno-Arribas. 2014. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. Food Microbiol. 44: 220-225.

Hwanhlem, N., S. Buradaleng, S. Wattanachant, S. Benjakul, A. Tani and S. Maneerat. 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. Food Control. 22: 401-407.

Leroy, F., J. Verluyten and L. Vuyst. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. Int. J. Food Microbiol. 106: 270-285.

Lima, E.T., R.L.A. Filho, A.S. Okamoto, J.C. Noujaim, M.R. Barros and A.J. Crocci. 2007. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. Can. J. Vet. Res. 71: 103-107.

Lin, W.H., B. Yu, S.H. Jang and H.Y. Tsen, 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. Anaerobe,13: 107-113.

Makras, L. and L.D. Vuyst. 2006. The *in vitro* inhibition of gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. Int. Dairy J. 16: 1049-1057.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Murray, J.M., M. Tavassoli, R. Al-Harithy, K.S. Sheldrick, A.R. Lehmann, A.M. Carr and F.Z. Watts. 1994. Structural and functional conservation of the human homolog of the *Schizosaccharomyces pomberad2*gene, which is required for chromosome segregation and recovery from DNA damage. Molecular Cellular Biol. 14: 4878-4888.

Noriega, L., M. Gueimonde, B. Sanchez, A. Margolles, C.G. de los ReyesGavilan. 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low PH and cross resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. Int. J. Food Microbiol. 94: 79-86.

Ruiz-Moyano, S., A. Martín, M.J. Benito, F.P. Nevado and M.D.G. Córdoba. 2008. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. Meat Sci. 80: 715-721.

Salminen, S., M. Deighton and S. Gorbach. 1993. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, New York.

Sanders, M.E., Walker, D.C., Walker, K.M., Aoyama, K. and T.R. Klaenhammer. 1996. Performance of commercial cultures in fluid milk applications. J. Dairy Sci., 79: 943-955.

Schillinger, U. and F.K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1901-1906.

Shanthya, R., S. Saranya and N.H. Shenpagam. 2011. Antagonistic effects of lactobacilli on gram-negative bacteria. J. Adv. Lab. Res. Biol. 2: 70-72.

Tharmaraj, N. and N.P. Shah. 2009. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-base dips. Int. Food Res. J. 16: 261-276.

Zoumpopoulou, G., B. Foligne, K. Christodoulou, C. Grangette, B. Pot and E. Tsakalidou. 2007. *Lactobacillus fermentum* ACA-DA 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. Int. J. Food Microbiol. 121: 18-26.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้