# บทที่ 1

# บทนำ

กุ้งกุลาดำจัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่นำรายได้เข้าประเทศสูงจนมีผู้หันมาสนใจเลี้ยงกุ้งเป็นจำนวนมาก และได้มีการพัฒนาระบบการเลี้ยงจากแบบธรรมชาติจนเป็นแบบพัฒนา (intensive) ซึ่งเป็นการเลี้ยงโดยปล่อยกุ้งค่อนข้างหนาแน่น ทำให้สภาพแวดล้อมในบ่อเสีย ทำให้มีผลต่อการเจริญของกุ้งโดยทำให้กุ้งมีภูมิคุ้มกันลดลง และเกิดการติดเชื้อได้ง่าย สุดท้ายทำให้ผลผลิตกุ้งลดลงเนื่องจากการระบาดของโรค โรคกุ้งที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจมี 2 กลุ่มใหญ่คือแบคทีเรียและไวรัส การแก้ปัญหาการเกิดโรคในกุ้งเนื่องมาจากแบคทีเรียที่ใช้กันแพร่หลายคือการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาตามมา คือเกิดการตกค้างของยาและสารเคมีในกุ้งทำให้เกิดปัญหาในการส่งออกกุ้งเนื่องจากไม่เป็นที่ยอมรับของประเทศผู้ซื้อ โดยเฉพาะประเทศในกลุ่ม EU นอกจากนี้การใช้ยาต่อเนื่องกันเป็นเวลานานทำให้เกิดการตกค้างของยาในน้ำและดิน ทำให้ดินเสื่อมโทรมไม่สามารถเลี้ยงกุ้งได้อีกและยังก่อให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคด้วย

จากภาวะการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ ปัจจุบันเกษตรกรได้หันเลี้ยงกุ้งขาวแทนเนื่องจากเลี้ยงง่ายและทนต่อโรคระบาด อย่างไรก็ตามกุ้งขาวมีราคาต่ำกว่ากุ้งกุลาดำ และเมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานหรือการจัดการบ่อไม่ดีก็อาจเกิดการติดเชื้อได้เช่นกัน โดยมีสาเหตุมาจากทั้งแบคทีเรีย และไวรัส เช่นเดียวกับกุ้งกุลาดำ (เอกอนันต์ ยุวเบญจพล) จากข้อมูลการสัมมนาในงานกุ้งไทยชี้ให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำยังเป็นที่ต้องการของตลาดและมีราคาดีกว่ากุ้งขาว แต่ปัจจุบันการผลิตกุ้งกุลาดำในประเทศไทยมีน้อยมาก ในขณะผลผลิตกุ้งขาวมีมากกว่าจนทำให้ราคาตกต่ำ ดังนั้นการหันกลับมาพัฒนากระบวนการผลิตกุ้งกุลาดำให้เป็นกุ้งปลอดสารเคมีหรือกุ้ง organic จึงน่าจะทำให้มูลค่าการส่งออกกุ้งไทยเพิ่มขึ้นและเป็นการลดปัญหาราคาตกต่ำของกุ้งขาว โดยเฉพาะในปัจจุบันกระแสการบริโภคอาหาร organic ซึ่งเป็นการผลิตอาหารที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมกำลังได้รับความนิยมและมีแนวโน้มที่ดีในการส่งออกกุ้ง หากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจะหันมาผลิตกุ้ง organic (จักรชินบุษย์ ชื่นอารมย์ 2550) ดังนั้นการหาสารชนิดอื่นที่มีความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมาทดแทนยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีอื่นๆ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการช่วยแก้ปัญหาการเกิดโรคในกุ้ง หนึ่งในแนวทางที่ถูกนำมาใช้คือการนำจุลินทรีย์โปรไบโอติก (probiotic) มาใช้กับกุ้ง อย่างไรก็ตามการใช้โปรไบโอติกยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนักเนื่องจากเกษตรกรต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายในการซื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก แทนสารเคมี และการใช้จุลินทรีย์จะได้ผลไม่รวดเร็วในการรักษาโรคเหมือนยาปฏิชีนะ ดังนั้นการพัฒนาการผลิตหัวเชื้อโปรไบโอติกที่มีราคาถูกหรือการหาสารยับยั้งที่ไม่เป็นพิษมาทดแทนยาปฏิชีวนะจึงน่าจะเป็นการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น คุณสมบัติประการหนึ่งของ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



โปรไบโอติกคือความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ โดยเป็นสารพวกโปรตีนที่เรียกว่าแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ดังนั้นการศึกษาการผลิตสารยับยั้งจากเชื้อเหล่านี้จึงน่าจะนำมาทดแทนยาปฏิชีวนะได้ โดยเฉพาะถ้าสามารถผลิตเชื้อโปรไบโอติกและสารยับยั้งได้ในราคาถูก อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการกระตุ้นให้เกษตรกรหันมาผลิตกุ้งที่ปลอดสารเคมีกันมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลดีการส่งออก และต่อสิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาวิจัยเบื้องต้น ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในกุ้งคือ *Vibrio harveyi* และ *Aeromonas hydrophila* จากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยพบว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* sp. นอกจากตัวเชื้อ *Bacillus* sp. จะสามารถนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกแล้ว สารยับยั้งที่ผลิตได้จากเชื้อยังน่าจะมีศักยภาพในการนำมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะได้ด้วย อย่างไรก็ตามการผลิตเชื้อแบคทีเรียและสารยับยั้งจาก *Bacillus* sp. ยังต้องใช้ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาแพง เช่นการใช้ tryptone แล soytone เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้น้ำตาล กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงเมื่อผลิตในปริมาณมาก ดังนั้นการนำของเหลือจากอุตสาหกรรมที่มีแหล่งไนโตรเจนหรือแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมมาเป็นวัตถุดิบในการผลิต จึงเป็นการลดต้นทุนการผลิตและเกษตรกรอาจนำหัวเชื้อที่ได้ไปเพาะ เลี้ยงเองโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือใช้อีกด้วย งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อทดลองนำของเหลือใช้หรือผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมมาผลิตหัวเชื้อและผลิตสารยับยั้งจากเชื้อ *Bacilllus* sp.

**ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิด การทบทวนเอกสาร**

การแก้ปัญหาโรคกุ้งโดยการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีเป็นวิธีที่ค่อนข้างได้ผลดีและเร็วในแง่การรักษา แต่ทำให้เกิดผลเสียรุนแรงตามมาหลายประการดังที่ได้กล่าวมาแล้ว การใช้แบคทีเรียในกลุ่มโปรไบโอติกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาทดแทนสารเหล่านี้ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเกิดการระบาดของโรค โปรไบโอติกจะไม่สามารถให้ผลได้รวดเร็วเหมือนการใช้ยาหรือสารเคมี สารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียก็อาจเป็นอีกทางเลือกในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ จากรายงานพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม Bacillus และ Lactobacillus สามารถสร้างยับยั้งพวกแบคเทอริโอซิน ซึ่งจัดเป็นพวกเปปไทด์ขนาดเล็ก ถูกสังเคราะห์โดยขบวนการเช่นเดียวกับโปรตีนและมีความปลอดภัย ส่วนมากพบเป็นสารพวกที่สร้างพร้อมๆกับการเจริญ (primary metabolites) ไนซิน (Nisin) เป็นสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactococcus lactis* และได้รับการยอมรับจาก Food and Drug Administration (FDA) ว่าปลอดภัยและอนุญาตให้นำมาใช้เป็นสารถนอมอาหาร ในรูปของไนซินบริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังมีแบคทีริโอซินอื่นๆที่เชื้อกลุ่มแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นและนำมาประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารเช่น Pediocin, Lactocin, LeucocinA และ Enterocin 4 เป็นต้น (Cleveland et al., 2001)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
รับที่ 16 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน 244874
เลขเรียกหนังสือ

*Bacillus* sp. BK9 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งและสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งและเชื้อก่อโรคในอาหารได้ ในห้องปฏิบัติการเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 สามารถเจริญและผลิตสารยับยั้งได้ดีในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญคือแหล่งไนโตรเจนได้แก่ tryptone และ soytone แหล่งคาร์บอนได้แก่ น้ำตาล กลูโคส จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า ของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมหลายชนิดซึ่งมีโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ สามารถนำมาใช้ทดแทนแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่มีราคาแพงได้ ในอุตสาหกรรมการผลิตเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช พบว่าราคาของวัฏุดิบที่ใช้ในการผลิตคิดเป็น 35 – 59% ของต้นทุนการผลิต โดยอาหารที่ใช้เป็นอาหารสังเคราะห์ ที่มีการใช้ yeast extract, peptone และ กลูโคส ซึ่งมีราคาแพง (Chang et al., 2008) ดังนั้นการเลือกแหล่งวัตถุดิบที่มีองค์ประกอบของไนโตรเจนและคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งจากเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตหัวเชื้อและการผลิตสารยับยั้ง

ในประเทศไทยมีอุตสาหกรรมหลายชนิดที่สามารถนำผลพลอยได้หรือของเหลือทิ้งมาใช้ในการผลิต เช่น เวย์ ซึ่งเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง (cheese) ซึ่งในเวย์จะมีน้ำตาล lactose สูงประมาณ 5% และมีสารประกอบไนโตรเจน 0.9% แร่ธาตุและวิตามิน 0.6% ไขมัน 0.3% (Tango and Ghaly, 1999) ดังนั้นในการนำมาใช้ประโยชน์อาจต้องมีการเสริมแหล่งโปรตีนให้เหมาะสมก่อน ได้มีการศึกษานำเวย์มาใช้ในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อยีสต์ (Mansour *et al.*, 1993) โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก (Tango and Ghaly, 1999) และใช้ในการผลิตสารแบคเทอริโอซินจาก *Bacillus licheniformis* strain P40 (Cladera-Olivera et al., 2004) อย่างไรก็ตามเมื่อทดลองผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Bacillus* sp. strain P43 พบว่าเชื้อมีการเจริญได้ดีแต่ไม่พบการสร้างสารแบคเทอริโอซิน (Motta et al., 2008) แสดงให้เห็นว่าเชื้อต่างสายพันธุ์กันมีความต้องการสารอาหารในการผลิตสารยับยั้งต่างกันและอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญอาจไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง

กากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันถั่วเหลืองและจากเมล็ดถั่วเหลืองที่นำมาเป็นเครื่องดื่ม ซึ่งมีหลายชนิดแล้วแต่ผลิตภัณฑ์ เช่น กากถั่วเหลืองที่ได้จากการสกัดน้ำมัน (soybean meal) จากการทำแป้งถั่วเหลือง (soybean meal feed) จากการผลิตน้ำเต้าหู้ (ground soybean) เป็นต้น กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันด้วยสารละลายอินทรีย์ เป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพสูงและมีกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิด กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันจะมีโปรตีนเฉลี่ย 44 – 48 % กากถั่วเหลืองอีกชนิดที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตเต้าหู้และน้ำนมถั่วเหลืองยังคงมีโปรตีนและสารอาหารอื่นเหลืออยู่ซึ่งอาจแปรไปตามกระบวนการแยกน้ำถั่วเหลือง มีรายงานการนำกากถั่วเหลืองมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ Bacillus เช่น *Bacillus horikoshii* (Joo *et al.*, 2002), *Bacillus clausii*

(Kumar et al., 2004), *Bacillus* sp. (Saran et al., 2007) และ *Bacillus cereus* MCM B-326 (Nilegaonkar et al., 2007) โดยใช้แหล่งคาร์บอนจากแป้ง นอกจากนี้กากถั่วเหลืองยังถูกนำมาใช้ในการผลิต acetoin จาก *Bacillus subtilis* โดยการหมักร่วมกับกากน้ำตาล (Xiao et al., 2007)

แหล่งไนโตรเจนอีกชนิดที่เป็นผลพลอยได้จากโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋องได้แก่น้ำที่ได้จากการนึ่งปลาทูน่า (fish condensate) ที่มีโปรตีนประมาณ 6.0% และเมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสและทำให้เข้มข้นจะได้ส่วนที่เรียกว่า fish hydrolysate มีปริมาณโปรตีนสูงถึง 60% (ข้อมูลจากบริษัทไทยรวมสินพัฒนา จำกัด) ในส่วนของ fish hydrolysate นี้น่าจะสามารถนำมาทดแทนแหล่งไนโตรเจนในการเจริญ และผลิตสารยับยั้งจาก *Bacillus* sp. BK9 ได้ ได้มีการทดลองใช้น้ำจากการนึ่งปลานี้ในการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก *Lactobcaillus casei* พบว่าสามารถผลิตสารยับยั้งได้ แต่ผลิตได้ช้ากว่าในอาหาร MRS (Chan-udom *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามมีรายงานการผลิตสารคล้ายแบคเทอริโอซิน (bacteriocin-like compound) จากเชื้อ *Bacillus* sp. strain P34 โดยใช้ปลาป่น (fish meal) พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้แต่ไม่พบการผลิตสารยับยั้ง (Motta et al., 2008)

นอกจากแหล่งไนโตรเจนแล้ว ของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมที่นำมาใช้ทดแทนแหล่งคาร์บอน เช่น กากน้ำตาล (molasses) ซึ่งจะมีน้ำตาล sucrose เป็นองค์ประกอบหลัก ในการผลิตสาร acetoin จาก *Bacillus subtilis* CICC 10025 พบว่าการใช้กากน้ำตาลให้ผลดีกว่าการใช้น้ำตาล sucrose บริสุทธิ์ (Xiao et al., 2007) มีรายงานการใช้กากน้ำตาลในการผลิตสปอร์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* (ไวรุจน์ เดชมหิทกุล และคณะ, 2550) และการผลิตสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลคติกโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อเจริญได้ดีแต่สร้างสารยับยั้งได้น้อย (Todorov and Dicks, 2005) อาจเนื่องมาจากกากน้ำตาลมีสารปนเปื้อนหลายชนิดที่อาจมีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ

ของเสียจากโรงงานที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาใช้ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามเชื้อที่สามารถใช้แป้งได้จะต้องสามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยแป้งเป็นน้ำตาล เช่นเชื้อ *Bacillus cereus* MTCC1305 (Thanantong et al., 2006) และ *Bacillus licheniformis* (Ikram ul et al., 2005) ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* ในอาหารที่เป็นของเสียจากโรงงานแป้งมันฝรั่ง (sweet potato) พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิต $\delta$ - endotoxin ได้สูงกว่าอาหารที่ใช้ในการผลิตในอุตสาหกรรมซึ่งใช้กากถั่วเหลืองเป็นหลัก (Chang et al., 2008) จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 สามารถย่อยแป้งได้ ดังนั้นแป้งจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่น่าจะสามารถทดแทนน้ำตาลกลูโคสในการผลิตสารยับยั้งจากเชื้อนี้ได้

นอกจากแหล่งอาหารแล้ว ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญและผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียได้แก่ อุณหภูมิ และ pH เช่น *Bacillus* sp. strain P34 ผลิตสารคล้ายแบคเทอริโอซินได้ดีที่สุดที่ pH เริ่มต้น

ระหว่าง 6.0 – 8.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 25 – 37 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งไม่มีความสัมพันธ์กัน (Motta et al., 2008) ในขณะที่เชื้อ *Bacillus cereus* 8A มี pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน cerein 8A ระหว่าง 6.5 – 9.0 และอุณหภูมิเหมาะสมที่ 22 – 34 องศาเซลเซียส (Dominguez et al., 2007)

## วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

1. ศึกษาชนิดของวัสดุเหลือทิ้งหรือผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค
2. ศึกษาการแปรผันปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนของวัสดุเหลือทิ้งหรือผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมที่จะมาใช้ในการผลิตเชื้อและสารยับยั้งจากเชื้อ *Bacillus* sp. BK9
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้ง ได้แก่ pH อุณหภูมิ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น อัตราการเขย่าในระดับฟลาสก์ และในระดับถังหมัก

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สูตรอาหารที่สามารถนำมาผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่อาจพัฒนาให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งสามารถผลิตเองได้ในราคาถูก และนอกจากนี้สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งที่แบคทีเรียโปรไบโอติกผลิตขึ้นและปล่อยออกมานอกเซลล์ซึ่งอาจนำมาทำให้บริสุทธิ์และนำมาทดแทนยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ และยังมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ผลงานที่ได้จะนำไปเผยแพร่และตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่อไป