

การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติก
ที่คัดแยกจากกล้วยน้ำว้าดิบในเขตจังหวัดพิษณุโลก

Isolation and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw
Banana (*Musa sapientum* L.) in Phitsanulok Province

นันทพร รัตนจักร^{1*}, ชัชวินทร์ นวลศรี², มณฑรา ศรีษะแยม¹, สิทธิชัย อุดก่า³ และ อรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์³
Nontaporn Rattanachak^{1*}, Chatchawin Nualsri², Montra Srisayam¹, Sittichai Urtgam³ and Arunlik Chodnakarin³

¹หลักสูตรสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

²หลักสูตรสาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

³หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

¹Microbiology Department, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

²Agricultural Department, Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

³Biology Department, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

*Email: nontaporn19@gmail.com

Received: 06 Jun 20

Revised: 26 Jul 20

Accepted: 13 Aug 20

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) จากกล้วยน้ำว้าดิบระยะที่ 1 ในจังหวัดพิษณุโลก และศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของ LAB ที่คัดแยกได้ รวมถึงระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ความสามารถในการทนเกลือ 0.5% ความสามารถในการทนกรดต่างที่ 2-9 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร และความไวต่อยาปฏิชีวนะ จากการศึกษาพบว่า สามารถคัดแยก LAB จากกล้วยน้ำว้าดิบระยะที่ 1 ได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลต (แกรมบวก รูปร่างกลม ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) แต่มีเพียง 7 ไอโซเลต ที่ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง คือ NR19, NR22, NR23, NR24, NR27, NR28 และ NR38 ซึ่งทั้ง 7 ไอโซเลต สามารถทนเกลือ น้ำดี 0.5% ได้โดยมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 90% และทนต่อสภาวะความเป็นกรดต่างที่ 2-9 ได้ ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิต $\geq$ 40% และมีเพียง 4 ไอโซเลต NR19, NR23, NR24 และ NR27 ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella Typhimurium* ได้ทั้งหมด นอกจากนี้ LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Tetracyclines Chloramphenicol และ Ampicillin และหลังจากระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Enterococcus gallinarum* (NR19) *Lactococcus lactis* ssp. (NR22, NR23, NR24 และ NR38) และ *Weissella paramesenteroides* (NR27 และ NR28) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต มีแนวโน้มที่จะเป็นโพรไบโอติก และคาดว่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพต่อไปได้

คำสำคัญ: โพรไบโอติก แบคทีเรียกรดแลคติก กล้วยน้ำว้าดิบ

Abstract

The objectives of this study were to isolate lactic acid bacteria (LAB) from raw bananas (*Musa sapientum* L.) in Phitsanulok Province and to study the probiotic properties of isolated LABs. The species of LABs were identified using molecular biology techniques. Probiotic properties of isolated LABs such as morphological characteristics, hemolytic activity, 0.5% bile salt tolerance, pH tolerance at 2-9, antimicrobial activity, and antibiotics activity were examined. Results revealed 35 strains of LAB isolated from raw bananas (gram-positive bacteria with catalase-negative properties). However, there were only seven isolated LABs i.e. NR19, NR22, NR23, NR24, NR27, NR28, and NR38 showed a low hemolytic activity. The 7 isolated LABs could resist 0.5% bile salt with over 90% survival rate as well as resist pH 2-9 with $\geq$ a 40% survival rate. There were four isolated LABs (NR19, NR23, NR24, and NR27) revealing the antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella Typhimurium*. Moreover, the seven isolated LABs were sensitive to chloramphenicol and ampicillin. After sequence analysis of 16S rDNA genes of the isolated LABs, it was found that the seven isolated LABs were similar to *Enterococcus gallinarum* (NR19) *Lactococcus lactis* ssp. (NR22, NR23, NR24, and NR38) and *Weissella*

paramesenteroides (NR27 and NR28). Therefore, isolated LABs from raw bananas exhibited promising probiotic properties and could be further developed to food supplements.

Keywords: probiotic, lactic acid bacteria, raw banana

1. บทนำ

ปัญหาหลักทางสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน การปนเปื้อนสารเคมีในอาหาร รวมถึงความเครียดจากการทำงานภายใต้สภาวะความกดดันและการแข่งขันสูง เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้คนล้มป่วย มีสุขภาพร่างกายที่อ่อนแอ ด้วยเหตุนี้ผู้คนเริ่มให้ความสำคัญต่อการดูแลสุขภาพ และมีแนวโน้มที่จะบริโภคอาหารเสริมหรืออาหารเพื่อสุขภาพมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ผลิตจากธรรมชาติมีอยู่มาก ซึ่งโพรไบโอติก (probiotic) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมชนิดหนึ่งที่กำลังเป็นที่นิยมในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติเด่นหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นการรักษาความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในร่างกาย [1] ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ช่วยในการดูดซึมสารอาหาร และช่วยย่อยอาหารที่มนุษย์ย่อยไม่ได้หรือย่อยได้ไม่หมด โดยเฉพาะอาหารที่โพรไบโอติกนำไปใช้ในการเจริญเติบโต หรือเรียกว่า พรีไบโอติก (prebiotic) ซึ่งเป็นสารอาหารที่ได้จากพืช โดยมนุษย์สามารถรับประทานได้ แม้ว่าเอนไซม์ในลำไส้เล็กของร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยและดูดซึมได้แต่พรีไบโอติกเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อโพรไบโอติก จึงมีความสำคัญต่อการนำมาใช้เพื่อเป็นแหล่งพลังงานและส่งเสริมการเจริญเติบโตของโพรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ พรีไบโอติก สามารถพบได้ในพืชผัก ผลไม้ และธัญพืชบางชนิด เช่น หัวหอม ต้นหอม กระเทียม หน่อไม้ฝรั่ง ข้าวบาเลย์ ข้าวสาลี แคนตาลีน และกล้วย เป็นต้น ดังนั้นโดยธรรมชาติแล้วเราจึงสามารถพบจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติกในพืชผัก ผลไม้ และธัญพืช ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอาหารในกลุ่มพรีไบโอติกดังที่กล่าวมา

กล้วย เป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่มีองค์ประกอบของแป้งต้านทานการย่อย (resistant starch; RS2) [2] ซึ่งเป็นสารอาหารกลุ่มพรีไบโอติกชนิดหนึ่ง และสามารถส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกได้ดี [3] กล้วยจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติก เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่มีปริมาณมาก หาได้ง่ายในท้องถิ่น ต้นทุนต่ำ และยังสามารถเลือกใช้เฉพาะกล้วยที่ถูกคัดทิ้งมาเป็นวัตถุดิบได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria: LAB) จากกล้วยน้ำว้าดิบระยะที่ 1 ซึ่งมีลักษณะเป็นผลแข็ง เหลี่ยมขีดเจนเปลือกสีเขียว เนื่องจากมีปริมาณสตาร์ช (starch) ในเนื้อกล้วยมากที่สุด [4] ซึ่งปริมาณสตาร์ชมีผลต่อการเจริญของ โพรไบโอติก [5] และศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของ LAB ที่พบ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของ LAB จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก ซึ่งโพรไบโอติกที่คัดแยกได้ต้องไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค มีปริมาณสูง

เพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ และมีความปลอดภัยเมื่อใช้ในอาหารและในทางคลินิก โดยจุลินทรีย์กลุ่มที่คัดแยกได้ดังกล่าวนี้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม โพรไบโอติกต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) จากกล้วยน้ำว้าดิบ

คัดแยก LAB จากกล้วยน้ำว้าดิบ ที่ได้จากอำเภอ บางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก โดยนำกล้วยน้ำว้าดิบทั้งผล (ใช้ทั้งเปลือกและเนื้อกล้วย) มาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 ซม. ปริมาณ 300 กรัม ผสมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 900 มล. (อัตราส่วน 1:3 กรัมต่อลิตร) จากนั้นนำไปหมักที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นระยะเวลา 30 วัน เก็บตัวอย่าง ทุก ๆ วันที่ 7 เพื่อคัดแยก LAB ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร MRS agar + CaCO₃ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 24-48 ชม. จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร MRS agar + CaCO₃ และเกิดวงใส (clear zone) ที่มีลักษณะสัณฐานแตกต่างกัน มาทำการคัดแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate และนำไปทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นโดยทดสอบการติดสีย้อมแกรม (gram stain) ศึกษาลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (catalase)

2.2 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

2.2.1 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity)

นำ LAB ที่คัดแยกได้จากข้อ 1 ที่เจริญในอาหาร MRS broth ขีด (streak) บนอาหาร Columbia agar ที่ ผสม human blood นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 24 ชม. สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนอาหารว่าเป็นกลุ่ม beta-hemolysis คือมีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ เกิดวงใสสีเหลืองรอบโคโลนีของเชื้อ หรือกลุ่ม alpha-hemolysis เกิดวงใสสีเขียวรอบโคโลนีของเชื้อ หรือกลุ่ม gamma-hemolysis ที่โคโลนีของเชื้อและอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลง [6]

2.2.2 การทดสอบความสามารถในการทนกรดและด่าง

ทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดและด่าง [7] ของ LAB ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จากข้อ 2.2.1 โดยนำ LAB ที่คัดแยกได้ปริมาณ 1 มล. (10⁸ CFU/มล.) ใส่ลงในอาหาร MRS broth ที่มีค่าความ

เป็นกรด-ต่าง 2 3 4 5 6 8 และ 9 ปริมาตร 9 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 6 ชม. ตรวจนับจุลินทรีย์บนอาหาร MRS agar + CaCO₃ ด้วยวิธี viable plate count (spread plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 24 ชม. และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ LAB ตามสมการที่ 1

$$\text{การรอดชีวิตของ LAB (\%)} = (N_1/N_0) \times 100 \quad (1)$$

N_1 คือ จำนวน LAB หลังทดสอบ (log CFU/มล.)
 N_0 คือ จำนวน LAB เริ่มต้น (log CFU/มล.)

2.2.3 การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ น้ำดี (bile salt)

ทดสอบความสามารถในการทนเกลือ น้ำดี [8] เพาะเลี้ยง LAB ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาณ 1 มล. (10⁸ CFU/มล.) ลงในอาหาร MRS broth ที่มีผงเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.5% ปริมาตร 9 มล. จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 12 ชม. ตรวจนับจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาวะเกลือน้ำดี 0.5% ได้ บนอาหาร MRS agar + CaCO₃ ด้วยวิธี viable plate count (spread plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 24 ชม. และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ LAB ตามสมการที่ 1

2.2.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง จุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella Typhimurium* ในอาหาร nutrient broth (NB) นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 35 °C ที่สภาวะมีอากาศ เป็นระยะเวลา 24 ชม. จากนั้น swab จุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร (0.5 McFarland) บนอาหาร nutrient agar (NA) และหยด LAB ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จากข้อ 2.2.2 ปริมาณ 0.5 มล. (10⁸ CFU/มล.) ลงบนอาหาร NA ที่มีจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะมีอากาศ เป็นระยะเวลา 24 ชม. ตรวจผลการยับยั้งด้วยการวัดขนาดของ clear zone และรายงานผลการยับยั้ง

2.2.5 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยใช้ยาปฏิชีวนะที่สำนักงานความปลอดภัยอาหารแห่งสหภาพยุโรป (EFSA) แนะนำ ได้แก่ chloramphenicol streptomycin tetracycline และ ampicillin นำ LAB (10⁸ CFU/มล.) ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จากข้อ 2.2.1 มา swab ลงบนอาหาร MRS agar จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะ (antibiotic discs) บนจานอาหารเพาะเชื้อที่มี LAB อยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 24 ชม. ตรวจผลการ

ยับยั้งด้วยการวัดขนาดของ clear zone และรายงานผลเป็นประสิทธิภาพการยับยั้ง

3. การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์

นำ LAB ที่ผ่านการทดสอบการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น มาระบุชนิดของ LAB โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA โดยนำเซลล์ของ LAB มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด BioFact™ Genomic DNA prep Kit (Biofactory, Korea) ตามวิธีของบริษัท Biofactory (Korea) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพจีโนมมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) โดยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าใน 0.8% อะกาโรสเจล (agarose gel) ในสารละลาย 1XTBE นำจีโนมมิกดีเอ็นเอปริมาณ 30 นาโนกรัม มาใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain) [9] โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ universal bacterial primers 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-GTTACCTTGTACGACTT-3') [10] ด้วยสภาวะที่เหมาะสมร่วมกับเอนไซม์ของ BioFact™ Taq DNA Polymerase (Biofactory, Korea) โดยนำไปให้ความร้อนที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที 50 °C เป็นเวลา 1 นาที และ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 72 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำผลผลิตที่ได้ไปแยกแถบดีเอ็นเอด้วย 1.5% อะกาโรสเจลในสารละลาย 1XTBE ที่ผสมสารเรืองแสง SYBR safe (Invitrogen, USA) และส่องดูภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel documentary (Bio-rad, USA) เพื่อตรวจสอบชิ้นยีนของ 16S rDNA และทำให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด BioFact™ Gel & PCR Purification System (Biofactory, Korea) ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ด้วยวิธี standard sequencing โดยบริษัท Bionics (Korea) จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LAB ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Mega7 [11] แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [12]

4. ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากกล้วยน้ำว้าดิบ

พบการเจริญของแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีของ LAB และสร้าง clear zone บนอาหาร MRS agar + CaCO₃ ในระยะ 7-18 วันแรกของการหมัก และมีจำนวนลดลงเมื่อระยะเวลาหมักเพิ่มขึ้น พร้อมทั้งมีจุลินทรีย์กลุ่มอื่นเจริญขึ้นหลายสายพันธุ์ ทำการคัดเลือก LAB ที่มีลักษณะดังที่กล่าวมาเบื้องต้น และแตกต่างกันได้ทั้งหมด 38 ไอโซเลต และเมื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็น LAB เบื้องต้น พบว่า มีเพียง 35 ไอโซเลต ที่ผ่านคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็น LAB คือเจริญ

บนอาหาร MRS agar+CaCO₃ ในสภาวะไร้อากาศ สร้าง clear zone (Figure 1) ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม ไม่สร้างเอนไซม์ คะตะเลส

4.2. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

4.2.1 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity)

จากการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดงของ LAB ทั้ง 35 ไอโซเลต โดยนำ LAB ทั้งหมด 35 ไอโซเลต มา streak บนอาหาร Columbia agar ที่ ผสม human blood บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 24 ชม. พบว่า มีเพียง 7 ไอโซเลต ได้แก่ NR19, NR22, NR23, NR24, NR27, NR28 และ NR38 ที่ไม่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (γ-hemolysis) (Figure 2)



Figure 1 Growth of LABs on MRS agar with CaCO₃



Figure 2 Growth of LAB on Columbia agar with human blood; not hemolysis (γ-hemolysis)

4.2.2 การทดสอบความสามารถในการทนกรดและด่าง

หลังจากทดสอบความสามารถในการทนกรด-ด่างของ LAB ที่ผ่านการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 7 ไอโซเลต ในอาหาร MRS broth ที่มีสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ 2-9 และเมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 6 ชม. พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ 2-9 ได้ แต่มีเพียง NR27 และ NR38 ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สภาวะกรด pH 2 เกิน 50% โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 75.61±0.27 และ 50.54±0.69 ตามลำดับ และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 3-9 LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 50% ทั้งนี้จากผลการทดลองพบว่าไอโซเลต NR 27 สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดที่ pH 2 ได้ดีที่สุด (Table 1)

4.2.3 การทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดี (bile salt) 0.5%

หลังจากทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.5% ของ LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต ปริมาณ 1 มล. (10⁸ CFU/มล.) ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 12 ชม. พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต สามารถทนต่อสภาวะเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.5% ได้ดี เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเกิน 90% ทุกไอโซเลต และไอโซเลตที่ทนได้ดีที่สุดคือ NR 24 รองลงมาคือ NR 27 (Table 2)

4.2.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร

หลังจากทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. Typhimurium* พบว่า มีเพียงไอโซเลต NR19 NR23 NR24 และ NR27 มีฤทธิ์ต้านหรือสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้ง 4 ชนิด ส่วนไอโซเลต NR22 NR28 และ NR38 ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้งหมด โดย NR22 ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ NR28 และ NR31 ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *S. Typhimurium* ได้ และ NR38 ไม่สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* ได้ (Table 2)

4.2.5 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

จากการนำ LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด ได้แก่ chloramphenicol ampicillin tetracycline และ streptomycin พบว่าเมื่อเทียบขนาดของ clear zone ที่ได้ กับตารางมาตรฐานของ CLSI [13] LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต ต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนชนิด streptomycin แต่ทั้ง 7 ไอโซเลต มีความไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย คือ ampicillin ซึ่งจากผลการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะ พบว่า ยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้ง LAB ได้ดีที่สุด และเหมาะต่อการเลือกใช้ในการยับยั้ง LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต นี้คือ chloramphenicol และ ampicillin (Table 2)

Table 1 In vitro tests of tolerance to pH 2-9 of LABs isolated from banana.

Isolated no.	Survival rate (%)						
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 8	pH 9
NR19	48.58±0.66 ^e	88.93±0.16 ^d	90.73±0.70 ^c	89.12±1.10 ^d	98.54±0.62 ^a	96.82±0.11 ^b	96.62±0.69 ^b
NR22	45.51±0.75 ^e	79.55±0.23 ^d	90.93±0.20 ^b	88.83±1.09 ^c	98.85±0.83 ^a	98.05±0.55 ^a	98.47±1.41 ^a
NR23	44.92±0.41 ^e	73.35±2.18 ^d	91.85±0.02 ^b	87.38±0.51 ^c	99.25±0.71 ^a	91.93±0.43 ^b	92.17±0.43 ^b
NR24	49.29±0.07 ^e	82.76±0.11 ^d	94.50±1.57 ^c	95.23±1.22 ^c	99.39±0.31 ^b	101.60±1.01 ^a	101.98±1.55 ^a
NR27	75.61±0.27 ^g	85.93±0.62 ^f	98.08±0.42 ^e	99.93±0.08 ^c	99.02±0.43 ^d	103.22±0.04 ^b	103.92±0.44 ^a
NR28	42.38±0.90 ^e	60.00±0.26 ^d	71.10±0.07 ^c	89.98±0.20 ^b	99.86±0.14 ^a	89.86±0.37 ^b	90.73±1.09 ^b
NR38	50.54±0.69 ^e	76.05±1.09 ^d	92.87±0.22 ^c	95.09±1.53 ^b	99.06±0.02 ^a	99.81±1.09 ^a	99.57±0.31 ^a

Remark: Mean of three replicates ± standard, ^{a-g} Means in the rows with different lowercase superscripts indicate significant difference ($p \leq 0.05$)

Table 2 In vitro tests of tolerance to 0.5% bile salt, antimicrobial activity and antibiotics activity of LABs isolated from banana.

Isolated no.	Tolerance to 0.5% Bile salt	Antimicrobial activity *				Antibiotics activity**			
	Survival rate (%)	Sa.	Bc.	St.	Ec.	S	T	C	A
NR19	91.03±0.26	++	++	++	++	n.r.	R	S	S
NR22	94.61±0.16	-	++	++	++	R	S	S	S
NR23	90.07±0.09	++	++	++	++	R	S	S	S
NR24	97.87±0.00	++	++	++	++	R	S	S	S
NR27	97.43±0.16	++	+++	++	++	R	MS	S	S
NR28	92.44±0.82	-	++	-	++	R	S	MS	S
NR38	94.69±0.11	+	+	-	++	R	S	S	S

*Indicator Strains; Sa- *Staphylococcus aureus*; Bc- *Bacillus cereus*; St- *Salmonella* Typhimurium; Ec- *Escherichia coli*

*Indicator antibiotic; S- Streptomycin (10 µg/disc); T- Tetracyclines (30 µg/disc); C- Chloramphenicol (30 µg/disc); A- Ampicillin (10 µg/disc)

**:- no antimicrobial activity; + the inhibition zone is less than 10 mm; ++ the inhibition zone is 10 mm to 20 mm; +++ the inhibition zone is above 20 mm. **R, Resistant; S, sensitive; MS, moderately sensitive; n.r. not recommended according to EFSA guidelines. The breakpoints for the antibiotic sensitive/resistant in mm zone of inhibition i.e. Streptomycin ($\geq 15/\leq 12$); Tetracyclines ($\geq 19/\leq 14$); Chloramphenicol ($\geq 18/\leq 12$); Ampicillin ($\geq 17/\leq 14$)

4.3 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์

จากการทดสอบการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของ LAB ทั้งหมด 35 ไอโซเลต มีเพียง 7 ไอโซเลต ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก เมื่อนำไประบุสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA และนำข้อมูลที่ได้ของทั้ง 7 ไอโซเลต ไปหาความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S rDNA ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม BLAST ผลการวิเคราะห์พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Enterococcus gallinarum* (NR19), *Lactococcus lactis* ssp. (NR22, NR23, NR24 และ NR38) และ *Weissella paramesenteroides* (NR27 และ NR28) ทั้งนี้พบว่า NR27 มีศักยภาพสูงที่สุดในการเป็นโพรไบโอติกและถูกระบุสายพันธุ์เป็น *W. paramesenteroides* 99.57%

5. วิจัยผลกระทบทดลอง

จุลินทรีย์โพรไบโอติก คือแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก และเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญกับมนุษย์ไม่ว่าจะทางตรงหรือทางอ้อม เนื่องจากโพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการกระตุ้นการทำงานของเซลล์เยื่อในการสร้างเยื่อเมือก กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ปรับสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ ช่วยกระตุ้นเยื่อบุลำไส้ให้เจริญเติบโตและช่วยรักษาการอักเสบต่าง ๆ นอกจากนี้โพรไบโอติกยังช่วยรักษาอาการของโรคภูมิแพ้ทั้งในเด็ก ผู้ใหญ่ รวมทั้งในผู้สูงอายุด้วย [14] ทั้งนี้การที่จะได้มาซึ่งโพรไบโอติกที่ดีนั้นจะต้องมีการคัดแยกหรือคัดเลือกจากแหล่งที่มาที่ปลอดภัย มีความเหมาะสม และต้องมีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดี มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมสุขภาพได้เป็นอย่างดี และปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการ

คัดแยก LAB จากกล้วยน้ำว้าดิบเพื่อคัดเลือกโพรไบโอติก โดยศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก จาก LAB ที่คัดแยกได้จากกล้วยน้ำว้าดิบ ซึ่งมี 35 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก รูปร่างกลม ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส กล้วยน้ำว้าดิบมีส่วนประกอบของแป้งต้านทานการย่อยประเภทที่ 2 (native starch ungelatinized granule) แป้งต้านทานการย่อย คือ โพรไบโอติกชนิดหนึ่งที่สามารถใช้เป็นอาหารของจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้ [15, 16] เนื่องจากแป้งต้านทานการย่อยจัดเป็นอาหารที่มีเส้นใยอาหารสูง เหมาะสำหรับจุลินทรีย์สุขภาพบริเวณลำไส้ใหญ่ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของ LAB จึงทำให้เกิดกระบวนการหมักและได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันชนิดสายสั้นที่สำคัญคือ แอซิเตต (acetate) โพรพิโอเนต (propionates) และบิวทิเรต (butyrate) ที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค แต่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สุขภาพได้ ดังนั้นเราจึงสามารถคัดแยก LAB ได้จากกล้วยน้ำว้าดิบ [17]

จากการศึกษาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของคนพบว่า LAB เพียง 7 ไอโซเลต ที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (γ -hemolysis) ซึ่งคุณสมบัติทั่วไปของ LAB ที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกนั้นจะต้องไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง แต่ทั้งนี้มียางานว่า *Lactobacillus pentosus* บางสายพันธุ์สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้แบบ α -hemolysis แต่ไม่พบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β -hemolysis [6]

โดยทั่วไปโพรไบโอติกจะสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมเช่นสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก รวมถึงสภาวะที่มีอากาศเบาบางในระบบทางเดินอาหาร ทั้งนี้ร่างกายของคนจะสร้างกรดประมาณ 2.5 ลิตร และน้ำดี 1 ลิตรต่อวัน [18] จากผลการทดสอบ LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต ในการทนกรด-ด่างที่ 2-9 พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต สามารถทนต่อกรด-ด่าง ที่ 2-9 ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต $\geq 40\%$ และทั้ง 7 ไอโซเลต สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ 0.5% ได้ โดยทั้งหมดมีเซลล์ที่รอดชีวิต $\geq 90\%$ ดังนั้น LAB ทั้ง 7 ไอโซเลตนี้ จึงมีคุณสมบัติเบื้องต้นเพียงพอที่จะเป็นโพรไบโอติกได้ นอกจากนี้ LAB บางสายพันธุ์ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ รวมถึงจุลินทรีย์ก่อโรค อาจเนื่องจากสารหลายชนิดที่ผลิตขึ้น ซึ่งได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และแบคทีริโอซิน (bacteriocin) เป็นต้น [19] ซึ่งจากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค โดยใช้จุลินทรีย์ก่อโรคจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *E. coli* และ *B. cereus* พบว่า มี LAB เพียง 4 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารทั้งหมดได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงคาดว่าสามารถป้องกันโรคที่อาจเกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรค และป้องกันปัญหาสุขภาพอื่น ๆ ได้

LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้ในครั้งนี้คือต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มที่ทำลายการสังเคราะห์โปรตีนชนิด

streptomycin และมีบางสายพันธุ์ที่ต่อยาปฏิชีวนะ tetracyclines (NR19) ทั้งนี้ LAB ทั้ง 7 ไอโซเลตที่คัดแยกได้มีความไวและตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนชนิด chloramphenicol และยาปฏิชีวนะในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ชนิด ampicillin ซึ่งงานวิจัยของ Sanders et. al. [20] ได้กล่าวไว้ว่า ถึงแม้ LAB บางสายพันธุ์ เช่น *Enterococci* รวมถึง *E. faecium* ที่มีความต่อยาปฏิชีวนะ แต่ก็ไม่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ เนื่องจากยังคงมียาปฏิชีวนะบางชนิดที่สามารถยับยั้งและทำลายองค์ประกอบของ LAB ได้

จากการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของ LAB ทั้งหมด 35 ไอโซเลต พบว่ามีเพียง 7 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นตรงตามที่ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์และแนวทางปฏิบัติการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร และตามที่ประกาศกระทรวงสาธารณสุขกำหนด ดังนั้น LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต จึงเหมาะสมที่จะเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ซึ่งจากการทดสอบประสิทธิภาพการเป็นโพรไบโอติกของทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่า NR27 มีศักยภาพสูงสุดในการเป็นโพรไบโอติก และถูกระบุสายพันธุ์เป็น *W. paramesenteroides* 99.57% ทั้งนี้มีงานวิจัยของ Mahantesh et al. [21] ที่กล่าวถึงศักยภาพของ *W. paramesenteroides* DFR-8 ที่คัดแยกได้จากแตงกวา และสามารถผลิตแบคทีริโอซินเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้ นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยของ Ndagano et al. [22] ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของ *W. paramesenteroides* LC11 ที่คัดแยกได้จากมันสำปะหลังหมัก ดังนั้นจากคุณสมบัติของ *W. paramesenteroides* ที่คัดแยกได้ จึงเหมาะสมที่จะนำไปทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกขั้นสูงต่อไป เช่น การทดสอบการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีน (Biogenic amine production) การตรวจหาอินทรีย์วัตถุด้วยเทคนิค PCR การทดสอบความคงทนต่อสภาวะเลียนแบบระบบทางเดินอาหาร การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะติดลำไส้ รวมถึงการทดสอบความสามารถในการลดคลอเลสเตอรอลได้ เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เป็นพื้นฐานที่จะนำแบคทีเรียไปใช้เป็นโพรไบโอติกต่อไป

7. สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของ LAB ที่คัดแยกจากกล้วยน้ำว้าดิบ ทั้งหมด 35 ไอโซเลต พบว่า มี LAB จำนวน 7 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น คือไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง และเกลือน้ำดี ที่จำลองจากสภาวะในระบบทางเดินอาหาร รวมถึงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคบางสายพันธุ์ และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ ซึ่งคุณสมบัติของ LAB ทั้ง 7 ไอโซเลตที่กล่าวมานี้ เป็นไปตามข้อกำหนดเบื้องต้น

ตรงตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์และแนวทางปฏิบัติการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกใน อาหารและประกาศกระทรวงสาธารณสุข ดังนั้น LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต จึงมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกและเหมาะสมที่จะ นำไปทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกขั้นสูง และผลิต เป็นอาหารเสริมสุขภาพต่อไป

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนพัฒนาการ วิจัยและบริหารจัดการงานวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูล สงคราม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 ประเภททุนวิจัยเพื่อ พัฒนานักวิจัย (ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่) ประจำปีงบประมาณ 2562

9. เอกสารอ้างอิง

- [1] Mallappa and et al. 2012. Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**. 56: 29-33.
- [2] Prakarn Rudeekulthamrong and Jarunee Kaulpiboon. 2012. Prebiotics: Health-Promoting Food. **Thammasat Medical Journal**. 12(2): 362-369. (in Thai)
- [3] Evange' lica Fuentes-Zaragoza and et al. 2011. Resistant starch as prebiotic: A review. **Starch journal**. 63: 406-415.
- [3] Topping, D. L., Fukushima, M. and Bird, A. R. 2003. Resistant starch as a prebiotic and symbiotic. **Proceedings of the 7th Nutrition Society**, 27-30 may 2002. 62: 171-176.
- [4] Wasan S. 2000. **Physicochemical properties of starch isolated from some Thai banana**. M.Sc. Thesis, Chulalongkorn University. (in Thai)
- [5] Williams, C.H., S.A. Witherly and R.K. Buddington. 1994. Influence of dietary neosugar on selected bacterial groups of the human faecal microbiota. **Microbial Ecology in Health and Disease**. 7: 91-97.
- [6] Argyri, A.A. and et al. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology**. 33(2): 282-291.
- [7] Brink, M. and et al. 2006. The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic

cells to intestinal mucus. **Journal of Applied Microbiology**. 100(4): 813-820.

- [8] Begley, M., Hill, C. and Gahan, C.G. 2006. "Bile salt hydrolase activity in probiotics". **Applied Environmental Microbiology**. 72(3): 1729-1738.
- [9] Mullis, K. and et al. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. 51(1): 263-273.
- [10] Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E. and Goodfellow M. (eds), **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**, Chichester, United Kingdom. 115-175.
- [11] Kumar S, Stecher G, and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. 33: 1870-1874.
- [12] Lan Q, and et al. 2009. Large-scale evaluation of candidate genes identifies associations between DNA repair and genomic maintenance and development of benzene hematotoxicity. **Carcinogenesis**. 30(1): 50-80.
- [13] CLSI. 2016. **CLSI Supplement M100S**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 26th Edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [14] Nopchinda s. 2015. Probiotics for Health Promotion. **Journal of The Royal Thai Army Nurses**. 15(3): 430-435. (in Thai)
- [15] Englyst, H.N. and Hudson, G.J. 1992. The classification and measurement of dietary carbohydrates. **Food Chemistry**. 57: 15-21.
- [16] Asp, N. G., and Bjorck, I. 1992. Resistant starch. **Trends in Food Science & Technology**. 3 (5): 111-114.
- [17] Ratithammatorn T. 2017. Resistant Starch. **Burapha Science Journal**. 22(1): 166-176. (in Thai)
- [18] Cotter, P.D. and Hill, C. 2003. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 67(3): 429-453.

- [19] Daeschel, M.A. (1989) Antimicrobial Substances from Acid Lactic Bacteria for Use as Food Preservative. **Food Technology**. 43: 164-167.
- [20] Sanders, M. E. and et al. 2010. Safety assessment of probiotic. **Gut Microbes**. 1(3): 164–185.
- [21] Mahantesh M Patil and et al. 2010. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from curd and cucumber. **Indian Journal of Biotechnology**. 9(2): 166-172.
- [22] Ndagano D. and et al. 2011. Antifungal Activity of 2 Lactic Acid Bacteria of the Weissella Genus Isolated from Food. **International Journal of Food Science**. 76(6): 305-311.