วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.
KKU Veterinary Journal
ISSN 0858-2297



RESEARCH ARTICLE

The selection of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from the Thai traditional fermented food and animal gastrointestinal tracts

Supakorn Chanapak[1*], Pirat Sornplang[2]

[1]*Graduate Student, Master of science of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand*
[2]*Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand*
[*]***Corresponding author*** *E-mail: supakornch@kkumail.com*

Received 27 April 2021, **Revised** 9 November 2021 **Accepted** 13 December 2021, **Published** 22 January 2022

Abstract

Objective: The objective of the present study was to select lactic acid bacteria (LAB) with probiotic properties and ability to produce exopolysaccharides (EPS) from the animal gastrointestinal tracts and Thai traditional fermented foods. These LAB isolates aimed to use in animal production and fermented food industry.

Materials and Methods: The study samples were selected from five sources: the swine gut, the chicken gut, Nham-moo, Mum-wua, and Pla-som. LAB isolates were selected based on their properties in catalase production, acid and alkali tolerance, bile salt tolerance, antimicrobial activity, antibiotic susceptibility, and EPS production. The EPS production was tested by using phenol-sulphuric method.

Results: LAB isolates were 152 from the swine gut, 161 from the chicken gut, 160 from Nham-moo, 174 from Mum-wua and 158 from Pla-som. The catalase production test showed that 761 isolates were catalase-negative. Of these, 176 isolates survived at pH 2, 4 and 10 for 3 and 6 hours. These 176 isolates also resisted to amoxicillin-clavulanic acid, oxytetracycline, streptomycin, vancomycin and trimethoprim-sulfamethoxazole at 4.54%, 50.57%, 65.34%, 73.86% and 68.18%, respectively. Of 176 isolates, 78 isolates showed strong inhibition to *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhi and *Listeria monocytogenes* at 5.12%, 5.12%, 8.97%, respectively and moderate inhibition to *E. coli* ATCC 25922, S. Typhi and Listeria monocytogenes at 60.25%, 60.25%, 76.92%, respectively. Four selected isolates F3-3, N45-1, C57 and M60-3 showed the highest EPS yield at 3.21, 2.54, 2.36 and 2.11 grams per liter, respectively.

Conclusion: SFour isolates F3-3, N45-1, C57 and M60-3 were selected based on their EPS production for further study in animal production and fermented food industry.

Keywords: Lactic acid bacteria, exopolysaccharides, fermented food

บทความวิจัย

ความชุกและปัจจัยเสี่ยงของเชื้อซัลโมเนลลาในฟาร์มมาตรฐานไก่เนื้อ และโรงเชือดไก่ในเขตภาคกลางของประเทศไทย

ศุภกร ชนะภักดิ์[1*], ไพรัตน์ ศรแผลง[2]

[1]นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002 ประเทศไทย

[2]ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002 ประเทศไทย

**ผู้ประพันธ์บรรณกิจ อีเมล์: supakornch@kkumail.com*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารสัตว์และอาหารหมักพื้นบ้านที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกและผลิตสาร Exopolysaccharides (EPS) เพื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์และอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษามาจาก 5 แหล่ง ได้แก่ ทางเดินอาหารสุกร ทางเดินอาหารไก่ แหนมหมู หม่ำ และปลาส้ม ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกโดยการทดสอบคะตะเลส ทดสอบการทนต่อกรด และด่าง ทดสอบการทนต่อน้ำดี ทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะ ทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค และทดสอบการผลิตสาร EPS ด้วยวิธี phenol sulphuric method

ผลการศึกษา แยกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 152, 161, 160, 174 และ 158 จากทางเดินอาหารสุกร ทางเดินอาหารไก่ แหนมหมู หม่ำ และปลาส้ม ตามลำดับ มี 761 ไอโซเลท ที่ให้ผลเป็นลบต่อการสร้างเอนไซม์คะตะเลส มีความทนต่อกรด และด่าง ที่ pH 2, 4 และ pH 10 เป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง มีจำนวน 176 ไอโซเลท และแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 176 ไอโซเลทพบการต้านยาปฏิชีวนะต่อ amoxicillin clavulanic acid, oxytetracycline, streptomycin, vancomycin และTrimethoprim-sulfamethoxazole คิดเป็นร้อยละ 4.54, 50.57, 65.34, 73.86 และ 68.18 ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 78 ไอโซเลท พบการยับยั้งเชื้อก่อโรค *E. coli* ATCC 25923, *S.* Typhi และ *Listeria monocytogenes* ได้มาก คิดเป็นร้อยละ 5.12, 5.12 และ 8.97 ตามลำดับ แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไอโซเลท F3-3, N45-1, C57, และ M 60-3 มีการผลิตปริมาณน้ำตาล (EPS) มากที่สุด คือ 3.21, 2.54, 2.36 และ 2.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สรุป จากการผลการศึกษาของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกแล้ว 4 ไอโซเลท (F3-3, N45-1, C57, และ M 60-3) ที่มีความสามารถในการผลิต EPS ได้มากที่สุดจากไอโซเลททั้งหมด ซึ่งสามารถนำไปใช้ศึกษาเป็นสารเสริมในอาหารในการเลี้ยงสัตว์ และอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมักต่อไป

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลคติก, เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์, อาหารหมัก

บทนำ

เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS) คือ พอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในขณะมีการเจริญและขับออกมานอกเซลล์ ในการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์โดยกระบวนการหมักจะได้เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่มีความหลากหลายและมีสมบัติเฉพาะตัวมากกว่าพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากพืช การผลิตพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อแบคทีเรียมีข้อดี คือ สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ได้หลากหลายชนิด และสามารถควบคุมคุณภาพของพอลิแซคคาไรด์ได้ โดยควบคุมสภาวะในกระบวนการหมัก (Linton et al., 1991) การผลิตพอลิแซคคาไรด์จากพืชมีข้อจำกัด คือ พืชชนิดหนึ่งๆสามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์หลายชนิดพร้อมๆ กัน ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนการแยกพอลิแซคคาไรด์ที่ต้องการออกมาซึ่งทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงขึ้น (Whitsler et al., 1998) และโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากพืชและสาหร่ายในปัจจุบัน EPS ที่มีการผลิตในทางการค้ามีหลายชนิด เช่น เด็กซแทรน แซนแทน เจลแลน ส่วนที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น แซนแทนกัม ที่ได้จาก *Xanthomonas campestris* และเจลแลนกัมที่ได้จาก *Pseudomonas elodea* นั้นยังมีข้อจำกัดในการผลิต เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ ให้เกิดโรคในพืชและเมื่อนำมาใช้ในอาหารต้องมีการระบุไว้ในฉลากอย่างชัดเจน จากข้อจำกัดดังกล่าวทำให้ผู้ผลิต EPS เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักหันมาให้ความสนใจแบคทีเรียแลคติกเพื่อช่วยปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัส เพิ่มความหนืด ความคงตัว และความรู้สึกภายในปากของผลิตภัณฑ์ให้ดียิ่งขึ้นใน ระหว่างการหมักหรือการเก็บรักษา (Torino et al., 2015) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความปลอดภัย เป็นที่ยอมรับให้ใช้ในอาหาร (Generally Recognized as Safe; GRAS) และสามารถผลิต EPS โดยสารที่ผลิตขึ้นถือว่าเป็นสารจากธรรมชาติซึ่งจัดได้ว่าเป็นสารที่ไม่เป็นพิษและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ดังนั้นการทำวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกและมีคุณสมบัติที่ดีในการผลิตสาร EPS ซึ่งอาจเป็นคุณสมบัติในการเพิ่มเนื้อสัมผัสแก่ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ทำให้เพิ่มความพึงพอใจแก่ผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าเพิ่มให้แก่ผลิตภัณฑ์อาหารหมักได้

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

แบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 5 กลุ่มได้แก่ เก็บตัวอย่างจากอุจจาระสุกรและไก่ด้วยวิธี swab อุจจาระ กลุ่มตัวอย่างละ 79 ตัวอย่าง และจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ได้แก่ แหนมหมู หม่ำ ปลาส้ม กลุ่มตัวอย่างละ 79 ตัวอย่าง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดังกล่าวใช้ expected prevalence ที่ 95.0% confidence interval และใช้ 5.0% เป็น accepted error

การคัดแยกแบคทีเรียแลคติก

คัดเลือกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารสัตว์ได้แก่ สุกรและไก่จาก swab อุจจาระใส่หลอดทดลองที่มี 0.1% peptone water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ได้แก่ แหนมหมู หม่ำ ปลาส้ม ในเขตจังหวัดขอนแก่น โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักมาตัดแบ่งและชั่งตัวอย่าง 10 กรัม เติมร้อยละ 0.1 peptone water ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนที่เป็นสารละลายมาทำ serial dilution โดยเจือจางสารละลายตัวอย่างที่ต้องการในช่วงความเข้มข้นที่ 10^{1} – 10^{6} โดยดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS, Difco™) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ปริมาณร้อยละ 0.3 (W/V) ด้วยวิธี pour plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร โดยสังเกตโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) มีเมือกเหนียวหนืดและเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (skin-milk ที่มีส่วนผสมของ glycerol ร้อยละ 20) ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดสอบต่อไป

การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลคติกลงบนกระจกสไลด์ที่มีสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 % (V/V) หากเกิดฟองก๊าซขึ้นแสดงว่าการทดสอบให้ผลเป็นบวก (catalase positive) ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น ให้ผลเป็นลบ

การทดสอบการทนต่อกรดและด่าง

การทดสอบความทนทานต่อสภาพความเป็นกรดและด่าง ดัดแปลงจากวิธีของ Jin et al (1996) นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาณ 3 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ต้องการทดสอบมาทำการปรับความขุ่นของเชื้อด้วย normal saline solution (NSS) ร้อยละ 0.85 จนมีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ($1.5x10^{8}$ CFU/ml) นำมาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS broth ที่ปรับค่ากรด-ด่าง เป็น 2 เป็น 4 และ 10 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริค (HCl) ความเข้มข้น 2 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 2 นอร์มอล บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นเชื้อแบคทีเรียที่

บ่มในสภาวะเดียวกันใส่ใน MRS broth ที่ไม่มีส่วนผสมของสาร ละลายไฮโดรคลอริค และโซเดียมไฮดรอกไซด์จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเชื้อที่ผ่านการบ่มในความเข้มข้นที่มี pH แตกต่างกันปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทำการเพาะเชื้อด้วยวิธี pour plate บ่มที่ 37 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การทดสอบการทนต่อน้ำดี

การทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียแลคติกดัดแปลงตามวิธีการ ของ Gilliland et al. (1984) นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาณ 3 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงจากนั้นนำสารละลายเชื้อต้องการทดสอบมาทำการปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารละลายน้ำเกลือร้อยละ 0.85 จนมีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland นำมาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Difco™) ที่เติม fresh ox-bile ความเข้มข้นร้อยละ 4 และ 7 (V/V) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นเชื้อแบคทีเรียที่บ่มในสภาวะเดียวกันใน MRS broth ที่ไม่มีส่วนผสม ของ fresh ox-bile จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเชื้อจากการบ่มในน้ำดี ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทำการเพาะเชื้อด้วยวิธี pour plate บ่มที่ 37 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การทดสอบการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

การทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้วิธี ager diffusion method ดัดแปลงจาก (Yolmeh et al., 2017) โดยเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB, Difco™) ทำการปรับความขุ่นของเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland (10 6 cfu./ml.) ใช้สารละลายเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร หยดลงบน Nutrient agar (NB, Difo™) ใช้ไม้พันสำลีสเตอไรด์ swab ให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ รอให้แห้ง เจาะหลุม เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกผ่านการคัดเลือกมาปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงใน MRS Broth ที่มีปริมาณ 3 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นหยดเชื้อปริมาณ 40 ไมโครลิตร ลงในหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อก่อโรคที่ต้องการทดสอบอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลการทดลอง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่มีวงรอบใส

การทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ใช้วิธี disc diffusion method (Sornplang et al., 2016) นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกปริมาณ 100 ไมโครลิตร ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth ที่มีปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 อาศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงมาทำการปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารละลายน้ำเกลือร้อยละ 0.85 จนมีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard มา swab บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ LSM แล้วปล่อยให้แห้งจากนั้นวาง antibiotic discs ได้แก่ oxytetracycline ขนาด30 ไมโครกรัม, vancomycin ขนาด 30 ไมโครกรัม, streptomycin ขนาด 10 ไมโครกรัม, Amoxicillin-clavulanic acid ขนาด 30 ไมโครกรัม และ trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) ไมโครกรัม ลงบนผิวหน้าอาหารแล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น (Nuphet et al., 2004)

การตรวจสอบการสร้างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกผ่านการคัดเลือกมาปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตรบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่า pH เป็น 7.5 ทำการปรับความขุ่นของเชื้อด้วย NSS ร้อยละ 0.85 จนมีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นนำสารละลายเชื้อปริมาณ 30 ไมโครลิตร หยดลงบน sterile disc ขนาด 6 มิลลิเมตร นำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ESM (Exopolysaccharides Selection Medium) ซึ่งประกอบด้วย skim milk 90 กรัม, yeast extract 3.5 กรัม, peptone 3.5 กรัมและ sucrose ร้อยละ 4 ต่อปริมาณ 1 ลิตร (Bukola et al., 2008) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 7 วัน ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใสรอบ disc รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่เกิดขึ้นรอบ disc ลงในเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ดูการตกตะกอนของเชื้อ หากมีการตกตะกอนของโคโลนีแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบมี การสร้าง EPS

การสกัดหยาบเพื่อหาปริมาณExopolysaccharides (EPS)

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผ่านการทดสอบทุกขั้นตอน ทำการหาปริมาณการสร้าง EPS ด้วยการสกัดหยาบ โดยนำเชื้อปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน MRS broth ปริมาณ 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปรับความขุ่นของเชื้อด้วย NSS ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จนมีความขุ่นเท่ากับ McFarland ถ่ายเชื้อปริมาณ 100 ไมโคลิตรใส่ลงใน MRS broth ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน MRS broth ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12

ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาทีนำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอลอัตราส่วน 1:2 ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นำตะกอนทั้งหมดมาทำให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-sulphuric method (Dubois el al., 1951)

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) โดยใช้ฐานนิยม (mode) และร้อยละ

ผลการศึกษา

จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างทางเดินอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารหมัก สามารถแยกแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ได้ทั้งหมด 805 ไอโซเลท เพื่อทำการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกด้วยการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสจำนวน 761 ไอโซเลท (Table 1)

ผลการทดสอบการทนกรด-ด่างและเกลือน้ำดี

จากการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่ช่วง pH ต่างๆ ที่สามารถมีชีวิตรอดได้มากกว่าร้อยละ 80 พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่สามารถทนต่อระดับ pH 2 ที่ระยะเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง มีจำนวน 235 และ 176 ไอโซเลท ที่สภาวะค่า pH 4 มีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 341 และ 321 ไอโซเลท และที่สภาวะ pH 10 แบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 185 และ 179 ไอโซเลท เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีอัตราการเจริญเติบโตมากกว่าร้อยละ 80 ที่ pH 2, 4 และ 10 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ามี 176 ไอโซเลท (Table 2) คิดเป็นร้อยละ 23.12 จากแบคทีเรียแลคติกที่นำมาทดสอบการทนต่อกรดและด่างคิดเป็นร้อยละ 23.12 จากแบคทีเรียแลคติกที่นำมาทดสอบการทนต่อกรดและด่างทั้งหมด และผลการทดสอบการทนต่อน้ำดีพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่สามารถทนต่อระดับความเข้มข้นของน้ำดีร้อยละ 4 ที่ระยะเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง สามารถมีชีวิตรอดได้มากกว่าร้อยละ 80 มีจำนวน 185 และ 182 ไอโซเลท ของกลุ่มควบคุม และความเข้มข้นของน้ำดีร้อยละ 7 ที่ระยะเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง มีจำนวน 178 และ 176 ไอโซเลท (Table 3) โดยคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบน้ำดี ความเข้มข้นร้อยละ 7 และสามารถมีชีวิตรอดได้มากกว่าร้อยละ 80 ในการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จำนวน 176 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 95.13 ของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดที่นำมาทดสอบ

การต้านยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยใช้วิธี disc diffusion ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบได้แก่ AMC, OT, STR, VAN และ SXT การวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ค่ามาตรฐานของบริเวณการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกต่อยาปฏิชีวนะ ดังตารางที่ 1 พบว่ามี 78 ไอโซเลท ที่ผ่านการคัดเลือก (Table 4) และเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 176 ไอโซเลทมาทดสอบการต้านต่อยาปฏิชีวนะ พบว่ามีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) ร้อยละ 68.18, vancomycin (VAN)ร้อยละ 73.86, streptomycin (STR) ร้อยละ 65.34 และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ amoxicillin clavulanic acid (AMC) ร้อยละ 95.46 และ oxytetracycline (OT) ร้อยละ 49.43

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ จำนวน 78 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* ATCC 25923, *L. monocytogenes* และ *S.* Typhi โดยใช้วิธี agar well diffusion พิจารณาวงรอบ

Table 1. Survival of LABs at different pH level conditiona

Hours	Number of LAB isolate (%)		
	pH		
	2	4	10
3	235 (30.88)	341 (44.80)	185 (24.31)
6	176 (23.12)	321 (42.18)	179 (23.52)

[a] pH tolerance was based on survival rate ≥ 80%.

Table 2. Bile salt tolerant test of selected LAB isolates[a]

%Bile salt	Number of LAB isolates	
	Hours	
	3	6
4	185	182
7	178	176

[a] Bile tolerance was based on survival rate $\geq$ 80%.

Table 3. Antibiotic resistance of LAB isolates from the animal gut and Thai fermented foods

Antibiotics	Number of antibiotic resistance isolate (%)		
	R	I	S
AMC	8 (4.54)	-	168 (95.46)
OT	59 (33.53)	30 (17.04)	87 (49.43)
VAN	130 (73.86)	3 (1.71)	43 (24.43)
SXT	120 (68.18)	3 (1.71)	53 (30.11)
STR	115 (65.34)	19 (10.79)	42 (23.87)

Amoxicillin clavulanic acid (AMC), Oxytetracycline (OT), Streptomycin (STR), vancomycin (VAN), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Susceptibility expressed as: (R): Resistant, (I):Intermediate, (S): Susceptible ; CLSI, (2016)

Table 4. Inhibition zone[a] of LAB isolates from animal gut and Thai fermented foods

Pathogen growth inhibition	Inhibition (mm)	(-)	(+)	(++)	(+++)
*S.*Typhi	No. of isolates (%)	9 (11.54)	18 (23.07)	47 (60.25)	4 (5.12)
E. coli	No. of isolates (%)	8 (6.24)	19 (24.36)	47 (60.25)	4 (5.12)
L. monocytogenes	No. of isolates (%)	3 (3.85)	8 (10.25)	60 (76.92)	7 (8.97)

[a] (-) 0 mm; (+) : 7-9 mm ; (++) 10-13 mm; (+++) 14-16 mm. (Halder et al., 2017)

ใส (clear zone) ระหว่างแบคทีเรียแลคติกและเชื้อก่อโรคที่นำมาทดสอบ ผลของการยับยั้งที่เกิดขึ้นให้ผลแตกต่างกัน (Table 4) โดยผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *E. coli* ATCC 25923 ได้ปานกลางและมาก จำนวน 47 และ 4 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 60.25 และ 5.12, *S.* Typhi จำนวน 47 และ 4 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 60.25 และ 5.12 ไอโซเลท และ *Listeria monocytogenes* จำนวน 60 และ 7 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 76.92 และ 8.97

เมื่อนำไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบทนกรด และด่าง การทนต่อน้ำดีสด การต้านยาปฏิชีวนะ และการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 55 ไอโซเลทเพื่อทดสอบขั้นตอนต่อไป

แบคทีเรียที่แยกได้ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นทั้งรูปกลม จำนวน 43 ไอโซเลท และรูปท่อนจำนวน 12 ไอโซเลท

การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิต EPS

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ จำนวน 55 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถการการยึดเกาะจากการผลิต EPS ด้วยวิธี agar plate โดยจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผ่านการคัดเลือกหยดลงบน sterile นำเข้าบ่ม โดยคัดเลือกไอโซเลทที่มีการสร้างสารเหนียวหนืดขนาดวงรอบ

ปานกลางถึงมาก ใส่ลงในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ไปทดสอบการตกตะกอนของโคโลนี พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่นำมาทดสอบมีเพียง 27 ไอโซเลท ได้แก่ M60-3, M-38-2, M45-1, M54-1, M50-1, C12, C25, C30, C56, C57, F14-3, F8-4, F8-2, F15-3, F3-3, F27-2, N18-4, N2, N29-3, N45-1, N49-3, N54-2 , N68, P53, P156-6, P28-6, P11-3 ที่มีการตกตะกอนในหลอดทดลอง คิดเป็นร้อยละ 49.09 ของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้งหมด

วัดปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด โดยวิธี phenol-sulfuric method

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ และได้ทำการตกตะกอนด้วยเอทานอล และทำการสกัด EPS ด้วยการสกัดหยาบแล้ว จำนวน 27 ไอโซเลท มาทดสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้ crude EPS เพื่อทำการวัดปริมาณน้ำตาลรวมด้วยวิธี phenol-sulfuric method พบว่าไอโซเลท F3-3, N45-1, C57, C12 และ M60-3 มีการผลิตปริมาณน้ำตาลรวมมากที่สุด คือ 3.21, 2.54, 2.36, 2.11 และ 2.11 กรัมต่อลิตร (Table 5)

วิจารณ์

จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารสัตว์ และผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ จำนวน 805 ไอโซเลท นำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลสซึ่งให้ผลเป็นผล จำนวน 761 ไอโซเลทในกรณีที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคผลจะให้ผลบวก (catalase positive) เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้โปรตีน และกรดนิวคลีอิกของจุลินทรีย์เสียสภาพไป อีกทั้งแบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีการสร้างเอนไซม์ฟลาโวโปรตีน แต่ขาดคะตะเลส แบคทีเรียแลคติกจะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีออกซิเจน (O_2) เท่านั้น ทำให้แบคทีเรียทนต่อสารนี้มากกว่าแบคทีเรียตัวอื่น นอกจากนี้การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของแบคทีเรียแลคติกเพียงเล็กน้อยนี้ทำให้เกิดผลดีต่อขบวนการหมัก เนื่องจากหลังจากกระบวนการหมักดำเนินไปแล้วไม่เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้นอีก ซึ่งการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินไป ทำให้เกิดการยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่เป็นเชื้อเริ่มต้นของการหมักได้ แบคทีเรียที่ให้ผลเอนไซม์คะตะเลสเป็นลบจึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ใช้การทำผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

การทดสอบความสามารถการทนต่อกรดในระดับพีเอช 2 , 4 และพีเอช 10 ซึ่งสามารถรอดชีวิต ซึ่งแบคทีเรียแลคติกมีค่า

Table 5. Exopolysaccharides (EPS) and lactic acid bacteria from animal and Thai fermented food products

Isolates	EPS (g/L)
P156-6	1.75±0.001[a]
P28-6	1.77±0.19
P53	1.93±0.09
P11-3	1.63±0.17
C12	2.11±0.17
C25	1.57±0.09
C30	1.57±0.09
C56	1.14±0.00
C57	2.36±0.17
F14-3	1.87±0.17
F15-3	1.39±0.00
F27-2	1.33±0.09
F3-3	3.21±0.51
F8-2	1.51±0.17
F8-4	1.08±0.09
M38-2	1.75±0.34
M45-1	1.14±0.17
M50-1	2.05±0.09
M54-1	1.99±0.00
M60-3	2.11±0.00
N18-4	1.69±0.26
N2	1.87±0.34
N29-3	1.99±0.17
N45-1	2.54±0.09
N49-3	1.93±0.09
N54-2	1.57±0.09
N68	1.87±0.17

[a]Value = mean±SD in duplicate

กรด-ด่างเหมาะสมอยู่ในช่วง pH 5.58-6.20 แต่จะมีอัตราการเจริญลดลงเมื่อมีค่ากรด-ด่าง ลดลงหรือเพิ่มขึ้น โดยการทดสอบความสามารถการทนต่อกรดในระดับค่ากรด-ด่าง 2 และ 4 และด่างในระดับ 10 ซึ่งเลียนแบบสภาวะภายในช่องปากและกระเพาะอาหารของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งอาหารจะอยู่ในกระเพาะอาหารประมาณ 2 - 4 ชั่วโมง หากแบคทีเรียแลคติกที่นำมาทดสอบไม่สามารถทนต่อความเป็นกรดได้จะตายก่อนถึงลำไส้สัตว์ ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียแลคติกเพียง 176 ไอโซเลท มีอัตราการเจริญมากกว่าร้อยละ 80 ของกลุ่มควบคุม

แบคทีเรียแลคติกที่สามารถทนต่อน้ำดีสด โดยคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบน้ำดี ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ และสามารถมีชีวิตรอดได้มากกว่าร้อยละ 80 ในการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละ 95.13 ของแบคทีเรียแลคติกที่นำมาทดสอบน้ำดีทั้งหมด โดยแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการรอดลดลงเมื่อผ่านลำไส้ส่วนต้นเนื่องจากน้ำดีมีฤทธิ์ในการย่อยไขมันจึงสามารถย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้

ยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็นกลุ่มหลักที่นำมาใช้ทดสอบเชื้อแบคทีเรียแลคติก พบว่ามีเพียงแบคทีเรียแลคติก 78 ไอโซเลท มีคุณสมบัติไม่ต้านต่อยาต้านจุลชีพแบบได้รับภายหลัง (acquired resistance) แต่สามารถต้านต่อยาต้านจุลชีพตามธรรมชาติ (intrinsic resistance) ซึ่งเป็นคุณสมบัติด้านความปลอดภัยอย่างหนึ่งของการคัดเลือกโปรไบโอติก (Sornplang et al., 2016) และพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่ต้านต่อยา tetracycline และ erythromycin เป็นการต้านต่อยาต้านจุลชีพแบบได้รับภายหลัง และยังพบการรายงานการต้านต่อยากลุ่ม aminoglycoside เช่น gentamycin และ streptomycin ซึ่งการต้านยาในกลุ่มนี้เป็นคุณสมบัติต้านต่อยาต้านจุลชีพตามธรรมชาติ ตามชนิดของแบคทีเรียซึ่งไม่ถ่ายทอดพันธุกรรมนี้ไปยังแบคทีเรียอื่น

คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารเป็นสิ่งจำเป็นของเชื้อแบคทีเรียแลคติก โดยทำหน้าที่ในการปรับสมดุลของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร ทำให้ระบบย่อยอาหารทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ เชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้แก่ โรค *E. coli* ATCC 25923, *L. monocytogenes* และ *S.* Typhi พบว่ามี 55 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ปานกลางถึงมาก เชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้ง *E. coli* , *S.* Typhi และ *L. monocytogenes* ได้ โดยแบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกได้ เนื่องจากมีการสร้างกรดแลคติก และแบคเทอริโอซิน ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลิทรีย์ชนิดอื่นได้

จากการทดสอบเบื้องต้นในการผลิต EPS โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลพบว่ามีเพียง 27 ไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบซึ่งการมี EPS ทำให้คุณสมบัติในการยึดเกาะดียิ่งขึ้น สามารถแย่งจับพื้นที่ภายในลำไส้ได้ดี ทำให้แบคทีเรียก่อโรคมีพื้นที่การยึดเกาะได้น้อยลง เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโปรไบโอติกมาทำการเพิ่มจำนวนแล้วจึงทำการสกัดหยาบและวัดปริมาณการผลิต EPS พบว่าไอโซเลท F3-3, N45-1, C57, C12 และ M60-3 มีการผลิต EPS มากที่สุด คือ 3.21, 2.54, 2.36, 2.11 และ 2.11 กรัมต่อลิตรซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Eilaf el al. (2018) ที่ทำการศึกษา *L. plantarum* 1429 และ *L. plantarum* 1034 ที่ผลิต EPS ได้ถึง 2.18 และ 1.36 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการศึกษาของ Khalil et al. (2018) พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่พบมีการผลิต EPS อยู่ในช่วงระหว่าง 1.0-8.5 กรัมต่อลิตร โดยน้ำตาลซูโครสสามารถส่งเสริมให้เชื้อผลิต EPS ได้สูงสุด มีปริมาณเท่ากับ 1.33 กรัม/ลิตร ขณะที่แหล่งคาร์บอนอื่นมีปริมาณ EPS ระหว่าง 0.36-0.45 กรัม/ลิตร ในขณะผลการศึกษาของ Gayathiri et al. (2017) ทำการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อเพิ่มการผลิต EPS พบว่า *Lactobacillus lactis ssp. lactis* ใช้แหล่งคาร์บอนจากกลูโคส ซูโครส แลคโทส โดยกลูโคสสามารถส่งเสริมการผลิต EPS ได้มากที่สุดถึง 82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 37 ºC เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและเพื่อการผลิต EPS ได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การผลิต EPS ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อุณหภูมิ รวมทั้งแหล่งคาร์บอนที่ช่วยส่งเสริมการผลิตให้มีการผลิต EPS ได้มากขึ้น อีกทั้งยังมีรายงานการผลิต EPS ที่แตกต่างกันออกไป ตั้งแต่ 1.0-8.50 กรัมต่อลิตร อีกด้วย (Adesulu et al., 2018)

สรุป

แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากทั้ง 5 กลุ่ม ได้แก่ ทางเดินอาหารสุกร ทางเดินอาหารไก่ แหนม หม่ำ และปลาส้ม ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก คือให้ผลการผลิตเอนไซม์คะตะเลสเป็นลบ ที่มีความสามารถในการทนกรด และด่าง มีการไม่มีต้านยาปฏิชีวนะแบบได้รับมาภายหลัง มีการยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารและมีการผลิต EPS ซึ่งคัดเลือกไอโซเลท F3-3, N45-1, C57, C12 และ M60-3 นำไปเป็นข้อมูลเบื้องต้นของการนำไปผลิตกล้าเชื้อของการเป็นโปรไบโอติก ทั้งนี้อาจจะต้องมีการศึกษาต่อในคุณสมบัติรวมถึงหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คุณชัยพร สร้อยคำ ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความ

สะดวก และทำให้การศึกษาครั้งนี้เป็นไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Adesulu-Dahunsi AT, Jeyaram K, Sanni AI. 2018. Probiotic and technological properties of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based Nigerian fermented food products. Food Control 92, 225-231.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. Wayne USA. 94-104.

Dangmanee N, Plubjeen K, Saklutanasak W, Jaruvattanayon N. 2015. Isolation of Lactic acid bacteria from Fermented ground pork for Probiotic properties. RSU national research conference. 2017

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 28, 350-356.

Dueramaeb S. 2016. Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria and its application. Food J 48(3), 21-30.

Eilaf SK, Mohd YM, Shuhaimi M, Mehrnoush A, Amaal MA, Ahmed A. 2018. Probiotic characteristics of EPS producing *Lactobacillus* isolated from some traditional Malaysian fermented foods. CYTA J Food. 16(1), 287-298.

Fox ID, Robyt JF. 1991. Miniaturization of three carbohydrate analysis using a microplate reader. Anal Biochem 195, 93-96.

Gayathiri E, Bharathi B, Velu S, Siva N, Natarajan S, Prabavathi S, Selvadhas S. 2017. Isolation, identification and optimization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteriafrom raw dairy sample. Inter J Pharm Chemical Res 3(2), 202-211.

Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ.1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. J Dairy Sci 67(12), 3045-3051.

Jin, LZ, Ho MY, Abdullah N, Ali AM, Jalaludin S. 1998. Acid and bile tolerance of lactobacillus isolated from chicken intestine. App Microbiol 27, 183-185.

Halder D, Mandal M, Chatterjee SS, Kumar PN, Mandal S. 2017. Indigenous probiotic lactobacillus isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. Biomedicine 5(2), 31.

Khalil ES, Manap MYA, Mustafa S, Alhelli AM, Shokryazdan P. 2018. Probiotic properties of exopolysaccharide producing *Lactobacillus* Strain isolated from Tempoyak. Molecules. 23.

Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 12, 39–85.

Linton JD, Ash SG, Huybrechts L. 1991Microbial polysaccharides. In Novel Material from Biological Source, 215-262.

Nuphet A, Kantachote D, Charernjiratrakul W. 2004. Screening of probiotic lactic acid bacteria from Thai fermented for human. J Sci technol 26(5), 659-670.

Maneerat S. 2000. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Songklanakarin J Sci Technol 22(3), 397-402.

Sahulsawasdiphan K, Sornplang P. 2017. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from animal gut and Thai traditional fermented foods against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella* Typhi. KKU Vet J 27(1-2), 15-32.

Sornplang P, Sakulsawasdiphan K, Piyadeatsoontorn S, Surasorn B. 2016. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from human and food-producing animal feces in Khon Kaen Province, Thailand. Trop Anim Health Prod 48(8), 1739-1745.

Torino MI, de Valdez GF, Mozzi F. 2015. Biopolymers from lactic acid bacteria novel applications in foods and beverages. Front Microbiol 6(834), 1-16.

Tungwatcharin P, Nithisanthawakub J, Suksupat K. 2016. Preliminary screening and selection of lactic acid bacteria with potential probiotic propertie from fermented meat products. King Mongkut's Agric J 34(2), 67-76.

Whitster RL. 1998. Introduction of industrial Gums, In dustrial Gums. (Whistler R.L. and Bemiller J.N., eds.) p. 1-19. Academic Press. San Diego.

Yolmeh M., Khomeiri M. and Ahmadi Z. 2017. Application of mixture design to introduce an optimum cell-free supernatant of multiple-strain mixture (MSM) for Lactobacillus against food-borne pathogen. Food Sci Technol 83, 298-304.