การคัดแยก ระบุชนิด และการเตรียมกล้าเชื้อโพรไบโอติกจากลูกแป้งในประเทศไทย

ณัฐกร ยั่วยวน[1], วินัย เสียงหวาน[1], ระพีพรรณ มะหาวัน[1], พัฒนศักดิ์ รุ่งสิริวานิช[2] และ นฤมล ทองไว[1,*]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

[2]กรมการพัฒนาชุมชน กระทรวงมหาดไทย เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210

[*]อีเมลผู้ประพันธ์บรรณกิจ: nthongw@hotmail.com

บทคัดย่อ

ลูกแป้ง เป็นกล้าเชื้อที่ใช้ในการหมักอาหารและเครื่องดื่มแบบดั้งเดิมของไทยมาเป็นเวลานาน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากลูกแป้งเพื่อใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อโพรไบโอติก เมื่อเก็บตัวอย่างลูกแป้งจาก 7 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ เชียงราย ยโสธร มหาสารคาม ศรีสะเกษ อุทัยธานี ตราด และจันทบุรี มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย พบแบคทีเรียจำนวน 21 ไอโซเลต ทั้งหมดเป็นแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ให้ผลลบกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส การย่อยไขมัน และการย่อยแป้ง นอกจากนี้ ทุกไอโซเลตสามารถผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส ไม่สร้างก๊าซ สามารถย่อยโปรตีนและทนเกลือที่ความเข้มข้น 0-8% (w/v) เมื่อเพาะเลี้ยงทุกไอโซเลตในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า มีค่า pH ระหว่าง 3.77-4.47 เมื่อทำการระบุชนิดโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่าประกอบด้วย 4 ชนิด ได้แก่ *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* และ *Pediococcus acidilactici* โดยมีความเหมือนของลำดับยีน 16S rRNA ระหว่าง 96.66-99.56% เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดที่สุดจากฐานข้อมูล NCBI ลำดับเบสของแบคทีเรียทุกไอโซเลตถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยมี accession number คือ PV052822-PV052842 จากนั้นคัดเลือก *L. plantarum* เพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อโพรไบโอติกแบบสดและแบบแห้งโดยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) พบว่าสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 4 ℃ หลังผ่านไป 30 วัน การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ลูกแป้งอุดมไปด้วยโพรไบโอติกซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพและส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ แบคทีเรียที่แยกได้ยังมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อโพรไบโอติก เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเครื่องดื่ม และยา ในอนาคต

คำสำคัญ: การหมัก, แบคทีเรียกรดแลกติก, โพรไบโอติก, กล้าเชื้อ, ลูกแป้ง

Isolation, Identification and Inoculum Preparation of Probiotics from Loog-Pang in Thailand

Nattakorn Yuayuan[1], Winai Siangwan[1], Rapeepun Mahawan[1], Patthanasak Rungsirivanich[2] and Narumol Thongwai[1,*]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
[2]Community Development Department, Ministry of Interior, Laksi, Bangkok 10210, Thailand

[*]Corresponding author's e-mail: nthongw@hotmail.com

Abstract

Loog-Pang, a Thai traditional fermentation starter culture, has been used as an ingredient in various fermented foods and beverages for a long time. This research aimed to isolate and identify lactic acid bacteria with probiotic potential from Loog-Pang for probiotic inoculum preparation. In this study, twenty-one bacterial isolates were isolated from Loog-Pang collected from 7 provinces of Thailand including Chiang Rai, Yasothon, Maha Sarakham, Sisaket, Uthai Thani, Trat and Chanthaburi. Morphological, biochemical and physiological characterization revealed that all bacterial isolates were Gram positive, non-motile, gamma haemolysis, and negative for catalase and KOH string tests as well as starch and lipid hydrolysis. Additionally, all isolates produced acid from glucose (without gas), hydrolyzed protein and demonstrated resistance to NaCl concentrations ranging from 0 to 8% (w/v). Bacterial isolates cultured in MRS broth at 37 °C for 24 hours presented pH values ranging from 3.77 to 4.47. Based on 16S rRNA gene sequence identification, bacterial isolates were identified within 4 species consisting of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici*. The 16S rRNA gene sequences of the bacterial isolates exhibited a similarity of 96.66-99.56% with their closest related species. All sequences were deposited in the GenBank under accession number PV052822-PV052842. The *Lactiplantibacillus plantarum* strains were selected to develop probiotic inocula using freeze drying technique. The results showed that probiotic inocula could survive at 4 °C after 30 days. The study indicates that Loog-Pang is rich in probiotics which are beneficial to health and promote immune system. Besides, isolated bacteria have the potential to be developed into probiotic inocula for applications in the food, beverage and pharmaceutical industries in the future.

Keywords: Fermentation, Lactic acid bacteria, Probiotics, Starter culture, Loog-Pang

บทนำ

ลูกแป้ง (Loog-Pang) เป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ดั้งเดิมของไทยที่มีการใช้มาอย่างยาวนานในการหมักอาหารและเครื่องดื่ม เช่น ข้าวหมาก น้ำส้มสายชู และสาโท เป็นต้น ในอดีตการใช้ลูกแป้งเพื่อการหมักสุราพื้นบ้านถูกควบคุมภายใต้พระราชบัญญัติสุรา พ.ศ. 2493 ภายหลังได้มีการปรับปรุงเพื่อให้ประชาชนมีเสรีภาพในการประกอบอาชีพอย่างเป็นธรรม ทำให้ประชาชนสามารถผลิตและจำหน่ายลูกแป้งได้อย่างเสรี ส่งผลให้เกิดการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของข้าว ซึ่งเป็นวัตถุดิบของการผลิตลูกแป้ง การใช้ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อสำหรับหมักน้ำส้มสายชูยิ่งทำให้เกิดการเพิ่มมูลค่าทางการค้ายิ่งขึ้น เนื่องจากน้ำส้มสายชูหมักจัดเป็นเครื่องดื่มเพื่อเสริมสุขภาพที่ดี เป็นที่นิยมในหมู่ผู้รักสุขภาพ กระบวนการผลิตลูกแป้งเป็นวัฒนธรรมท้องถิ่นของหลายประเทศ เช่น เกาหลี อินโดนีเซีย อินเดีย ฟิลิปปินส์ จีน มาเลเซีย ญี่ปุ่น และเวียดนาม เป็นต้น การเตรียมลูกแป้งเริ่มจากการนำข้าวหรือข้าวสาลีบดผสมกับพริกไทย กระเทียม และน้ำ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปั้นเป็นก้อนกลมขนาดเล็ก นำไปคลุกกับผงกล้าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จะได้ลูกแป้งที่พร้อมใช้งาน ทั้งนี้สามารถเก็บลูกแป้งไว้ได้นานหลายเดือน (Luangkhlaypho et al., 2014) กระบวนการหมักที่ใช้ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่ การย่อยคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน (saccharification) และการหมักแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation) โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์หลายชนิด (mixed culture) ได้แก่ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย (Roongrojmongkhon et al., 2020)

โพรไบโอติก (probiotics) คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อบริโภคในปริมาณที่เหมาะสม จะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค (FAO/WHO, 2002) จุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก (lactic acid bacteria) เนื่องจากสามารถอยู่รอดในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ป้องกันโรคบางชนิด และส่งเสริมการทำงานของระบบภายในร่างกาย (Irkin and Kinik, 2017) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลกติกยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักอาหารและเครื่องดื่ม เช่น ผักดอง โยเกิร์ต เนยแข็ง และเครื่องดื่มหลายชนิด นอกจากจะช่วยให้อาหารมีกลิ่นและรสชาติที่ดีขึ้น ยังช่วยในการถนอมอาหารอีกทางหนึ่ง ตัวอย่างของแบคทีเรียโพรไบโอติก เช่น *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella cibaria* และ *Lactococcus lactis* เป็นต้น (Phan et al., 2017)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากลูกแป้งที่เก็บจากพื้นที่ 7 จังหวัดในประเทศไทย ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี สรีรวิทยา และระบุชนิดโดยวิธีทางชีวโมเลกุลของแบคทีเรียที่แยกได้ และผลิตกล้าเชื้อโพรไบโอติกแบบสดและแบบแห้ง สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมัก ซึ่งจะเป็นแนวทางในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม และยา ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อคัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากลูกแป้งที่เก็บในประเทศไทย
2. เพื่อเตรียมกล้าเชื้อโพรไบโอติกจากลูกแป้ง สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากลูกแป้ง

เก็บตัวอย่างลูกแป้งจำนวน 12 ตัวอย่าง จากพื้นที่ 7 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ เชียงราย (3 ตัวอย่าง), ยโสธร (1 ตัวอย่าง), มหาสารคาม (3 ตัวอย่าง), ศรีสะเกษ (1 ตัวอย่าง), อุทัยธานี (1 ตัวอย่าง), ตราด (2 ตัวอย่าง) และจันทบุรี (1 ตัวอย่าง) บดลูกแป้งให้ละเอียด จากนั้นนำลูกแป้งบด 10 กรัม ใส่ลงไปในน้ำเกลือปลอดเชื้อ (สารละลาย NaCl 0.85%, w/v) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาทำการเจือจางลำดับส่วนแบบ 10 เท่า ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อให้ได้ความเจือจาง 1×10^{-4} – 1×10^{-6} ก่อนนำไป spread

plate บนอาหารวุ้นแข็ง de Man, Rogosa and Sharpe (MRS agar) ที่มี 1% (w/v) แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และ 0.004% (w/v) bromocresol purple นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่เกิดบริเวณใส (clear zone) และเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง นำมา restreak บนอาหาร MRS agar จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการเก็บเชื้อที่แยกได้ใน skim milk เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C (Rittiplang et al., 2007)

2. การวัดการเจริญของแบคทีเรียและการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียคัดแยกในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (GENESYS 20, Waltham, MA, USA) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นตัวปรับค่าศูนย์ และวัดค่าความเป็นกรด–ด่างที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัด pH (Metrohm, Switzerland) (Rungsirivanich et al., 2019)

3. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.1 การตรวจสอบสัณฐานวิทยา

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาทำการ restreak บนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะ สี การยกตัวขอบ ผิวหน้า และขนาดของโคโลนี จากนั้นทำการย้อมสีแกรม (Gram stain) และศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (compound light microscope) สังเกตและจดบันทึกลักษณะที่เกิดขึ้น (Rungsirivanich et al., 2019)

3.2 การศึกษาทางสรีรวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.2.1 การสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test)

นำห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียคัดแยก นำไปป้ายลงบนแผ่นสไลด์แก้ว หยดสารละลาย 3% (v/v) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) สังเกตการเกิดฟอง โดยผลบวกจะแสดงการเกิดฟองก๊าซ และผลลบไม่มีฟองเกิดขึ้น (Thongwai et al., 2022)

3.2.2 การทดสอบการเกิดเส้นสายหนืด (string test)

หยดสารละลาย 3% (w/v) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ลงบนสไลด์แก้ว ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียคัดแยกผสมกับ KOH ยกห่วงถ่ายเชื้อขึ้นลง สังเกตการเกิดเส้นสายหนืด (Thongwai et al., 2022)

3.2.3 การทดสอบการเคลื่อนที่

นำเข็มเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียคัดแยก แทง (stab) ลงในอาหาร motility medium ที่บรรจุในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นรอบรอยแทง (Rungsirivanich et al., 2019)

3.2.4 การทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคส

เพาะเชื้อแบคทีเรียคัดแยกในอาหาร phenol red glucose broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ และการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลืองซึ่งแสดงว่าจุลินทรีย์สามารถสร้างกรดได้ (Thongwai et al., 2022)

3.2.5 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียคัดแยกบนอาหาร blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Rungsirivanich et al., 2019)

3.2.6 การย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียคัดแยกในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร MRS agar ที่มี 2% (w/v) skim milk เพื่อทดสอบการย่อยโปรตีน บนอาหาร MRS agar ที่มี 1% (w/v)

tributyrin และบนอาหาร MRS agar ที่เติม 1% (w/v) starch นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสรอบโคโลนีที่แสดงถึงการย่อยโปรตีนหรือไขมัน สำหรับการทดสอบการย่อยแป้ง ให้หยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สังเกตการเกิดวงใสบริเวณรอบโคโลนี ถ้าแบคทีเรียไม่สามารถย่อยแป้งได้อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีม่วงน้ำเงิน

3.2.7 การทดสอบการทนเกลือ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียคัดแยกในอาหาร MRS broth ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Rungsirivanich et al., 2019)

3.2.8 การทดสอบความสามารถในการหมัก

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียคัดแยกในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีหลอดดักก๊าซ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้นและฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ (Rungsirivanich et al., 2019)

4. การศึกษาทางชีวโมเลกุล

4.1 การสกัด chromosomal DNA จากแบคทีเรียคัดแยก

4.1.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียคัดแยกในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37℃ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลา 5 นาที

4.1.2 ละลายตะกอนเซลล์ใน TNE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม 2% (v/v) Triton X-100 TNE buffer ปริมาตร 270 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture บ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 30 นาที

4.1.3 สกัดด้วย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 270 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture ปั่นแยกชั้นที่ 12,000 rpm 4 ℃ เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบน (aqueous phase) ใส่หลอดใหม่

4.1.4 ตกตะกอน DNA โดยการเติม 95% (v/v) ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่ -20 ℃ เป็นเวลาข้ามคืน ปั่นเก็บตะกอน DNA ที่ 12,000 rpm 4 ℃ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของเหลวออกให้หมดและปล่อยให้ตะกอน DNA แห้งในอากาศ (air-dry)

4.1.5 ละลายตะกอน DNA ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบ DNA ที่สกัดได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis บน 0.8% (w/v) agarose (Rungsirivanich et al., 2019)

4.2 การตรวจสอบ DNA โดยวิธี agarose gel electrophoresis

4.2.1 ชั่ง agarose gel 0.32 กรัม ละลายด้วย 1X TAE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ต้มให้ละลายโดยใช้ microwave เท agarose gel ลงใน gel chamber ที่วาง comb เพื่อให้เกิดหลุม แล้วปล่อยให้แข็งตัวประมาณ 20 นาที จากนั้นดึง comb ออกแล้วนำมาวางลงใน gel chamber เติม 1X TAE buffer ลงทั้งสองข้างของ gel chamber จนกระทั่งท่วม agarose gel

4.2.2 ผสม genomic DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับ 6X loading dry buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นเติมลงในแต่ละหลุมของ gel เปรียบเทียบกับ lamda DNA marker ทำการเดินเครื่อง agarose gel electrophoresis ที่ 95 V 300 mA เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำ gel มาย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออกโดยแช่ในน้ำกลั่น ส่องดูภายใต้แสง UV โดยเครื่อง UV transilluminator และบันทึกภาพ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป (Thongwai et al., 2022)

4.3 การเพิ่มปริมาณ 16S rRNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.3.1 เตรียมสารละลาย master mix ประกอบด้วย genomic DNA ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร, 100 mM Primer 27F (5′-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3′) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 100 mM Primer 1492R (5′-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3′) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และ Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

4.3.2 นำหลอด PCR ที่มีสารผสมใส่ลงในเครื่อง Thermal Cycler (GeneAmp, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) กำหนดอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้: (1) initial denaturation 94 ℃ เป็นเวลา 5 นาที; (2) denaturation 94 ℃ เป็นเวลา 1 นาที; (3) annealing 56 ℃ เป็นเวลา 1 นาที; (4) extension 72℃ เป็นเวลา 1 นาที โดยทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ; (5) final extension 72 ℃ เป็นเวลา 5 นาที; ตรวจสอบ PCR product ด้วย 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis (Thongwai et al., 2022)

4.4 การระบุชนิดของแบคทีเรียคัดแยกเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI

ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสด้วย DNA sequencing services จากหน่วยงานวิเคราะห์ภายนอก นำลำดับเบสที่ได้รับมาเปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรียและฝากลำดับเบสกับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank โดย accession number ที่ได้รับคือ PV052822-PV052842 จากนั้นสร้าง phylogenetic tree ด้วย neighbor-joining method ซึ่งมี bootstrap values เท่ากับ 1,000 ซ้ำ ด้วยโปรแกรม MEGA X (Rungsirivanich et al., 2020)

5. การเตรียมกล้าเชื้อโพรไบโอติก

5.1 คัดเลือกแบคทีเรียที่ผ่านการระบุชนิดว่าเป็นสายพันธุ์โพรไบโอติก ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร (ฉบับที่ 2) ลงวันที่ 27 มิถุนายน พ.ศ. 2554 และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 346) พ.ศ. 2555

5.2 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียคัดเลือกในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนเซลล์ ปั่นล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ 2 ครั้ง

5.3 นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายในน้ำนม UHT ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) โดยเครื่อง lyophilizer (FTS system, Cleveland, OH, USA) เก็บผงกล้าเชื้อในที่แห้งหรือตู้เย็นสำหรับใช้ประโยชน์ต่อไป

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากลูกแป้ง

ในการเก็บตัวอย่างลูกแป้ง 12 ตัวอย่างจากพื้นที่ 7 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย ยโสธร มหาสารคาม ศรีสะเกษ อุทัยธานี ตราด และจันทบุรี พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้จำนวน 21 ไอโซเลต (ตารางที่ 1)

2. การวัดการเจริญของแบคทีเรียและการวัดความเป็นกรด-ด่าง

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียคัดแยกจำนวน 21 ไอโซเลต ในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียคัดแยกทุกไอโซเลต สามารถเจริญได้ทั้ง2 สภาวะ โดยมีค่าความขุ่นมากกว่า 1.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเมื่อตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เกิดขึ้น พบว่า มีค่า pH ระหว่าง 3.77 – 4.47 เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่แยกได้จากลูกแป้ง

ที่	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของลูกแป้ง	จำนวนไอโซเลต	ไอโซเลต
ภาคเหนือ				
1	อ.แม่จัน จ.เชียงราย	สาโท	-	-
2	อ.เชียงของ จ.เชียงราย	สาโท	4	L010, L011, L012, L013
3	อ.เทิง จ.เชียงราย	สาโท	2	L015, L016
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ				
4	อ.เมือง จ.ยโสธร	ข้าวหมาก	6	L001, L002, L003, L004, L005, L006
5	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	สาโท	-	-
6	อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	ข้าวหมาก	-	-
7	อ.อุทุมพรพิสัย จ.ศรีสะเกษ	ข้าวหมาก	-	-
8	อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	สาโท	-	-
ภาคกลาง				
9	อ.เมือง จ.อุทัยธานี	ข้าวหมาก	1	L007
ภาคตะวันออก				
10	อ.เมือง จ.ตราด	ข้าวหมาก	2	L008, L009
11	อ.เมือง จ.จันทบุรี	ข้าวหมาก	1	L014
12	อ.เมือง จ.ตราด	สาโท	5	L017, L018, L019, L020, L021

ตารางที่ 2 การเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ความเป็นกรด-ด่าง ลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียคัดแยก

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				pH	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	การหมักน้ำตาลกลูโคส
	สภาวะมีออกซิเจน		สภาวะไม่มีออกซิเจน					
	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs				
L001	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	4.44	Rod	Gamma	Acid/gas -
L002	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.80	Rod	Gamma	Acid/gas -
L003	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.81	Rod	Gamma	Acid/gas -
L004	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.81	Rod	Gamma	Acid/gas -
L005	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	4.41	Rod	Gamma	Acid/gas -
L006	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.80	Rod	Gamma	Acid/gas -

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				pH	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	การหมักน้ำตาลกลูโคส
	สภาวะมีออกซิเจน		สภาวะไม่มีออกซิเจน					
	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs				
L007	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.77	Rod	Gamma	Acid/gas -
L008	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	4.45	Rod	Gamma	Acid/gas -
L009	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.77	Rod	Gamma	Acid/gas -
L010	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	4.11	Coccus	Gamma	Acid/gas -
L011	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.91	Coccus	Gamma	Acid/gas -
L012	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.91	Coccus	Gamma	Acid/gas -
L013	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	4.43	Coccus	Gamma	Acid/gas -
L014	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.77	Rod	Gamma	Acid/gas -
L015	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.78	Rod	Gamma	Acid/gas -
L016	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.85	Rod	Gamma	Acid/gas -
L017	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.94	Coccus	Gamma	Acid/gas -
L018	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.79	Coccus	Gamma	Acid/gas -
L019	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.88	Rod	Gamma	Acid/gas -
L020	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.91	Coccus	Gamma	Acid/gas -
L021	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	3.91	Coccus	Gamma	Acid/gas -

3. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

แบคทีเรียคัดแยกทุกไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีสีขาวครีม กลม (circular) นูน (convex) ขอบเรียบ (entire) มีขนาดของโคโลนีเฉลี่ย 1.0 × 1.0 มิลลิเมตร ติดสีแกรมบวก (Gram positive) ลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะกลม (coccus) จำนวน 8 ไอโซเลต และลักษณะแท่ง (rod) จำนวน 13 ไอโซเลต ทุกไอโซเลตไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสไม่เคลื่อนที่ ไม่สามารถย่อยแป้งและไขมัน และไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (gamma haemolysis) ทั้งนี้ทุกไอโซเลตสามารถสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่สร้างก๊าซ สามารถย่อยโปรตีนและเจริญได้ในอาหาร MRS broth ที่เติม NaCl ระหว่าง 0–8% (w/v) (ตารางที่ 2)

4. การศึกษาทางชีวโมเลกุลเพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรีย

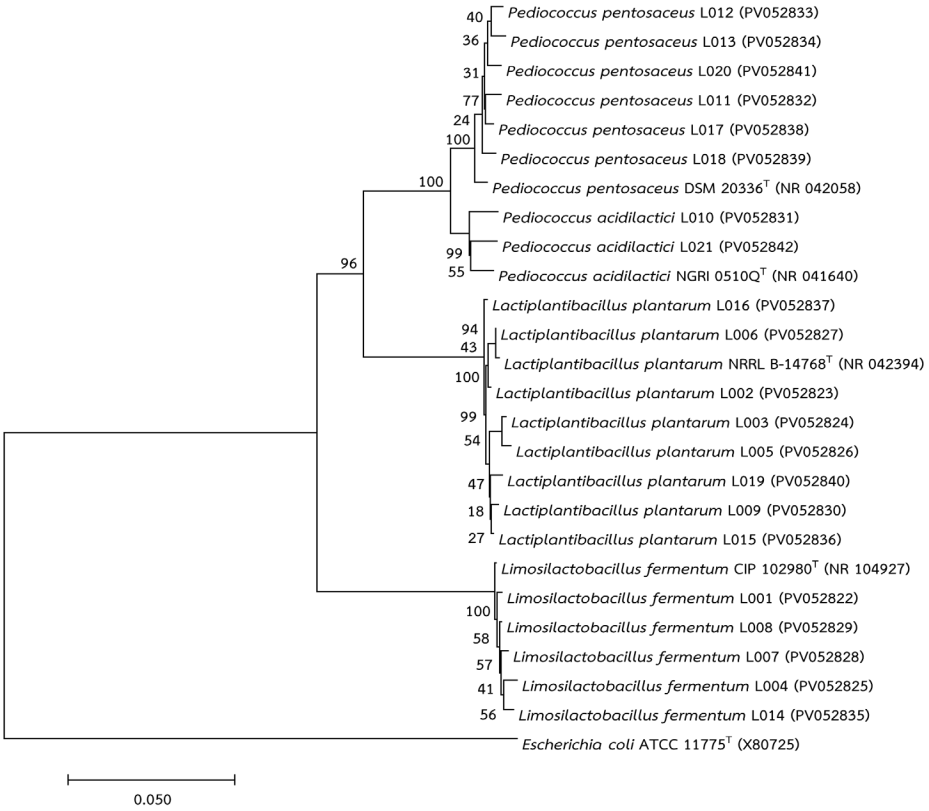
เมื่อนำแบคทีเรียคัดแยกแต่ละชนิดมาสกัดและเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ universal primer 27F และ 1492R ด้วยเทคนิค PCR นำลำดับเบสมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (BLAST) กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า แบคทีเรียคัดแยกจัดเป็น *Lactiplantibacillus plantarum* (8 ไอโซเลต), *Limosilactobacillus fermentum* (5 ไอโซเลต), *Pediococcus pentosaceus* (6 ไอโซเลต) และ *Pediococcus acidilactici* (2 ไอโซเลต) โดยมีความใกล้เคียงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 96.-99.56% (ตารางที่ 3) และจัดกลุ่มแบคทีเรีย โดย phylogenetic tree ด้วย neighbor-joining method (ภาพที่ 1)

5. การเตรียมกล้าเชื้อโพรไบโอติก

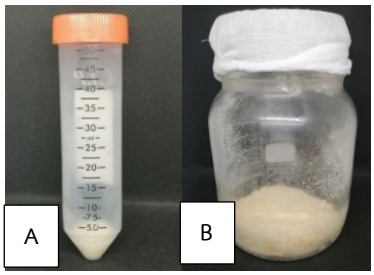
เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่คัดแยกได้และผ่านการระบุว่าเป็นสายพันธุ์โพรไบโอติก ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร (ฉบับที่ 2) ลงวันที่ 27 มิถุนายน พ.ศ. 2554 และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 346) พ.ศ. 2555 และแนบท้ายประกาศตามบัญชีหมายเลข2 รายชื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับใช้ในอาหารที่นอกเหนือจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแล้ว พบว่า *Lactiplantibacillus plantarum* (ชื่อเดิม *Lactobacillus plantarum*) มีความเหมาะสมต่อการนำมาผลิตกล้าเชื้อแบบสดและแบบแห้งด้วยเทคนิค lyophilization ทดสอบการรอดชีวิตพบว่า *L. plantarum* มีชีวิตรอด หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลามากกว่า 30 วัน โดยมีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 9.89 และ 5.23 log CFU/g ในวันที่ 0 และ 30 ของการเก็บรักษา และมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 52.88% (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบสกับฐานข้อมูล NCBI

ไอโซเลต	Closest species	Similarity	NCBI reference sequence number
L001	*Limosilactobacillus fermentum* strain RAMULAB37	96.66%	OL519513
L002	*Lactiplantibacillus plantarum* strain MYSAGKK2	99.15%	MZ414172
L003	*Lactiplantibacillus plantarum* strain MYSAGKK2	98.27%	MZ414172
L004	*Limosilactobacillus fermentum* strain RAMULAB45	97.70%	OM956396
L005	*Lactiplantibacillus plantarum* strain MYSAGKK2	98.17%	MZ414172
L006	*Lactiplantibacillus plantarum* strain PP4	98.76%	MF541073
L007	*Limosilactobacillus fermentum* strain RAMULAB44	98.30%	OM967174
L008	*Limosilactobacillus fermentum* strain MYSY8	96.71%	MZ414191
L009	*Lactiplantibacillus plantarum* strain MYSAGKK2	97.42%	MZ414172
L010	*Pediococcus acidilactici* strain MB38	98.24%	LC434019
L011	*Pediococcus pentosaceus* strain 7921	98.34%	MT464195
L012	*Pediococcus pentosaceus* strain MKMIA4	98.59%	MN104790
L013	*Pediococcus pentosaceus* strain E24-168	98.16%	KP189228
L014	*Limosilactobacillus fermentum* strain RAMULAB45	98.41%	OM956396
L015	*Lactiplantibacillus plantarum* strain LF3.1	99.08%	MZ208276
L016	*Lactiplantibacillus plantarum* strain LF3.1	98.99%	MZ208276
L017	*Pediococcus pentosaceus* strain KUH6	99.56%	MN463054
L018	*Pediococcus pentosaceus* strain KUH6	98.17%	MN463054
L019	*Lactiplantibacillus plantarum* strain MYSAGT4	97.48%	MZ424787
L020	*Pediococcus pentosaceus* strain YKMUE4	98.97%	MN104799
L021	*Pediococcus acidilactici* strain S2-24-L3a	97.61%	MG245818



ภาพที่ 1 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียคัดแยกจากลูกแป้ง



ภาพที่ 2 กล้าเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกแบบสด (A) และแบบแห้ง (B)

สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 21 ไอโซเลต ถูกคัดแยกจากลูกแป้งจำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจาก 7 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ เชียงราย ยโสธร มหาสารคาม ศรีสะเกษ อุทัยธานี ตราด และจันทบุรี แบคทีเรียที่แยกได้คือ *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* และ *Pediococcus acidilactici* โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถผลิตกรดได้ดี มีค่า pH อยู่ในช่วง 3.77-4.47 มีการหมักเป็นแบบ homofermentation และทนเกลือที่ความเข้มข้น 0–8% กล้าเชื้อโพรไบโอติกที่เตรียมจากแบคทีเรียคัดเลือกมีอัตราการรอดชีวิต 52.88% เมื่อเวลาผ่านไป 30 วันผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าลูกแป้งที่ใช้ในการผลิตสาโทและข้าวหมากอุดมไปด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งจะถูกนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อ จุลินทรีย์โพรไบโอติก เพื่อประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม และยา ต่อไปในอนาคต

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากลูกแป้งพบแบคทีเรียกรดแลกติก 4 ชนิด ได้แก่ *L. plantarum*, *Li. fermentum*, *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rakmai et al. (2019) และ Luangkhlaypho et al. (2014) ที่ทำการแยกเชื้อจากลูกแป้งเช่นและพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ รา (*Rhizopus* spp.), ยีสต์ (*Candida* spp., *Pichia* spp., *Saccharomycopsis* spp. และ *Torulaspora* spp.) และแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่ *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp. และ *Lactococcus* spp. เมื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรียคัดแยกทุกไอโซเลต พบว่าเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน และผลิตกรดได้ดี ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองของ Smetanková et al. (2012) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ *L. plantarum* ในสภาวะมีและไม่มีอากาศ พบว่า *L. plantarum* มีการเจริญและผลิตกรดสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีอากาศ นอกจากนี้ Qi et al. (2021) และ Prückler et al. (2015) พบว่า *L. plantarum* และ *Pediococcus* สามารถผลิตกรดอินทรีย์และอนินทรีย์ได้ เมื่อเตรียมกล้าเชื้อทั้งแบบสดและแบบแห้งด้วยเทคนิค lyophilization พบว่า *L. plantarum* มีชีวิตรอดหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลามากกว่า 30 วัน สอดคล้องกับการทดลองของ Cui et al. (2022) ที่พบว่า *L. plantarum* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยเทคนิค lyophilization มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 40% หลังจากเวลาผ่านไป 60 วัน การศึกษานี้สามารถเป็นต้นแบบในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพ เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม และยาต่อไปในอนาคต โดยขั้นตอนต่อจากนี้จะต้องทำการทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกเพิ่มเติมตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เช่น การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร การทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดี ความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง และฤทธิ์ของเอนไซม์ เป็นต้น ทั้งนี้ต้องมีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้กับแบคทีเรียมาตรฐาน เพื่อประเมินศักยภาพที่แท้จริงและคุณสมบัติเด่นของแบคทีเรียคัดแยก อนึ่ง ผลการวิจัยนี้สามารถนำไปวิจัยและพัฒนาต่อยอดในด้านความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกภายในบรรจุภัณฑ์ เช่น การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลซินไบโอติกในการผลิตโยเกิร์ต (Hongbo et al., 2020) เทคนิคการเก็บรักษาเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในสภาวะที่แตกต่างกัน และการศึกษาโอกาสในการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียคัดแยกเพื่อการใช้ประโยชน์ในภาคอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือจากสาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รวมถึงการให้คำปรึกษาทางวิชาการจากกรมการพัฒนาชุมชน กระทรวงมหาดไทย

เอกสารอ้างอิง

Cui, S., Hu, K., Qian, Z., Mao, B., Zhang, Q., Zhao, J., Tang, X., & Zhang, H. (2022). Improvement of freeze-dried survival of *Lactiplantibacillus plantarum* based on cell membrane regulation. *Microorganisms, 10*(10), 1985.

FAO/WHO. (2002). *Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (FAO/WHO) expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Retrieved from http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf

Irkin, R., & Kinik, O. (2017). Prevention of allergic diseases with probiotic lactic acid bacteria. *Food Science and Nutrition Technology, 2*(2), 1-5.

Li, H., Zhang, T., Li, C., Zheng, S., Li, H., & Yu, J. (2020). Development of a microencapsulated synbiotic product and its application in yoghurt. *LWT - Food Science and Technology, 122*(2020),109033.

Luangkhlaypho, A., Pattaragulwanit, K., Leepipatpiboon, N., & Yompakdee, C. (2014). Development of a defined starter culture mixture for the fermentation of sato, a Thai rice-based alcoholic beverage. *Science Asia*, *40*(2), 125-134.

Phan, Y. T. N., Tang, M. T., Tran, T. T. M., Nguyen, V. H., Nguyen, T. H., Tsuruta, T., & Nishino, N. (2017). Diversity of lactic acid bacteria in vegetable-based and meat-based fermented foods produced in the central region of Vietnam. *AIMS Microbiology, 3*(1), 61-70.

Prückler, M., Lorenz, C., Endo, A., Kraler, M., Dürrschmid, K., Hendriks, K., da Silva, F.S., Auterith, E., Kneifel, W., & Michlmayr, H. (2015). Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread. *Food Microbiology, 49*, 211-219.

Qi, Y., Huang, L., Zeng, Y., Li, W., Zhou, D., Xie, J., Xie, J., Tu, Q., Deng, D., & Yin, J. (2021). *Pediococcus pentosaceus*: screening and application as probiotics in food processing. *Frontiers in Microbiology, 12*, 762467.

Rakmai, J., Cheirsilp, B., & Srinuanpan, S. (2019). Designation of rice cake starters for fermented rice products with desired characteristics and fast fermentation. *Journal of Food Science and Technology, 56*, 3014-3022.

Rittiplang, J., Laopaiboon, P., Vichitpan, K., & Danvirutai, P. (2007). Lactic acid bacteria from indigeneous Loogpang samples of Northeastern Thailand and their lactic acid production ability. *Thai Journal for Biotechnology, 2007*, 44-48.

Roongrojmongkhon, N., Rungjindamai, N., Vatanavicharn, T., & Ochaikul, D. (2020). Isolation and identification of fungi with glucoamylase activity from Loog-pang-khao-mak (a Thai traditional fermentation starter), *Journal of Pure and Applied Microbiology, 14*(1), 233-246.

Rungsirivanich, P., Inta, A., Tragoolpua, Y., & Thongwai N. (2019). Partial *rpoB* gene sequencing identification and probiotic potential of *Floricoccus penangensis* ML061-4 isolated from Assam tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*). *Scientific Reports, 9*(1), 16561.

Rungsirivanich, P., Supandee, W., Futui, W., Chumsai-Na-Ayudhya, V., Yodsombat, C., & Thongwai, N. (2020). Culturable bacterial community on leaves of Assam tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) in Thailand and human probiotic potential of isolated *Bacillus* spp. *Microorganisms, 8*(10), 1585.

Smetanková, J., Hladíková, Z., Valach, F., Zimanová, M., Kohajdová, Z., Greif, G., & Greifová, M. (2012). Influence of aerobic and anaerobic conditions on the growth and metabolism of selected strains of *Lactobacillus plantarum*. *Acta Chimica Slovaca, 5*(2), 204-210.

Thongwai, N., Futui, W., Ladpala, N., Sirichai, B., Weechan, A., Kanklai, J., & Rungsirivanich, P. (2022). Characterization of bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter maltaceti* P285 isolated from contaminated honey wine. *Microorganisms, 10*(3), 528.