คุณสมบัติด้านโปรไบโอติกของแบคทีเรียที่แยกจากข้าวหมาก

Probiotic Properties of Bacteria Isolated from Khaomak

ธนิฏฐา เที่ยงแท้[1,*],เจริญ เจริยชัย[2],สาธิรัตน์ รัตนวงศ์ปาล[2],อรวัลภ์ อุปถัมภานนท์[1] และปาลิดา ตั้งอนุรัตน์[2]

[1] คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
39 หมู่ 1 ถนนรังสิต-นครนายก ตำบลคลองหก อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110
[2]คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
พหลโยธิน 87 ตำบลประชาธิปัตย์ อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12130
*E-mail : pix-het2@hotmail.com, โทรศัพท์ 085-083-6600

บทคัดย่อ

ข้าวหมากเป็นอาหารหมักของไทยที่ผลิตโดยนำข้าวเหนียวนึ่งมาผสมกับลูกแป้งซึ่งมีจุลินทรีย์ได้แก่ *Rhizopus* และ *Amylomyces* ทำหน้าที่เปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลทำให้เกิดรสหวานในผลิตภัณฑ์ แม้ว่าราในลูกแป้งจะเป็นจุลินทรีย์หลักที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้าวหมากแต่ยังพบว่ามีแบคทีเรีย กรดแลคติคสามารถเจริญได้ในผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียในข้าวหมาก ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาคุณสมบัติด้านโปรไบโอติกของแบคทีเรีย *Pediococcus pentosaceus* จำนวน 8 สายพันธุ์ที่แยกได้จากข้าวหมาก เมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตาเลสพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ P1 – P4 เป็นคอคไคและคะตาเลสเนกาทีฟ ส่วน R2 เป็นคอคคัส และคะตาเลสโพซิทีฟ สายพันธุ์ R3 – R5 เป็นคอคไคและคะตาเลสเนกาทีฟ แบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 3.0 แต่ไม่เจริญที่ pH 2.5 ยกเว้น R2 แบคทีเรียทุกสายพันธุ์รอดชีวิตหลังจาก 60 นาทีในการบ่มเพาะในสภาวะกระเพาะลำไส้จำลองที่ pH 3.0 – 7.0 แต่ไม่รอดชีวิตที่ pH 2.0 แต่หลังจากบ่ม 120 นาทีทุกสายพันธุ์รอดชีวิตที่ pH 4.0 – 7.0 แต่ไม่รอดที่ pH 2.0 และ 3.0 นอกจากนั้นทุกสายพันธุ์ยังทนต่อเอธานอลที่ระดับความเข้มข้นถึง 4 % เป็นเวลา 2 วัน ผลการวิจัยบ่งชี้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติคที่พบในข้าวหมากสามารถเจริญในระบบทางเดินอาหารและมีผลต่อกิจกรรมโปรไบโอติคได้

คำหลัก: ข้าวหมาก แบคทีเรีย โปรไบโอติก

Abstract

Khaomak is a Thai fermented food made by mixing cooked sticky rice with lukpang, a starter containing mold in the genera Rhizopus and Amylomyces which hydrolyze starch into sugar, giving the product a sweet taste. Although molds are responsible for the sweet character of the product, it has

been known that lactic acid bacteria can grow during production of khaomak. However, information regarding probiotic properties of bacteria in khaomak is still lacking. In this study, probiotic properties of 8 strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from khaomak were investigated. It was found that strains P1 – P4 were catalase negative cocci while R2 was catalase positive cocci. Strains R3 – R5 were catalase negative cocci. All strains were able to grow in media at pH 3.0 but not at pH 2.5 except strain R2. All strains survived after 60 min incubation in simulated gastrointestinal condition at pH 3.0 – 7.0 but not at pH 2.0. But after 120 min incubation, all strains survived at pH 4.0 – 7.0 but not at pH. 2.0 and 3.0. Moreover, all strains could tolerate up to 4 % ethanol concentrations for 2 days. The results indicated that lactic acid bacteria found in khaomak could grow in gastrointestinal track and contribute to probiotic activities.

Keywords: Khaomak Bacteria Probiotic

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวหมากเป็นอาหารพื้นบ้านประเภทอาหารหวานของไทยที่มีมาแต่โบราณ โดยผลิตจากข้าวเหนียวสีขาวธรรมดาและข้าวเหนียวดำ ผ่านกรรมวิธีการหมัก โดยการนำข้าวเหนียวที่ผ่านการนึ่งไปคลุกกับลูกแป้งแล้วนำไปหมัก ระยะเวลา 2–3 วัน จึงสามารถนำมารับประทานได้ ในข้าวหมากพบจุลินทรีย์ประเภท รา ทำหน้าที่ในการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาล ยีสต์ เปลี่ยนน้ำตาลในบางส่วนให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ และแบคทีเรีย ในระหว่างกระบวนการหมักข้าวหมากจะมีแบคทีเรียกรดแลคติคสร้างกรดที่ทำให้ข้าวหมากมีรสเปรี้ยวและมีค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำลง จนสามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานานกว่าข้าวหมากที่ไม่ได้ผ่านการหมัก [1]

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็กที่ทำให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ สร้างประโยชน์ต่อร่างกาย โดยช่วยปรับให้เกิดสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ภายในลำไส้ บทบาทหลักของโปรไบโอติกต่อสุขภาพไม่ได้เป็นการรักษา แต่เน้นแนวทางการป้องกันโดยเป็นการป้องกันปัญหาสุขภาพต่างๆที่อาจเกิดขึ้นได้โดยการช่วยรักษาสมดุลของระบบทางเดินอาหาร มนุษย์เรามีการนำโปรไบโอติกมาใช้มากกว่า 100 ปี จนถึงปัจจุบัน มีการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์ที่ดีเพื่อนำมาใช้ในอาหารหรือเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ หากมีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นแหล่งของจุลินทรีย์โปรไบโอติกในข้าวหมาก อาจสามารถพัฒนาการตลาดของข้าวหมากให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายมากยิ่งขึ้น [2],[3]

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อแยกและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคจากข้าวหมากที่มีจำหน่ายทั่วไป
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้จากข้าวหมาก

3. ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค ที่มีอยู่ในข้าวหมากที่จำหน่ายในร้านสะดวกซื้อ

4. วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้คือ ข้าวหมากจากร้านสะดวกซื้อจำนวน 2 ยี่ห้อ เพื่อนำไปทดสอบ โดยมีวิธีการดังนี้

4.1 การแยกและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคจากข้าวหมากที่มีจำหน่ายทั่วไป

นำตัวอย่างข้าวหมาก 10 กรัม ไปตีผสมกับสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 90 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง Stomacher แล้วนำไปเจือจางต่อตามลำดับ (Serial dilution) ในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ จากนั้นแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคโดยการเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อ (pour plate)ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar ที่ประกอบด้วย 0.004% bromocresol purple ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการบ่ม 24 – 48 ชั่วโมง เมื่อบ่มจนเกิดโคโลนีขึ้น ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS จำนวนจานละ 10 โคโลนี จากจานเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดมาเขี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเกิดโคโลนีเดี่ยวแล้วทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้ไปย้อมสีแกรม ดูรูปร่าง และการสร้างเอนไซม์คะตาเลส และระบุผลด้วยวิธี 16s rDNA saguenay คัดเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวกมาเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS 25% ของกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติต่อไป

4.2 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติคที่ได้จากข้าวหมาก

นำเชื้อทั้งหมดที่ผ่านการแยกมาแล้วข้างต้นมาทดสอบคุณสมบัติ การเจริญในสภาวะจำลองที่เป็นกรด การทนต่อเกลือน้ำดี การทดสอบกิจกรรมการต้านจุลชีพ และการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ด้วยวิธีการ ทดสอบความสามารถของการเจริญภายใต้สภาวะจำลองที่เป็นกรด น้ำดีสังเคราะห์ และน้ำดี Ox – bile ทดสอบโดยการถ่ายเชื้อที่แยกมาได้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงไปในอาหารเหลว ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อร้อยละ 2 ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับ pH ค่าต่างๆที่ลำดับ 2 2.5 3 และ 3.5 โดยการใช้กรดไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 1 โมลาร์ รวมถึงอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำดีสังเคราะห์ (Sigma,New Zealand) ความเข้มข้น 0 0.3 0.6 และ 1% (w/v) และ Ox–bile ความเข้มข้น 0 3 6 9 และ 12% ตามลำดับ (ปรับ pH 8) วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดจากการบ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวิธีการ standard plate count [4]

4.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ทดสอบโดยถ่ายเชื้อที่แยกได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ทำการป้ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะลงบนอาหารที่มี

เชื้ออยู่ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจผล โดยสังเกตบริเวณใสบันทึกผลเป็น(Clear Zone)[5]

5. ผลการวิจัย

5.1 ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคจากข้าวหมากที่มีจำหน่ายทั่วไป

ทำการทดสอบการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคจากข้าวหมากที่นำมาทำการทดลองจากห้องปฏิบัติการวิจัย ได้ผลของโคโลนีทั้ง 8 ไอโซเลท คือ P1 – P4 และ R2 – R5 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รูปร่างเซลล์ การติดสีย้อมแกรม ลักษณะสี และการสร้างเอนไซม์คะตาเลส

รหัส	รูปร่าง	การติดสีแกรม +/–	สี	การสร้างเอนไซม์คะตาเลส
P1	กลม	+	ขาวขุ่น	–
P2	กลม	+	ขาวอมเหลือง	–
P3	กลม	+	ขาวขุ่น	–
P4	รี	+	ขาวอมเหลือง	–
R2	กลม	+	ขาวขุ่น	+
R3	รี	+	ขาวขุ่น	–
R4	กลม	+	ขาวขุ่น	–
R5	กลม	+	ขาวอมเหลือง	–

จากตารางที่ 1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดจากข้าวหมาก P1 – P3 R2 R4 และ R5 มีรูปร่างกลม ส่วน P4 และ R3 มีรูปร่างรี ผลการย้อมสีแกรมพบว่า P1 – P4 และ R2 – R5 เกิดการติดสีแกรมบวกทั้งหมด ลักษณะของสี P1 P3 และ R2 – R4 มีสีขาวขุ่น ส่วน P2 P4 และ R5 มีสีขาวอมเหลือง ผลการสร้างเอนไซม์คะตาเลสพบว่า R2 เป็นคอคคัสและคะตาเลสโพซิทีฟ สายพันธุ์ P1 – P4 และ R3 – R5 เป็นคอคไคและคะตาเลสเนกาทีฟ เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมด 8 ไอโซเลท ไประบุชนิดด้วยวิธี 16s rDNA Saguenay พบว่าเป็น *Pediococcus pentosaceus* ทั้งหมด

5.2 ผลการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติคที่ได้จากข้าวหมาก

ผลการทดสอบความสามารถของการเจริญภายใต้สภาวะจำลองที่เป็นกรดน้ำดีสังเคราะห์ และน้ำดี Ox – bile ดังแสดงในตารางที่ 2 3 และ 4

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความสามารถของการเจริญภายใต้สภาวะจำลองที่เป็นกรด

รหัสชนิด	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/ml)			
	pH 2	pH 2.5	pH 3	pH 3.5
P1	0	0	$7.62X10^3$	$1.86x10^3$
P2	0	0	$2.96X10^3$	$1.89X10^3$
P3	0	0	$8.91X10^3$	$2.07X10^3$
P4	0	0	$8.41X10^3$	$4.69X10^3$
R2	0	0	$8.66X10^3$	$1.36X10^3$
R3	0	0	$1.02X10^4$	$3.08X10^3$
R4	0	0	$8.76X10^3$	$1.21X10^3$
R5	0	0	$1.02X10^4$	$2.96X10^3$

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความสามารถของการเจริญภายใต้สภาวะจำลองของน้ำดีสังเคราะห์

รหัสชนิด	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/ml)			
	น้ำดีสังเคราะห์ 0%	น้ำดีสังเคราะห์ 0.3%	น้ำดีสังเคราะห์ 0.6%	น้ำดีสังเคราะห์ 1%
P1	$7.69X10^5$	$7.81X10^5$	$6.72X10^5$	$6.20X10^5$
P2	$9.91X10^5$	$9.21X10^5$	$7.71X10^5$	$6.41X10^5$
P3	$1.01X10^6$	$9.79X10^5$	$8.29X10^5$	$6.11X10^5$
P4	$1.22X10^6$	$8.11X10^5$	$8.16X10^5$	$5.42X10^5$
R2	$1.04X10^6$	$1.02X10^6$	$9.21X10^5$	$8.21X10^5$
R3	$7.12X10^5$	$6.00X10^5$	$7.11X10^5$	$5.61X10^5$
R4	$6.17X10^5$	$6.28X10^5$	$5.76X10^5$	$5.57X10^5$
R5	$8.37X10^5$	$7.29X10^5$	$6.67X10^5$	$6.08X10^5$

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความสามารถของการเจริญภายใต้สภาวะจำลองของน้ำดี Ox-bile

รหัสชนิด	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/ml)				
	Ox-bile 0%	Ox-bile 3%	Ox-bile 6%	Ox-bile 9%	Ox-bile 12%
P1	$7.61X10^5$	0	0	0	0
P2	$9.91X10^5$	$2.0x10^1$	0	0	0
P3	$1.01X10^6$	0	0	0	0
P4	$1.22X10^6$	$2.2x10^2$	$1.0x10^2$	$1.1x10^2$	0

R2	$1.04X10^6$	0	0	0	0
R3	$7.12X10^5$	0	0	0	0
R4	$6.17X10^5$	$1.0x10^1$	0	0	0
R5	$8.37X10^5$	0	0	0	0

จากตารางที่ 2 – 4 ผลการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติคที่ได้จากข้าวหมากพบว่า ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด พบว่าทั้ง 8 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ที่ pH 3.0 แต่ไม่เจริญเมื่อ pH ต่ำกว่า 2.5 และทุกตัวแปรเจริญในน้ำดี 0 – 1% และมีเพียง P4 ที่เจริญได้ใน Ox – bile 6 – 12% การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะระบบกระเพาะและลำไส้จำลอง เมื่อ pH 3.0 – 7.0 ทุกตัวแปรสามารถรอดชีวิต เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที แต่ไม่รอดชีวิตที่ pH 2.0 และ pH 3.0 และแบคทีเรียทุกตัวแปรสามารถทนต่อเอทานอลได้ถึง 4% เป็นเวลา 2 วัน

5.3 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติคโดยวิธีวางแผ่นสารปฏิชีวนะ (หน่วย : มิลลิเมตร)

ไอโซเลท	ชนิดแผ่นยาทดสอบ												
	PB	C	K	DA	E	TE	F	NOR	CIP	P	AMP	KZ	VA
P1	–	–	–	–	–	–	40	–	–	40	30	40	–
P2	–	50	–	50	50	40	30	–	–	30	20	20	–
P3	–	50	–	50	50	30	40	–	–	–	30	30	–
P4	–	50	–	50	50	30	–	–	–	–	40	40	–
R2	–	40	–	50	40	30	40	–	–	40	30	40	–
R3	–	40	–	50	40	30	40	–	–	40	30	40	–
R4	–	40	–	50	30	30	40	–	–	30	30	30	–
R5	–	40	–	40	30	20	40	–	–	40	60	40	–

ชนิดและปริมาณของยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ Penicilin G(P;10µg) Ampicillin (AMP;10µg) Cephazolin(KZ;30µg) Vancomycin(VA;30µg) Kanamycin (K;30µg) Tetrecycline (TE;30µg) Chloramphenical(C;30µg) Erythromycin(E;15µg) Clindamycin (DA;2µg) Norfloxacin (NOR;10µg) Ciprofloxacin (CIP;5µg) Polymycin B(PB;300µg) และ Nitrofuration(F;300µg)

หมายเหตุ : บริเวณการยับยั้ง; + หมายถึง ยับยั้ง / –หมายถึง ไม่ยับยั้ง / 10–20 หมายถึง ยับยั้งต่ำ / 30 หมายถึง ยับยั้งปานกลาง / 40 หมายถึง ยับยั้งสูง และ >50 หมายถึง ยับยั้งสูงมาก

จากตารางที่ 5 ผลทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยการวางแผ่นยาปฏิชีวนะทั้ง 13 ชนิด ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ทั้ง 8 ไอโซเลท สามารถต้านทานต่อยาฏิชีวนะ 5 ชนิด คือ Vancomycin Kanamycin Norfloxacin Ciprofloxacin และ Polymycin B ซึ่งผลที่ได้นั้นไม่จัดว่าเป็นความต้านทานที่ผิดปกติแต่อย่างใด แต่มีบางไอโซเลทที่มีความสามารถต้านทานต่อยาฏิชีวนะได้มากกว่า 5 ชนิด คือ P3 สามารถต้านทาน Penicilin G และ P4 สามารถต้านทาน Nitrofuration และ Penicilin G และ ไอโซเลท P1 สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้เกือบทุกชนิด

6. สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัย พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวหมากไอโซเลท R2 มีคุณสมบัติที่สอดคล้องกับคุณสมบัติของโปรไบโอติก คือ สามารถผลิตเอนไซม์คะตาเลสเจริญได้ที่ pH 2.5 และมีความทนต่อสภาวะของน้ำดี ผลการวิจัยบ่งชี้ได้ว่าแบคทีเรียที่พบในข้าวหมากสามารถเจริญในระบบทางเดินอาหารและมีผลต่อกิจกรรมโปรไบโอติกได้

7. ข้อเสนอแนะ

1. สามารถนำผลการวิจัยไปต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวหมาก อาทิเช่น การเพิ่มสารอาหารต่างๆลงไปในข้าวหมาก เพื่อให้เป็นที่นิยมและเป็นที่รู้จักมากยิ่งขึ้น

2. สามารถนำไปพัฒนาทางด้านการเก็บรักษา เพื่อคงคุณภาพของจุลินทรีย์ชนิดที่เป็นประโยชน์ที่พบในข้าวหมาก

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ ภายใต้สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

9. เอกสารอ้างอิง

[1] ฉัตรภา หัตถโกศล. (2556). *ข้าวหมากแหล่งจุลินทรีย์โปรไบโอติกของไทย*, [ระบบออนไลน์], แหล่งที่มา http://www.manager.co.th, เข้าดูเมื่อวันที่ 11/06/2559.

[2] สุภัจฉรา นพจินดา. (2557). *โพรไบโอติกกับการส่งเสริมสุขภาพ*, วารสารพยาบาลทหารบก ปีที่ 15 ฉบับที่ 3 กันยายน – ธันวาคม, หน้า 433.

[3] ไชยวัฒน์ ไชยสุต. (2556). *โพรไบโอติก จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ*, กรุงเทพฯ: สำนักการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณะสุข.

[4] Hyronimus,B.,C.L.Marrec,A.H.Sassi and A.Deschamps. (2000).*Acid and bile tolerance of*

sporeforming lactic acid bacteria. Int.JFood Microbiol.

[5] Quinn, P.J.,M.E.Carter,B.K.Markey and G.R. Carter. (1994).*Clinical Veterinary Microbiology*. London WC1W9LB,England.