

ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งข้าวหมาก

อรุณ ชานชัยเชาว์วิวัฒน์* และอัษฎวิทย์ อุเทนสุต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ 10600

*E-mail: arunchan_57@hotmail.com

รับบทความ: 18 สิงหาคม 2556 ยอมรับตีพิมพ์: 3 ตุลาคม 2556

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติก *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 และตรวจสอบการอยู่รอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารด้วยวิธี viable cell count ผลการทดลองพบว่า ค่าความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งของ *Pediococcus pentosaceus* โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 และ 7.0 ให้ผลการยับยั้งในภาพรวมดีที่สุด ซึ่งที่ภาวะนี้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก 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* แบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร เพปซิน น้ำดี

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

Arun Chanchaichavivat* 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 flexneri*, *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 pentosaceus* AUB1, ATB1 and SRB1, which were cultivated at temperatures of 30 °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. pentosaceus* 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. pentosaceus*.

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

บทนำ

ลูกแป้งเป็นแหล่งจุลินทรีย์ย่อยแป้งและน้ำตาล เกิดจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของชาวเอเชียรวมทั้งคนไทยที่สามารถทำลูกแป้งไว้ใช้เป็นหัวเชื้อหมักข้าวหนึ่งสำหรับทำขนมหวานที่มีแอลกอฮอล์เล็กน้อย คือ ข้าวหมาก และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น สาโท กระแช่ และอุ ลูกแป้งสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานนับเดือน ในลูกแป้งข้าวหมากประกอบด้วยจุลินทรีย์ 3 ประเภท คือ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยมีองค์ประกอบของสปอร์ไฟรแต่ละท้องถิ่นผสม เช่น กานพลู พริกไทยตีปี้ กระเทียม และขิง สปอร์ไฟรเหล่านี้มีสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดรสชาติของข้าวหมากไม่ดีโดยยอมให้จุลินทรีย์บางชนิดที่ไว้วัตถุประสงค์ซึ่งเป็นข้าวพื้นเมืองของแต่ละประเทศได้และให้กลิ่นดี (วีระสิทธิ์ กัลยาณกุล และวรงค์ดี ช่างภา, 2553; Rajsekhar et al., 2012) จากการศึกษาวิจัยจุลินทรีย์ในลูกแป้งพบชนิดของราย่อยแป้งที่สำคัญ ได้แก่ *Amylomyces rouxii*, *Endomycopsis fibuligera*, *Hansenula anomala* และ *Rhizopus oryzae* สำหรับยีสต์ในลูกแป้งมีหน้าที่ใช้น้ำตาลที่เป็นผลผลิตจากการย่อยแป้งโดยราแล้วเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ (เอทานอล) และบางชนิดให้ผลผลิตเป็นเอสเทอร์ (ester) ซึ่งให้กลิ่นเฉพาะกับผลิตภัณฑ์ ลูกแป้งจากบางท้องถิ่นอาจพบแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติก (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 โสฬ์ทอง, 2537)

ปัจจุบันมีการศึกษาสมบัติและประโยชน์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotic) ค่อนข้างมาก จนกระทั่งผลิตเป็นการค้าในรูปของเป็นอาหารเสริมโพรไบโอติก ซึ่งพบว่ามีประโยชน์ต่อผู้บริโภคโดยช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของการทำงานของ

อาหารและลดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร แบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ที่สำคัญ ได้แก่ *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. crispatus* และ *Bifidobacterium* spp. (ไชยวัฒน์ ไชยสุด, 2554; Holzapfel and Schillinger, 2002) แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในอาหารหมักส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ จุลินทรีย์พวกนี้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่มแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และกรดแลคติกยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมทั้งมีสมบัติทนต่ออาหารไม่ให้น่าเสียเร็ว จึงมีความพยายามผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อใช้ยืดอายุของอาหารแทนสารเคมีกันบูด (Cleveland et al., 2001) แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactococcus lactis* ผลิตแลคทิซิน (lacticin) *L. sake* ผลิตซาคาซิน (sakasin) และ *Pediococcus acidilactici* ผลิตเพดิโอซิน (pediocin) (Henderson et al., 1992; Holck et al., 1992; Ryan et al., 1996) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่แลคติกแบคทีเรียที่พบในลูกแป้งข้าวหมากของไทยจะมีสมบัติเป็นโพรไบโอติก สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้ในอนาคต

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติก *Pediococcus pentosaceus* AUB1 ATB1 SRB1 และ LBB1 ซึ่งแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากต่อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *Escherichia* *Staphylococcus aureus* *Salmonella typhi* *Shigella flexneri* *Shigella boydii* และ *Shigella sonnei* ที่ภาวะค่าความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิต่างกัน และตรวจสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร เพื่อเป็นข้อมูลแสดงสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติก *P. pentosaceus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ และเป็นข้อมูลในการพิจารณานำแบคทีเรียกรดแลคติกนี้ไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์

1. แบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ AUB1 LBB1 ATB1 และ SRB1 คัดแยกได้จากลูกแบ่งข้าวหมากที่ผลิตในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา 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

ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียกรดแลกติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ค่าความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิต่างกัน

1. เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียโดยเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติก *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. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยวิธี 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) ด้วยแท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อ รอจนผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นเจาะอาหารแข็งด้วยแท่งโลหะกลวง (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร ตูดหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละสายพันธุ์ด้วยปิเปต ปริมาณ 20 μ L ใส่ลงในหลอดบ่มอาหารแข็ง NA ที่มีเชื้อทดสอบแต่ละชนิดอยู่ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 28 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

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

4. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 3 ซ้ำ และใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นตัวควบคุม (control) แทนการใช้แบคทีเรียกรดแลกติก

ตรวจสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกติกในภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร

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

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

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

3. ทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในภาวะที่มีเอนไซม์เพปซินและน้ำดี

3.1 นำเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกที่เตรียมไว้มากระจายในหลอดสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 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 นำหลอดแบคทีเรียกรดแลกติกไปบ่มที่อุณหภูมิ 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

จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียกรดแลกติก *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ AUB1 LBB1 ATB1 และ SRB1 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากที่ผลิตใน 4 จังหวัดภาคกลางของประเทศไทย คือ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

ศรีอยุธยา ลพบุรี อ่างทอง และจังหวัดสระบุรี ตามลำดับ ในภาวะความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิต่างกัน รวมทั้งตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ภาวะเปลี่ยนแปลงกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ได้ผลการวิจัยดังนี้

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (เชื้อทดสอบ) ได้แก่ *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Shigella boydii* *Shigella flexneri* *Shigella sonnei* *Salmonella typhi* โดยแบคทีเรียกรดแลกติก *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ ATB1 BB1 AUB1 และ SRB1 ใช้วิธี well test ในอาหาร NA ที่ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 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)							
	<i>P. pentosaceus</i> ATB1		<i>P. pentosaceus</i> LBB1		<i>P. pentosaceus</i> AUB1		<i>P. pentosaceus</i> SRB1	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
<i>S. boydii</i>	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
<i>S. flexneri</i>	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
<i>S. sonnei</i>	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
<i>S. typhi</i>	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
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	18.00 ^a ±1.00	-
<i>E. coli</i>	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

จากผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติก 4 สายพันธุ์ดังในตาราง 1 พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติก *P. pentosaceus* SRB1 ที่เพาะเลี้ยงในภาวะค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารได้จำนวนชนิดมากที่สุด คือ 6 ชนิด ได้แก่ *S. boydii* *S. flexneri* *S. sonnei* *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 ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบดีกว่าที่ค่าความ

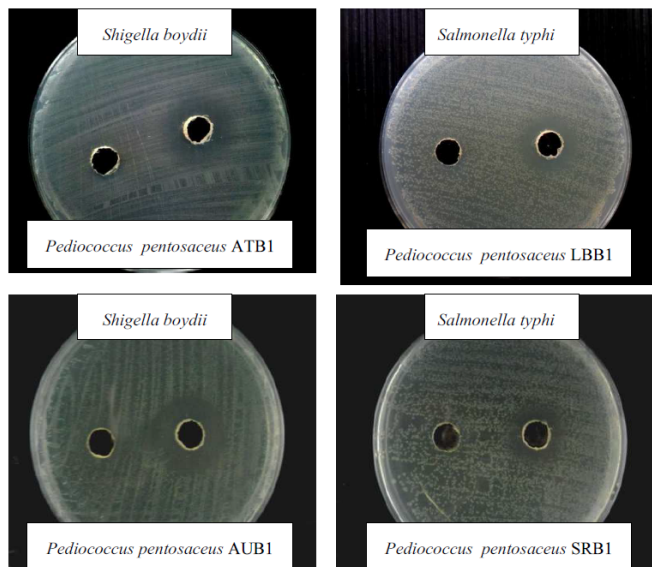
เป็นกรด-เบส 7.0 โดยสังเกตจากจำนวนและขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น โดยที่ภาวะความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 9.0 ไม่พบวงใสในทุกตัวอย่างของแบคทีเรียทดสอบ

จากผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลกติก (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)							
	<i>P. pentosaceus</i> ATB1		<i>P. pentosaceus</i> LBB1		<i>P. pentosaceus</i> AUB1		<i>P. pentosaceus</i> SRB1	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
<i>S. boydii</i>	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
<i>S. flexneri</i>	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
<i>S. sonnei</i>	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
<i>S. typhi</i>	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
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	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) ตามตัวอักษร a, b, c... ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ (-) ไม่พบวงใสของการยับยั้ง



ภาพที่ 1 วงใสจากฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติก *P. pentosaceus* ATB1 LBB1 AUB1 และ SRB1 ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร *S. boydii* และ *S. typhi* (ด้านขวา) ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.0 และอุณหภูมิ 37°C เปรียบเทียบกับภาวะควบคุม (ด้านซ้าย)

จากผลการตรวจวัดวงใสที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อทดสอบ (ตาราง 3 และภาพที่ 1) พบว่า สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติก *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* นอกจากนี้ภาวะค่าความเป็นกรด-เบส 7.0

พบว่า *P. pentosaceus* SRB1 สามารถยับยั้งเชื้อได้มากที่สุด คือ *S. boydii* *S. flexneri* *S. sonnei* *S. typhi* และ *E. coli* ยกเว้น *S. aureus* ซึ่งในภาพรวมที่ค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบดีกว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 โดยสังเกตจากขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นและที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 9.0 นั้นไม่พบวงใสในทุกตัวอย่างของเชื้อทดสอบ

จากตาราง 4 สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติก *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. typhi* และที่ภาวะค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 พบว่า *P. pentosaceus* SRB1 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากที่สุด คือ *S. boydii* *S. flexneri* *S. sonnei* และ *E. coli* โดยในภาพรวมที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5.0 ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบมากกว่าที่ค่ากรด-เบส เท่ากับ 7.0 ทั้งในด้านจำนวนและฤทธิ์การยับยั้ง โดยสังเกตขนาดวงใสที่ปรากฏ และที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 9.0 ไม่พบวงใสในทุกตัวอย่างของเชื้อทดสอบ

การทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติกในสภาวะเลียนแบบระบบทางเดินอาหาร

ความสามารถในการทนกรดและเอนไซม์เพปซิน

จากการทดลองนำสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากลูกแบ่งข้าวหมากที่ทำในจังหวัดอ่างทอง ลพบุรี พระนครศรีอยุธยา และสระบุรี ได้แก่ *P. Pentosaceus* ATB1

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

ชนิดของแบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)							
	<i>P. pentosaceus</i> ATB1		<i>P. pentosaceus</i> LBB1		<i>P. pentosaceus</i> AUB1		<i>P. pentosaceus</i> SRB1	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
<i>S. boydii</i>	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
<i>S. flexneri</i>	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
<i>S. sonnei</i>	-	-	-	-	-	-	-	11.33 ^a ±0.57
<i>S. typhi</i>	-	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
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	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 ($\bar{X} \pm SD$) 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)							
	<i>P. pentosaceus</i> ATB1		<i>P. pentosaceus</i> LBB1		<i>P. pentosaceus</i> AUB1		<i>P. pentosaceus</i> SRB1	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
<i>S. boydii</i>	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
<i>S. flexneri</i>	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
<i>S. sonnei</i>	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
<i>S. typhi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	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	-
<i>E. coli</i>	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 ($\bar{X} \pm SD$) 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 แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 4 ชนิดไม่สามารถทนต่อสภาวะนี้ได้

ความสามารถในการทนเกลือห่าดี

จากการทดลองนำสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากที่ทำในจังหวัดอ่างทอง ลพบุรี พระนครศรีอยุธยา และสระบุรี ได้แก่ *P. pentosaceus* ATB1 LBB1 AUB1 และ SRB1 มาทดสอบ มีความสามารถในการทนเกลือห่าดีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 ที่สภาวะค่าความเป็นกรด-เบส 8.0 ซึ่งเป็นสภาวะเลียนแบบระบบลำไส้เล็ก พบว่า สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่สามารถทนต่อสภาวะนี้ได้

สรุปผลวิจัย

จากการศึกษาผลประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรีย

กรดแลกติก *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

การวิจัยในครั้งนี้ได้ทดสอบสมบัติโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกติก คือ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ ATB1 LBB1 AUB1 และ SRB1 คัดแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากในประเทศไทย (อรุณ ชามุขชัยชาวีวัฒน์ 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 โดยสามารถทนความเป็นกรดได้ทั้ง 5.0 และอุณหภูมิสูงถึง 40°C และยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้บางชนิด ดังนั้น *P. pentosaceus* จึงมีโอกาที่จะเจริญในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ได้หลายชนิด (Duangjitcharoen et al., 2009) อย่างไรก็ตามที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 9.0 พบว่า *P. pentosaceus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ (ไม่ได้แสดงผลไว้ในที่นี้) นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียแลกติก *P. pentosaceus* ที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้อาจมาจากความสามารถในการสร้างกรดแลกติกและสร้างแบคทีเรียโอซิน (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) แบคทีเรียกรดแลกติก *P. pentosaceus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้มากในลูกแป้งข้าวหมากทั่วไป ซึ่งอาจพบได้มากถึง 10^4 - 10^7 เซลล์ต่อกรัม (นภา โล่ห์ทอง, 2537) ดังนั้นการรับประทานข้าวหมากจึงมีโอกาสได้รับแบคทีเรียแลกติก *P. pentosaceus* เข้าสู่ร่างกาย เชื่อว่าจึงมีส่วนสำคัญต่อประโยชน์ของข้าวหมากใน

ด้านเป็นอาหารโปรไบโอติกที่ส่งเสริมสุขภาพ อย่างไรก็ตามจากการตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ *P. pentosaceus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ในภาวะเลียนแบบระบบทางเดินอาหารโดยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์โดยตรงในอาหารเหลวผสมเอนไซม์เพปซินหรือน้ำดี พบว่า เชื้อไม่สามารถเจริญได้ แต่หากว่า *P. pentosaceus* อยู่ในข้าวหมาก การรอดชีวิตของเชื้อนี้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์อาจพบได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากข้าวหมากจะช่วยในการปกป้องเซลล์แบคทีเรียไม่ให้สัมผัสกับน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารโดยตรง และถึงแม้ว่าเซลล์ *P. pentosaceus* จะตายเมื่ออยู่ในระบบทางเดินอาหารก็ตาม แต่จากการวิจัยหลายแหล่งพบว่า เซลล์ตายของแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถกระตุ้นและปรับสมดุลของภูมิคุ้มกันร่างกายได้ (Sashihara et al., 2006) ป้องกันสารก่อมะเร็ง และกระตุ้นการสร้างอินเทอร์เฟอรอน (interferon) (Maeda et al., 2009; Murosaki et al., 1998) รวมทั้งสามารถลดระดับคอเลสเตอรอล (cholesterol) ในเลือด (Sirilun et al., 2010) ปัจจุบันจึงมีแนวคิดผลิตโปรไบโอติกในรูปแบบจุลินทรีย์เซลล์ตายเป็นการค้า (ไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2554) นอกจากนี้ในอนาคตอาจนำ *P. pentosaceus* AUB1 ATB1 SRB1 และ LBB1 มาศึกษาความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะแบคทีเรียโอซินเพื่อใช้ประโยชน์เป็นสารต้านอนุมูลอาหารแทนสารเคมีกันบูตได้อีกทางหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ในปี พ.ศ. 2555

เอกสารอ้างอิง

- ไชยวัฒน์ ไชยสุต. (2554). โปรไบโอติก: จุลินทรีย์เพื่อชีวิต. จังหวัดเชียงใหม่: นวัตกรรมสุขภาพ.
- นภา โล่ห์ทอง. (2537). กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพมหานคร: ฟันนี้ พับบลิชซิ่ง.
- วีระสิทธิ์ กัลยาภฤต และวรศักดิ์ ช่างภา. (2553). อิทธิพลของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อจุลินทรีย์ในลูกแป้ง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, หน้า 211-217. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรุณ ชามุขชัยชาวีวัฒน์ วันทนา สว่างอารมณ์ สุวินัย เกิดทับทิม และอนัตยา ผาสุข. (2555). วิทยาศาสตร์บูรณาการกับภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อสุขภาพและชุมชนในการ

- ศึกษาด้านประสิทธิภาพของสารสกัดข้าวหมาก:
อาหารโพรไบโอติกต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค
ทางเดินอาหาร. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้าน
สมเด็จเจ้าพระยา.
- Cleveland, J., Montville, 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 Biochimica 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.
- Holzappel, 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 indigenous 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 Luxanil, P. (2010). Characterization of non human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property. **African Journal of Microbiology Research** 4: 994–1000.