

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของวัสดุเหลือทิ้ง

เนื่องจากการเจริญและการผลิตสารของจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารหลักคือแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลที่มีในวัสดุเหลือทิ้งที่จะใช้นำมาเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อ ตารางที่ 1 แสดงผลจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของวัสดุเหลือทิ้ง ได้แก่ น้ำต้มกากถั่วเหลือง (50 กรัมต่อลิตร) น้ำนึ่งปลาทูน่าแช่แข็ง เว้ย กากน้ำตาล น้ำล้างข้าวรอบที่ 1 และรอบที่ 2 และอาหาร TSB

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของวัสดุเหลือทิ้ง

ตัวอย่างวัสดุเหลือทิ้ง	โปรตีน (%)	น้ำตาลทั้งหมด (%)
น้ำต้มกากถั่วเหลือง (50 กรัมต่อลิตร)	0.72 ± 0.013	0.59 ± 0.041
น้ำนึ่งปลาทูน่า	54.64 ± 0.911	1.44 ± 0.39
เว้ย	0.47 ± 0.033	6.01 ± 0.23
กากน้ำตาล	4.49 ± 0.110	56.33 ± 2.62
น้ำล้างข้าวรอบที่ 1	0.033 ± 0.011	0.028 ± 0.001
น้ำล้างข้าวรอบที่ 2	0.015 ± 0.006	0.01 ± 0.00
TSB	2.06 ± 0.025	0.23 ± 0.05

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของวัสดุเหลือทิ้งเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนในอาหาร TSB ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่มีรายงานการใช้เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. เพื่อผลิตสารยับยั้งได้ดี (Motta และ Brandelli, 2008) พบว่าน้ำต้มกากถั่วเหลือง 50 กรัมต่อลิตร เว้ย น้ำล้างข้าวจากโรงงานผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยว (รอบที่ 1 และรอบที่ 2) มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าอาหาร TSB ส่วนน้ำนึ่งปลาทูน่าและกากน้ำตาลมีปริมาณโปรตีนมากกว่าอาหาร TSB

กากถั่วเหลืองที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งจัดเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพสูงและมีกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิด กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันจะมี

โปรตีนเฉลี่ย 44 – 48 % (w/w) อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ได้ทำการหาปริมาณโปรตีนจากน้ำคั้นกากถั่วเหลืองปริมาณ 50 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร และคั้นเป็นเวลา 10 นาที จึงทำให้ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้มีค่าเทียบเท่ากับ 14.4 % (w/w) ซึ่งต่ำกว่าที่มีรายงาน ในการทดลองนี้ใช้น้ำคั้นกากถั่วเหลืองในการหมักแทนการใช้กากถั่วเหลืองโดยตรงเนื่องจากต้องการติดตามการเจริญของเชื้อโดยการนับจำนวนเซลล์ ซึ่งในการหมักโดยใช้กากถั่วเหลืองโดยตรงจะไม่สามารถติดตามการเจริญโดยการนับจำนวนเซลล์ได้เช่นเดียวกับการใช้วัสดุเหลือทิ้งอื่นๆ เนื่องจากลักษณะของกากที่จะเป็นตะกอนและไม่สามารถทำให้เชื้อกระจายตัวได้อย่างสม่ำเสมอ ส่งผลให้การนับจำนวนเซลล์ไม่เป็นไปตามความเป็นจริง อย่างไรก็ตามในการหมักจริงอาจใช้กากถั่วเหลืองโดยตรงแต่ต้องมีการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสารยับยั้งก่อนนำไปใช้งานจริง ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่ามีค่าสูงกว่าในอาหาร TSB จึง น่าจะเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ

น้ำนึ่งปลาหูช้างซึ่งเป็นผลพลอยได้โรงงานผลิตปลาหูช้างกระป๋องที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและผ่านการทำให้เข้มข้นจึงมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 54.64 % ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่ต้องมีการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (1.44 %) ถึงแม้จะมีปริมาณสูงกว่าในอาหาร TSB (0.25 %) แต่เมื่อเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมแล้วอาจมีเหลืออยู่น้อยมาก

เวย์ ซึ่งเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง (cheese) ซึ่งจะพบมีน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าในอาหาร TSB คือ 6.01 % แต่มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าที่ 0.47% Tango and Ghaly (1999) รายงานว่าในเวย์จะมีน้ำตาล lactose สูงประมาณ 5% และมีสารประกอบไนโตรเจน 0.9% แร่ธาตุและวิตามิน 0.6% ไขมัน 0.3% ถึงแม้จะมีปริมาณโปรตีนต่ำ แต่ได้มีรายงานการนำเวย์มาใช้ในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อยีสต์ (Mansour *et al.*, 1993) และแบคทีเรียแลคติก (Tango and Ghaly, 1999) นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการผลิตสารแบคทีเรียโอซินจาก *Bacillus licheniformis* strain P40 (Cladera-Olivera *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามเมื่อทดลองผลิตแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Bacillus* sp. strain P43 พบว่าเชื้อมีการเจริญได้ดีแต่ไม่พบการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน (Motta *et al.*, 2008) แสดงให้เห็นว่าเชื้อต่างสายพันธุ์กันมีความต้องการสารอาหารในการเจริญและผลิตสารต่างกัน

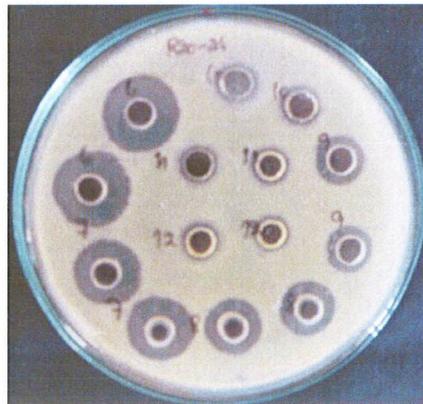
กากน้ำตาล (molasses) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาลจะมีน้ำตาล sucrose เป็นองค์ประกอบหลัก จากการวิเคราะห์พบว่ามีน้ำตาลทั้งหมดสูงถึง 56.33 % จึงสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนสูงเมื่อเทียบกับอาหาร TSB

น้ำล้างข้าวจากโรงงานผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยวในการล้างข้าวทั้ง 2 รอบ แทบจะไม่มีโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่เลย อย่างไรก็ตามในการคัดเลือกชนิดของวัสดุเหลือทิ้งที่เหมาะสมเบื้องต้นจะนำน้ำล้าง

ข้าวทั้งสองรอบมาคัดเลือกว่า เนื่องจากยังไม่ทราบความต้องการแหล่งอาหารขั้นต่ำของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่จะนำมาใช้ในการทดสอบ วัสดุเหลือทิ้งอื่นๆที่มีโปรตีนสูงได้แก่น้ำนึ่งปลาทונהจะปรับให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับในอาหาร TSB คือ 2.0% ส่วนเวย์และกากน้ำตาลซึ่งมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูง จะทำการเจือจางให้มีปริมาณน้ำตาลใกล้เคียงกับอาหาร TSB คือ 0.23% ก่อนนำมาใช้ในการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 เพื่อคัดเลือกชนิดของวัสดุเหลือทิ้งที่เหมาะสม

3.2 ผลการทดสอบการผลิตสารยับยั้งจากเชื้อ *Bacillus* sp. BK9

จากการทดสอบการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 7 ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำส่วนใสมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบได้แก่ *Bacillus megaterium* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไวต่อการยับยั้งมากกว่า *Vibrio harveyi* และ *Aeromonas hydrophila* จึงนำมาใช้เป็นเชื้อทดสอบ พบการสร้างสารยับยั้งเกิดเป็นโซนการยับยั้งรอบหลุมที่มีการเติมสารยับยั้งลงไป ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงลักษณะการเกิดโซนยับยั้งของน้ำหมักจากเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ต่อเชื้อทดสอบ *Bacillus megaterium*

3.3 ผลการคัดเลือกวัสดุเหลือทิ้งที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้ง

จากผลการวิเคราะห์หองค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งในตารางที่ 1 ได้ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัสดุเหลือทิ้งต่างๆโดยแบ่งอาหารเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีปริมาณโปรตีนสูงได้แก่น้ำนึ่งปลาทונה

กลุ่มที่มีน้ำตาลสูง ได้แก่ กากน้ำตาลและเวย์ ส่วนกลุ่มที่ 3 มีทั้งปริมาณ โปรตีนและน้ำตาลต่ำ ได้แก่ น้ำดื่มกากถั่วเหลือง น้ำล้างข้าวครั้งที่ 1 และ 2 ในการเตรียมอาหารสำหรับทำการหมักโดยในกลุ่มที่มีโปรตีนสูงทำการปรับให้มีปริมาณโปรตีนเทียบเท่ากับในอาหาร TSB คือ 2.0% โดยไม่ปรับปริมาณน้ำตาล ส่วนในกลุ่มน้ำตาลสูงปรับให้มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับในอาหาร TSB คือ 0.23% โดยไม่ปรับปริมาณโปรตีน การที่ไม่ปรับปริมาณน้ำตาลและโปรตีนในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ เนื่องจากถ้ามีการเติมน้ำตาลหรือ โปรตีนเพิ่มโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งอื่นๆ จะทำให้มีผลต่อปริมาณ โปรตีนและน้ำตาลที่ต้องการควบคุมให้เท่ากับอาหาร TSB ส่วนวัสดุเหลือทิ้งในกลุ่มที่ 3 จะไม่มีการปรับความเข้มข้นหรือเติมสารอาหารใดๆ

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลหลังจากที่ทำการปรับปริมาตรแหล่งอาหารแล้ว ได้ผลดังตารางที่ 2 พบว่า น้ำนึ่งปลาทูน่ามีโปรตีนน้อยกว่าที่ต้องการ คือ 2.0 % แต่พบเพียง 1.48% และปริมาณน้ำตาล 0.24% ซึ่งใกล้เคียงกับ TSB ส่วนเวย์เจือจาง กากน้ำตาลและน้ำล้างข้าวรอบที่ 1 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกับในอาหาร TSB แต่จะมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า 2.0% โดยเฉพาะในเวย์เจือจางไม่พบโปรตีนหลังเจือจาง และเมื่อนำสูตรอาหารในตารางที่ 2 มาทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 และติดตามการเจริญโดยการนับจำนวนเซลล์ การสร้างสารยับยั้ง และ pH ของน้ำหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการติดตามการเจริญ (รูปที่ 2) พบว่า เมื่อทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase แล้วในอาหารทั้ง 6 ชนิด คืออาหาร TSB น้ำดื่มกากถั่วเหลือง น้ำล้างข้าวทั้งรอบ 1 และ 2 เวย์เจือจาง และน้ำนึ่งปลาทูน่า โดยน้ำล้างข้าวรอบ 1 มีการเจริญต่ำสุด และอาหารที่เชื้อเจริญได้ดีที่สุดคือในอาหารน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำดื่มกากถั่วเหลือง โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 9.40 ± 0.04 และ 9.13 ± 0.10 log CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาได้แก่อาหาร TSB น้ำล้างข้าวทั้งรอบ 2 และเวย์เจือจาง ซึ่งมีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกันคือ 8.54 ± 0.11 8.57 ± 0.13 และ 8.53 ± 0.12 ตามลำดับ ส่วนในอาหารอีก 3 ชนิด ได้แก่ น้ำล้างข้าวทั้งรอบ 1 กากน้ำตาลและเวย์ไม่เจือจาง เชื้อเจริญได้น้อยกว่ากลุ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 3)

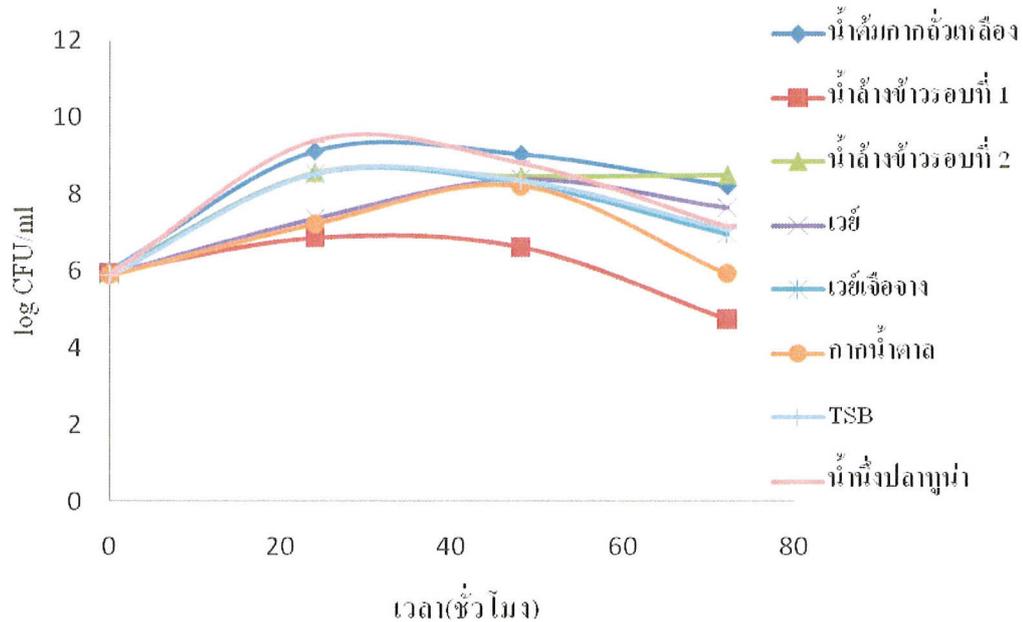
จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าองค์ประกอบของโปรตีนและน้ำตาลในอาหารที่เชื้อเจริญได้ดีคือน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำดื่มกากถั่วเหลือง พบว่าน้ำนึ่งปลาทูน่ามีปริมาณน้ำตาลเท่ากับในอาหาร TSB (0.23%) แต่มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า (1.48%) ส่วนในอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลืองมีปริมาณน้ำตาลมากกว่าในอาหาร TSB (0.76%) แต่มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าเช่นกันคือ 0.715% นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่เชื้อมีการเจริญเท่ากับในอาหาร TSB ได้แก่ น้ำล้างข้าวทั้งรอบ 2 และเวย์เจือจาง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและโปรตีนน้อยกว่าในอาหาร TSB มาก โดยเฉพาะในเวย์เจือจางมีปริมาณโปรตีนน้อยมากจนวิเคราะห์ไม่พบ แสดงว่าเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ต้องการแหล่งคาร์บอนและโปรตีนน้อยมากในการเจริญและน้อย

กว่าในอาหาร TSB อย่างไรก็ตามวัสดุเหลือทิ้งที่ใช้แตกต่างกันอาจมีองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนชนิดของน้ำตาลหรือแร่ธาตุอื่นๆ ที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้เชื่อมีการเจริญที่แตกต่างกันถึงแม้จะมีแหล่งอาหารในปริมาณใกล้เคียงกัน

จากผลการทดลองจะเห็นว่าเวย์ไม่เจือจางมีการเจริญของเชื้อน้อยกว่าเวย์เจือจาง อาจเนื่องมาจากสารอาหารที่เข้มข้นมากเกินไปโดยเฉพาะปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ถึง 6.01% ซึ่งมากกว่า TSB ประมาณ 30 เท่า ส่วนน้ำล้างข้าวรอบ 1 มีการเจริญของเชื้อค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับน้ำล้างข้าวรอบ 2 แม้ว่าจะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและโปรตีนสูงกว่า ซึ่งอาจเนื่องมาจากในข้าวสารที่นำมาใช้อาจมีการปนเปื้อนของสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันแมลงหรือเชื้อรา เมื่อนำมาล้างครั้งที่ 2 จึงอาจเจือจางสารพิษลง จากผลการทดลองสรุปได้ว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ได้แก่ น้ำนิ่งปลาทูน่าและน้ำต้มกากถั่วเหลือง โดยเจริญดีกว่าในอาหาร TSB และอาหารที่เตรียมจากน้ำล้างข้าวรอบที่ 2 และเวย์เจือจาง เชื้อสามารถเจริญได้ดีเทียบเท่ากับอาหาร TSB

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณ โปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัสดุเหลือทิ้งต่างๆ หลังจากปรับความเข้มข้นของ โปรตีนหรือน้ำตาลให้เทียบเท่ากับในอาหาร TSB

ตัวอย่าง	โปรตีน (%)	น้ำตาลทั้งหมด (%)
น้ำต้มกากถั่วเหลือง (50 กรัมต่อลิตร)	0.72 ± 0.013	0.76 ± 0.020
น้ำนิ่งปลาทูน่าเจือจางปริมาณโปรตีนเทียบเท่ากับ TSB	1.48 ± 0.139	0.24 ± 0.023
เวย์	0.47 ± 0.033	6.01 ± 0.230
เวย์เจือจาง	0	0.17 ± 0.007
กากน้ำตาลเจือจางปริมาณน้ำตาลเทียบเท่ากับ TSB	0.05 ± 0.013	0.20 ± 0
น้ำล้างข้าวรอบที่ 1	0.03 ± 0.011	0.28 ± 0.010
น้ำล้างข้าวรอบที่ 2	0.02 ± 0.006	0.09 ± 0
TSB	2.06 ± 0.025	0.23 ± 0.050



รูปที่ 2 แสดงการเจริญของเชื้อ *Bacillus sp. BK9* เมื่อบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัสดุเหลือทิ้งต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที

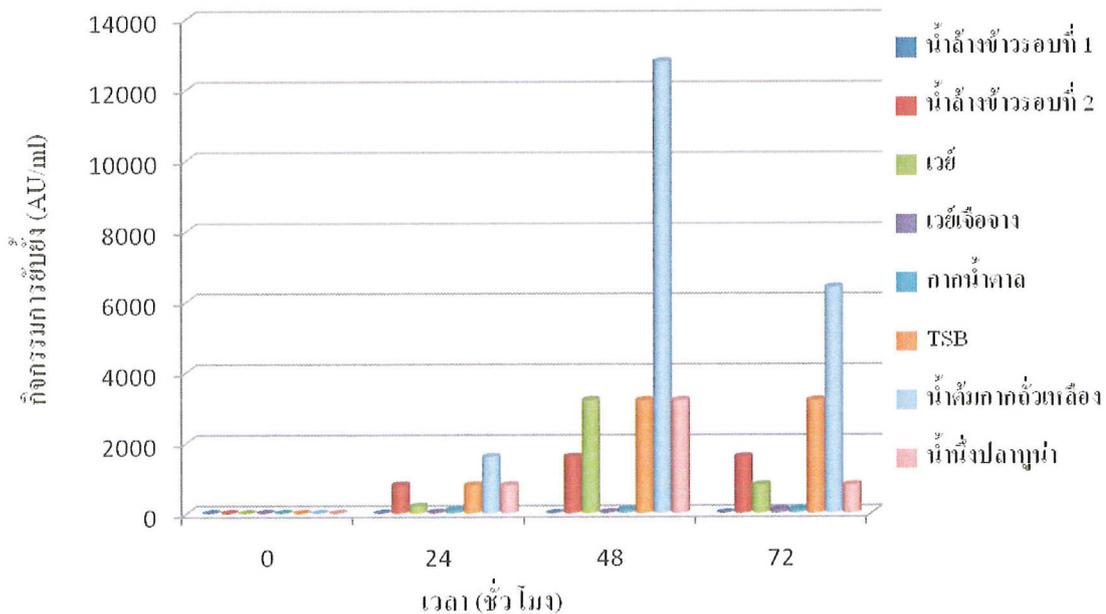
ตารางที่ 3 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างอาหารวัสดุเหลือทิ้ง 8 ชนิดต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus sp. BK9* ที่เวลา 24 ชั่วโมง

อาหารจากวัสดุเหลือทิ้ง	จำนวนเซลล์ (log CFU/ml)
น้ำนึ่งปลาทูน่าเจี๊อง	9.40 ^a
น้ำดื่มกาคั่วเหลือง (50 กรัมต่อลิตร)	9.13 ^b
น้ำล้างข้าวรอบที่ 2	8.57 ^c
TSB	8.54 ^c
เวย์เจี๊อง	8.53 ^c
เวย์	7.37 ^d
กากน้ำตาลเจี๊อง	7.23 ^d
น้ำล้างข้าวรอบที่ 1	6.87 ^c

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 ในอาหารวัสดุเหลือทิ้งต่างๆ ในตารางที่ 2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3 ที่เวลา 24 ชั่วโมง เริ่มมีการสร้างสารยับยั้ง โดยน้ำต้มกากถั่วเหลืองมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 1,600 AU/ml ซึ่งสูงกว่า TSB ส่วนน้ำล้างข้าวรอบที่ 2 และน้ำนึ่งปลาทუნามีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ TSB โดยมีค่าเท่ากับ 800 AU/ml ส่วนเวย์เจียว และกากน้ำตาลพบกิจกรรมการยับยั้งเล็กน้อย และน้ำล้างข้าวรอบที่ 1 ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้น พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง สารยับยั้งที่ผลิตในอาหารทุกชนิดมีกิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นและสูงที่สุดในทุกๆอาหาร โดยน้ำต้มกากถั่วเหลืองมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 12,800 AU/ml รองลงมาได้แก่ เวย์ นํ้านึ่งปลาทუნ่า และ TSB ซึ่งมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากันเท่ากับ 3,200 AU/ml น้ำล้างข้าวรอบที่ 2 จะมีกิจกรรมการยับยั้งต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทั้ง 4 ชนิดข้างต้น ส่วนน้ำล้างข้าวรอบที่ 1 เวย์เจียว และกากน้ำตาลพบกิจกรรมการยับยั้งเล็กน้อย โดยสารยับยั้งที่ผลิตในอาหารทุกชนิดจะมีกิจกรรมการยับยั้งลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง ยกเว้นน้ำล้างข้าวรอบที่ 2 และ TSB ซึ่งยังมีกิจกรรมการยับยั้งคงที่ การลดลงของสารยับยั้งเมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นอาจมีผลมาจากการที่สารยับยั้งซึ่งเป็น โปรตีนถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรติเอสภายในเซลล์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดการแตกของเซลล์เมื่อเซลล์ตายหลัง stationary phase โดยจากกราฟการเจริญจะเห็นว่าจำนวนเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีรายงานการลดลงของสารยับยั้งเกิดจากการเกาะยึดของสารยับยั้งที่ผนังเซลล์ของเชื้อที่ผลิตสารยับยั้งเอง ทำให้วิเคราะห์ไม่พบสารยับยั้งในส่วนน้ำหมัก (De Vuyst et al., 1996; Bogovic Matijasic et al., 2001)

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญ และการสร้างสารยับยั้งพบว่า ในอาหารที่เชื้อเจริญได้ดีที่สุดเท่ากัน 2 ชนิดคืออาหารน้ำนึ่งปลาทუნ่าและอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง แต่เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งพบว่าน้ำต้มกากถั่วเหลืองมีการสร้างสารยับยั้งได้สูงกว่าน้ำนึ่งปลาทუნ่า โดยสามารถสร้างสารยับยั้งได้เท่ากับในอาหาร TSB แม้ว่าจะเจริญได้ดีกว่า ส่วนในอาหารน้ำล้างข้าวรอบที่ 2 และเวย์เจียวซึ่งมีการเจริญเท่ากับในอาหาร TSB พบว่าสร้างสารยับยั้งได้น้อยกว่าในอาหาร TSB โดยเฉพาะในอาหารเวย์เจียวแทบไม่พบการสร้างสารยับยั้งเลย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในอาหารทั้งสองมีสารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญ (ตารางที่ 2) แต่ไม่เพียงพอต่อการนำสารอาหารมาใช้ในการสร้างสารยับยั้ง ดังจะเห็นได้จากผลการสร้างสารยับยั้งในเวย์ไม่เจียวซึ่งมีการเจริญน้อยกว่าในเวย์เจียว และในอาหาร TSB กลับพบว่าสามารถสร้างสารยับยั้งได้เท่ากับในอาหาร TSB



รูปที่ 3 แสดงกิจกรรมของสารยับยั้งจากเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 ที่บ่มในอาหารจากวัสดุเหลือทิ้งต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 200 รอบต่อนาที

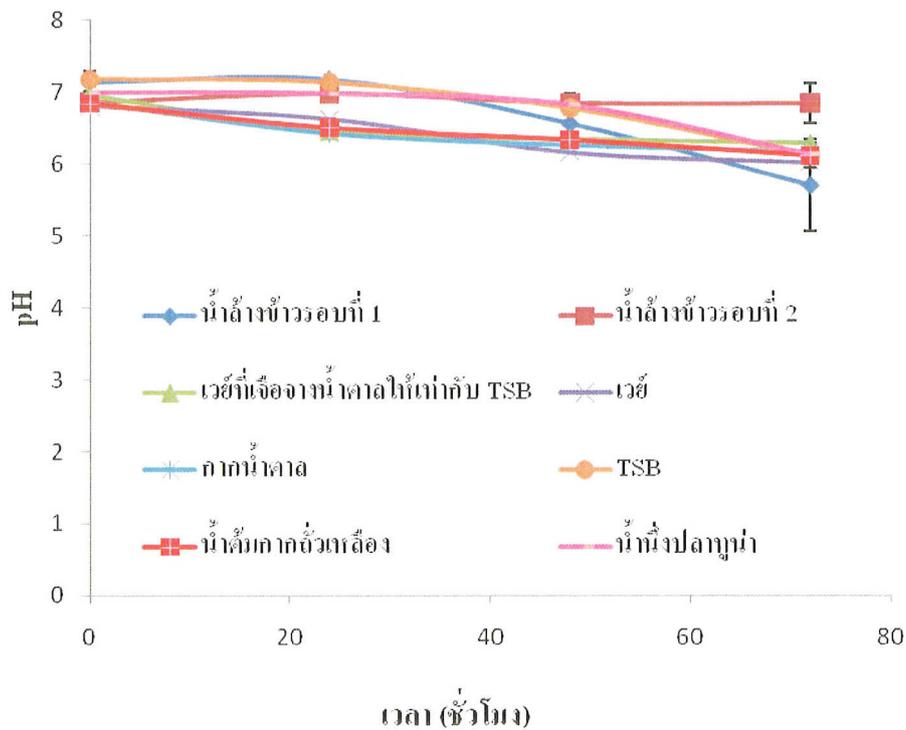
จากการทดลองจะเห็นว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญอาจไม่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้ง อย่างไรก็ตามพบว่า น้ำต้มกากถั่วเหลืองเป็นอาหารที่เหมาะสมทั้งการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 โดยในอาหารมีปริมาณโปรตีน 0.72 % ซึ่งน้อยกว่าในอาหาร TSB (2.0%) ซึ่งโปรตีนจากน้ำต้มกากถั่วเหลืองอาจเหมาะต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อนี้ จากปริมาณโปรตีนเพียง 0.72% ในน้ำต้มกากถั่วเหลือง และเพียง 0.48 % ในอาหารเวย์ (โปรตีนเคซีน) ไม่เจือจางซึ่งสร้างยับยั้งได้เท่ากับอาหาร TSB แสดงว่าปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการเจริญและการสร้างสารยับยั้งอาจไม่ต้องสูงถึง 2.0% เท่ากับในอาหาร TSB แต่ก็อาจขึ้นกับชนิดของแหล่งโปรตีนด้วย โดยแหล่งของโปรตีนในอาหาร TSB หลักๆ มาจากเคซีน (1.7%) และจากถั่วเหลือง (Soytone, 0.3 %) ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำต้มกากถั่วเหลืองพบมีค่าเท่ากับ 0.76% ซึ่งสูงกว่าในอาหาร TSB ที่มีเพียง 0.23% ในกากถั่วเหลืองพบมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักๆ คือ กาแลคโทส (28.1%), กลูโคส (27.8%), อาราบิโนส (13.3%) และกรดซูโครส (17.6%) โดยอาจอยู่ในรูปไม่ละลายน้ำหรือโพลีแซคคาไรด์ (Ouhida et al., 2002) ดังนั้นบางส่วนเชื้อจุลินทรีย์อาจไม่สามารถนำมาใช้ได้ ส่วนในอาหาร TSB แหล่งคาร์บอนที่ใช้

ได้แก่น้ำตาล กลูโคส แหล่งคาร์บอนในเวย์หลักๆคือน้ำตาล lactose ซึ่งเชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญ และสร้างสารยับยั้งได้แต่อาจมีปริมาณสูงเกินไปสำหรับการเจริญ (6.0%)

จากงานวิจัยของ (Cladera-Olivera et al., 2004) ได้ทดลองผลิตแบคทีเรียโอซินจากวัสดุเหลือทิ้ง โดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* strain P40 และพบว่าเชื้อผลิตสารยับยั้งได้ดีที่สุดในอาหารเวย์ รองลงมา คือ กากถั่วเหลืองที่ได้จากการสกัดโปรตีน (fibrous soybean residue) อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ Motta และ Brandelli (2008) พบว่าอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารคล้ายแบคทีเรียโอซิน โดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain P43 ได้แก่อาหารโปรตีนจากถั่วเหลือง (soybean protein) โดยไม่พบกิจกรรมของ สารยับยั้งในอาหารเวย์ (whey) ปลาป่น (fish meal) และขนไก่ป่น (feather meal) ถึงแม้จะพบการเจริญ ใกล้เคียงกันในทุกอาหาร จากผลการทดลองแสดงว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะสามารถสร้างสารยับยั้งใน อาหารที่แตกต่างกัน โดยในการทดลองทั้งสองนี้ใช้เชื้อทดสอบชนิดเดียวกันคือ *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สำหรับการทดลองนี้ใช้เชื้อ *Bacillus* sp. BK9 และพบเชื้อเจริญและสร้างสารยับยั้งได้ดีในอาหารจากน้ำต้มกากถั่วเหลืองที่เป็นผลพลอยได้ จากการสกัดน้ำมัน รองลงมาได้แก่อาหารที่ได้จากน้ำนึ่งปลาทูน่า และเวย์

ในการวัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัสดุเหลือทิ้งต่างๆ พบว่าถึงแม้ในการเตรียมอาหารจะมีการปรับ pH เริ่มต้นที่ 7.0 แต่ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดมีค่า pH เริ่มต้นในช่วง 6.8-7.2 ขึ้นกับ ชนิดของอาหารหลังการ autoclave และการเติมหัวเชื้อ อย่างไรก็ตามค่า pH จะลดลงเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4) ในระหว่างการเจริญและการผลิตสารยับยั้ง และอาหารแต่ละชนิดมีค่า pH ที่ไม่แตกต่างกันมากเมื่อ บ่มเป็นระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการยับยั้งเชื้อทดสอบจึงไม่ได้มีผลมาจากกรดหรือด่างที่เกิดจาก การผลผลิตที่ได้จากการเจริญ แต่เป็นผลมาจากสารแบคทีเรียโอซินที่เชื้อสร้างขึ้น จากการศึกษาของ Cladera-Olivera et al (2004) และ Motta และ Brandelli (2008) พบว่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในการ สร้างสารยับยั้งของเชื้อ *B. licheniformis* strain P40 และ *Bacillus* sp. strain P43 อยู่ในช่วง 6-8 ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของอาหาร โดยเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 (รูปที่ 4) ตลอดระยะเวลาการหมักจึง ไม่น่าจะมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ อย่างไรก็ตามค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญ และการสร้างสารยับยั้งอาจเป็นค่าอื่น ซึ่งจะต้องทำการหาค่าที่เหมาะสมต่อไป

จากการคัดเลือกชนิดของวัสดุเหลือทิ้งที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งในขั้นต้นนี้ ได้ทำการ คัดเลือกวัสดุเหลือทิ้ง 3 ชนิดมาใช้ในการทดลองแปรผันปริมาณน้ำตาลและโปรตีน โดยคัดเลือกจาก ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งได้สูง ได้แก่ น้ำต้มกากถั่วเหลือง เวย์ และน้ำนึ่งปลาทูน่า โดยจะ ใช้ น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งโปรตีน และใช้เวย์เป็นแหล่งน้ำตาล นอกจากนี้ยังใช้กากน้ำตาลซึ่งถึงแม้จะ ไม่พบการสร้างสารยับยั้งแต่นำมาใช้เป็นแหล่งน้ำตาลเสริมเนื่องจากกากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลสูง



รูปที่ 4 แสดงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัสดุเหลือทิ้งต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที

3.4 การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างสารยับยั้ง

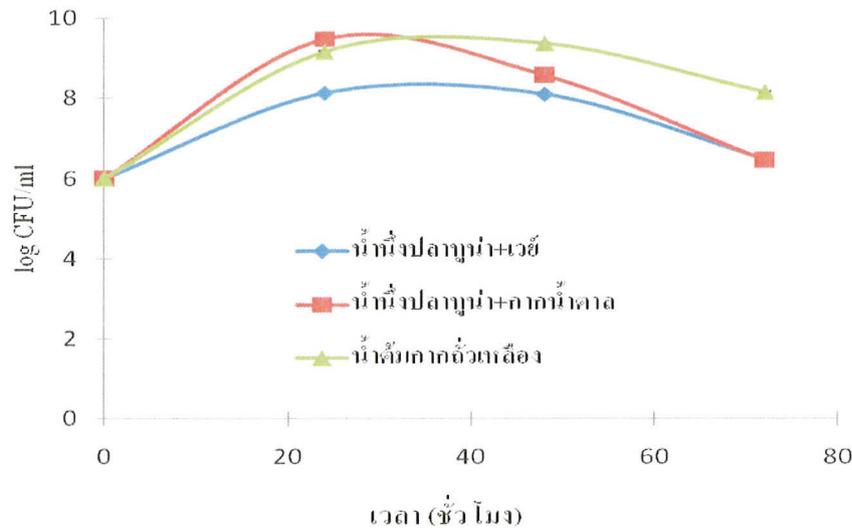
จากผลการทดลองคัดเลือกชนิดของวัสดุเหลือทิ้งที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งได้ดีที่สุด พบว่าน้ำดื่มกากถั่วเหลือง (ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรที่ต้มเป็นเวลา 10 นาที) มีการเจริญและการผลิตสารยับยั้งได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามเวย์ และน้ำนึ่งปลาทูน่าก็ยังมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการผลิตสารยับยั้งถึงแม้จะผลิตได้น้อยกว่าน้ำดื่มกากถั่วเหลือง เนื่องจากผลิตสารยับยั้งได้เท่ากับในอาหาร TSB การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและโปรตีนในน้ำนึ่งปลาทูน่าและเวย์ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วัสดุเหลือทิ้งมาผสมกันเองและโดยใช้แหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาล โดยนำวัสดุเหลือทิ้ง 3 ชนิด ที่เลือกได้จากการทดลองข้อ 3.3 รวมทั้งน้ำดื่มกากถั่วเหลือง มาทำการเจือจางและผสมกันเพื่อปรับปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดให้ใกล้เคียงกับน้ำดื่มกากถั่วเหลือง โดยได้อาหาร 2 สูตรได้แก่ อาหารน้ำนึ่งปลาทูน่าผสมกับเวย์ และอาหารน้ำนึ่งปลาทูน่าผสมกับกากน้ำตาล เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมด (ตารางที่ 4) พบว่าในอาหารทั้งสองสูตรมี

ปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกับในอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลือง ส่วนน้ำตาลแตกต่างกันโดยในสูตรที่ 1 ที่มีน้ำตาลค่อนข้างสูงกว่า (1.5%) และสูตรที่ 2 มีน้ำตาลต่ำกว่าคือ 0.8%

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของอาหารสูตรใหม่เปรียบเทียบกับอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลือง

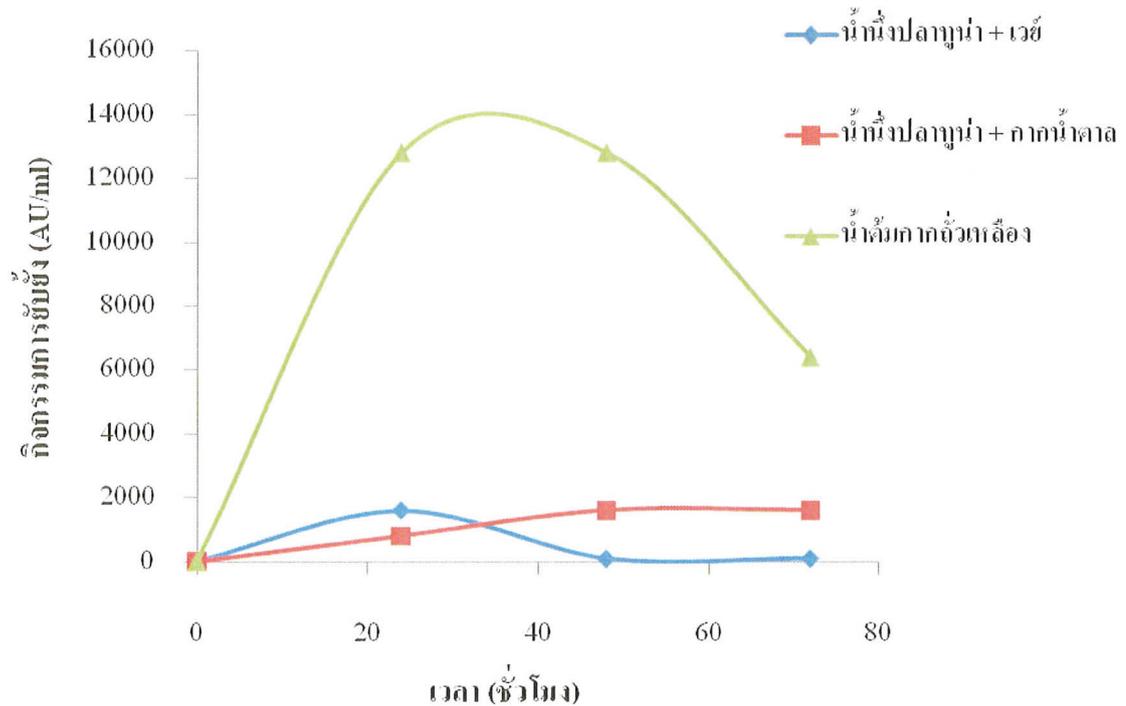
อาหารสูตรใหม่	โปรตีน (%)	น้ำตาลทั้งหมด (%)
สูตรที่ 1 น้ำนิ่งปลาทูน่า + เวย์	0.74 ± 0.06	1.5 ± 0.006
สูตรที่ 2 น้ำนิ่งปลาทูน่า + กากน้ำตาล	0.68 ± 0.04	0.8 ± 0.006
น้ำดื่มกากถั่วเหลือง (50 g/L, ต้ม 10 นาที)	0.80 ± 0.032	1.1 ± 0.001

รูปที่ 5 แสดงการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ในอาหาร อาหารน้ำนิ่งปลาทูน่าผสมกับเวย์ และอาหารน้ำนิ่งปลาทูน่าผสมกับกากน้ำตาล เปรียบเทียบกับอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลือง พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อเจริญเข้าสู่ stationary phase ในอาหารทั้ง 3 ชนิด โดยน้ำนิ่งปลาทูน่าผสมกับกากน้ำตาล เชื้อมีการเจริญมากที่สุด โดยมีเซลล์ของเชื้อประมาณ $9.48 \log \text{CFU/ml}$ และอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลืองมีเซลล์ประมาณ $9.16 \log \text{CFU/ml}$ ส่วนน้ำนิ่งปลาทูน่าผสมกับเวย์มีการเจริญต่ำกว่าเมื่อเทียบกับแหล่งอาหารทั้ง 2 ชนิด คือ มีเซลล์ประมาณ $8.13 \log \text{CFU/ml}$ อย่างไรก็ตามเมื่อต้มเชื้อนานขึ้น จำนวนเซลล์ในอาหารน้ำนิ่งปลาทูน่าผสมกับกากน้ำตาลจะลดลงใกล้เคียงกับในอาหารน้ำนิ่งปลาทูน่าผสมกับเวย์ทั้งที่ 48 และ 72 ชั่วโมง



รูปที่ 5 แสดงการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ในอาหารน้ำนึ่งปลาหมึกผสมกับเวย์ และอาหารน้ำนึ่งปลาหมึกผสมกับกากน้ำตาล เปรียบเทียบกับในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง โดยหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 200 รอบต่อนาที

เมื่อทำการวัดกิจกรรมการยับยั้งในอาหารผสมพบว่า (รูปที่ 6) น้ำต้มกากถั่วเหลืองจะให้กิจกรรมการยับยั้งสูงสุด มีค่าเท่ากับ 12,800 AU/ml ที่เวลา 24-48 ชั่วโมง และลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่อาหารสูตรน้ำนึ่งปลาหมึกผสมกากน้ำตาลที่มีการเจริญใกล้เคียงกับในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง แต่กลับสร้างสารยับยั้งได้ช้าและต่ำ โดยที่ 24 ชั่วโมงมีกิจกรรมการยับยั้งเพียง 800 AU/ml และเพิ่มเป็น 1,600 AU/ml ที่เวลา 48 และ คงที่ที่เวลา 72 ชั่วโมง ส่วนอาหารน้ำนึ่งปลาหมึกผสมเวย์มีการสร้างสารยับยั้งที่ 24 ชั่วโมงได้เท่ากับ 1,600 AU/ml และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ดังนั้นจะเห็นว่าถึงแม้อาหารทั้งสองสูตรจะมีปริมาณ โปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงหรือมากกว่าในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลืองเล็กน้อย และยังมีการเจริญใกล้เคียงกัน แต่การสร้างสารยับยั้งจะสูงสุดในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่ได้จากพืช ซึ่งไม่สามารถทดแทนได้ด้วยโปรตีนที่มาจากสัตว์คือปลาหมึก นอกจากนี้ในกากถั่วเหลืองอาจมีสารอาหารที่ส่งเสริมการเจริญและการสร้างสารยับยั้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 และจากผลการทดลองยังพบว่า การสร้างสารยับยั้งจะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กัน ในแง่ปริมาณสารยับยั้งกับความสามารถในการเจริญ โดยเชื้อที่โตดีอาจไม่พบการสร้างสารยับยั้ง



รูปที่ 6 แสดงกิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml) ของสารยับยั้งจากเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 ที่เลี้ยงในอาหาร ในอาหารน้ำดื่มปลาหมึกผสมกับเวย์ และน้ำดื่มปลาหมึกผสมกับกากน้ำตาล เปรียบเทียบกับ อาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลือง

เมื่อเปรียบเทียบอาหารทั้งสามสูตรดังกล่าวจะพบว่า ถ้าต้องการผลิตเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 สามารถใช้อาหารสูตรน้ำดื่มปลาหมึกผสมกากน้ำตาลและอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลือง เพราะจะให้ ปริมาณเซลล์สูงและเร็วที่สุด และหากต้องการผลิตสารยับยั้ง สามารถใช้อาหารสูตรน้ำดื่มกากถั่วเหลือง เนื่องจากผลิตสารยับยั้งที่มีกิจกรรมสูงและเร็วที่สุด

3.5 ผลการศึกษาปริมาณกากถั่วเหลืองและเวลาที่ใช้ในการต้มที่เหมาะสม

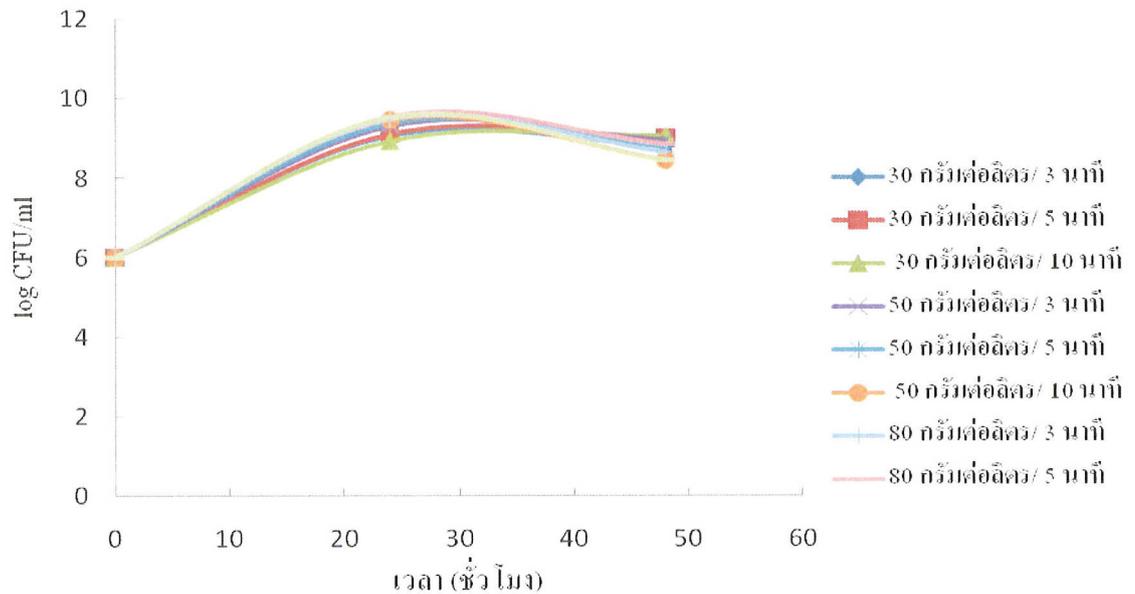
จากการทดลองหากิจกรรมของสารยับยั้งพบว่าในน้ำดื่มกากถั่วเหลืองเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 มีการ เจริญและสร้างสารยับยั้งดีที่สุด อย่างไรก็ตาม อาหารดังกล่าวได้จากน้ำดื่มกากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และต้มเป็นเวลา 10 นาที ดังนั้น จึงทดลองแปรผันปริมาณกากถั่วเหลืองและเวลาในการ ต้มเพื่อปรับปรุงสูตรอาหารให้มีปริมาณ โปรตีนและน้ำตาลที่เหมาะสม โดยใช้อาหารน้ำดื่มกากถั่ว เหลืองที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองเข้มข้น 30, 50 และ 80 กรัมต่อลิตร ต้มเป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที ซึ่ง จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดของน้ำดื่มกากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นและเวลาการ

ต้มต่างๆ ได้ผลดังตารางที่ 5 พบว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นและใช้เวลาในการต้มเพิ่มขึ้น จะพบปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดในน้ำต้มเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร TSB แล้ว น้ำต้มกากถั่วเหลืองทุกความเข้มข้นยังมีปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดที่น้อยกว่าอาหาร TSB

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของน้ำต้มกากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น และเวลาการต้มต่างๆเปรียบเทียบกับอาหาร TSB

น้ำต้มกากถั่วเหลือง	โปรตีน (%)	น้ำตาลทั้งหมด (%)
30 g/L, ต้ม 3 นาที	0.25 ± 0.025	0.30 ± 0.01
30 g/L, ต้ม 5 นาที	0.35 ± 0.038	0.60 ± 0.04
30 g/L, ต้ม 10 นาที	0.40 ± 0.014	0.80 ± 0.04
50 g/L, ต้ม 3 นาที	0.36 ± 0.025	0.60 ± 0.04
50 g/L, ต้ม 5 นาที	0.72 ± 0.013	1.00 ± 0.04
50 g/L, ต้ม 10 นาที	0.80 ± 0.032	1.10 ± 0.01
80 g/L, ต้ม 3 นาที	1.04 ± 0.034	1.10 ± 0.01
80 g/L, ต้ม 5 นาที	1.23 ± 0.058	1.30 ± 0.01
80 g/L, ต้ม 10 นาที	1.39 ± 0.055	1.50 ± 0.03
TSB	2.00	0.25

ผลการทดลองศึกษาการเจริญ แสดงดังรูปที่ 7 พบว่า ในทุกๆ ความเข้มข้นของโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดในน้ำต้มกากถั่วเหลืองที่เตรียมได้ในตารางที่ 5 ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 โดยเชื้อเจริญเข้าสู่ stationary phase ที่เวลา 24 ชั่วโมง พร้อมกันโดยมีจำนวนเซลล์ประมาณ 9.1 -9.5 log CFU/ml โดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หลังจากนั้นการเจริญจะลดลงเล็กน้อยที่ 48 ชั่วโมง โดยพบปริมาณเซลล์ 8.4 - 9.1 log CFU/ml (ตารางที่ 6)



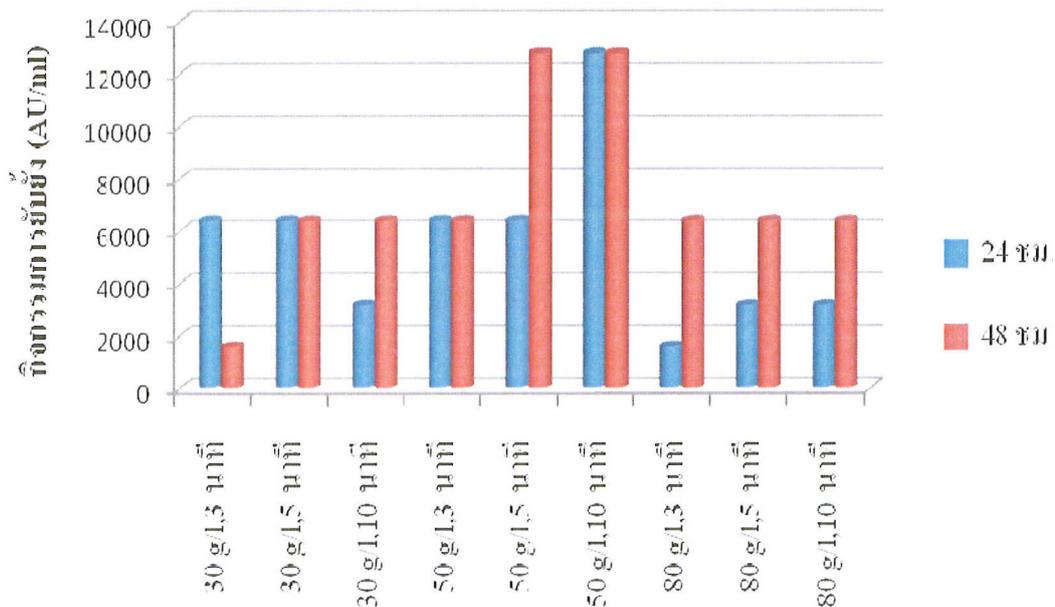
รูปที่ 7 แสดงการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 ในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลืองที่เตรียมจากกากถั่วเหลือง 30, 50 และ 80 กรัม และต้มเป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที บ่มโดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นและเวลาการต้มกากถั่วเหลืองต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 ที่ 24 ชั่วโมง

อาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง	ปริมาณเซลล์ (log CFU/ml)
80 กรัมต่อลิตร ต้ม 5 นาที	9.55 ^a
80 กรัมต่อลิตร ต้ม 10 นาที	9.52 ^a
80 กรัมต่อลิตร ต้ม 3 นาที	9.49 ^a
50 กรัมต่อลิตร ต้ม 10 นาที	9.47 ^a
50 กรัมต่อลิตร ต้ม 5 นาที	9.37 ^b
50 กรัมต่อลิตร ต้ม 3 นาที	9.30 ^b
30 กรัมต่อลิตร ต้ม 5 นาที	9.10 ^c
30 กรัมต่อลิตร ต้ม 3 นาที	9.06 ^c
30 กรัมต่อลิตร ต้ม 10 นาที	8.92 ^d

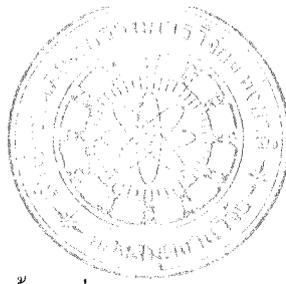
หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การวิเคราะห์กิจกรรมของสารยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 ในอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลืองที่ ปริมาณและเวลาดื่มต่างๆ กันดังแสดงในรูปที่ 8 จะเห็นได้ว่าสารยับยั้งที่ผลิตในน้ำดื่มกากถั่วเหลือง ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ต้ม 5 และ 10 นาที มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากันคือ 12,800 AU/ml อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการผลิตสารยับยั้งพบว่า น้ำดื่มกากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ต้ม 10 นาที ผลิตสารยับยั้งที่มีกิจกรรมสูงสุดได้เร็วกว่า คือมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุด ตั้งแต่เวลา 24 ชั่วโมงของการบ่ม ส่วนที่ต้ม 5 นาที เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีกิจกรรมการยับยั้ง 6,400 AU/ml และสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับที่ต้ม 10 นาที ดังนั้น ในการผลิตสารยับยั้งจากน้ำดื่มกากถั่ว เหลือง ปริมาณกากถั่วเหลืองและเวลาที่เหมาะสมในการต้มคือ 50 กรัมต่อลิตร ต้มนาน 10 นาที



รูปที่ 8 แสดงกิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml) ของสารยับยั้งจากเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 ในอาหารน้ำดื่มกาก ถั่วเหลืองที่เตรียมจากกากถั่วเหลือง 30, 50 และ 80 กรัม และต้มเป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที บ่ม โดยเขย้าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

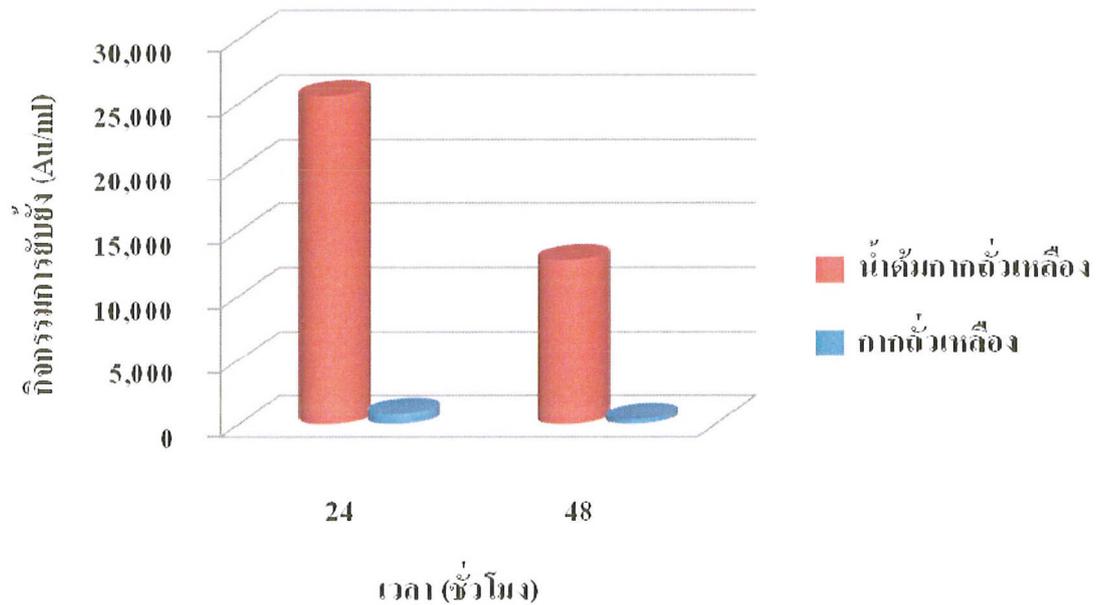
เมื่อเปรียบเทียบการเจริญกับการสร้างสารยับยั้งพบว่า การเจริญของเชื้อ ไม่แตกต่างกันมาก แต่ ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแตกต่างกัน และจากการวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีนและน้ำตาล ทั้งหมด (ตารางที่ 5) พบว่า น้ำดื่มกากถั่วเหลืองที่เตรียมจากกากถั่วเหลือง 50 กรัมต่อลิตร ต้มเป็นเวลา



5 และ 10 นาที และให้กิจกรรมการยับยั้งสูงสุด มีโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกันคือมีโปรตีน 0.72 และ 0.80 % ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำตาล 1.0 และ 1.1% ตามลำดับ ส่วนในอาหารที่เตรียมจากกากถั่วเหลือง 30 กรัมต่อลิตร จะพบโปรตีนเพียง 0.25 – 0.40% และในอาหารที่เตรียมจากกากถั่วเหลือง 80 กรัมต่อลิตร จะพบโปรตีน 1.04 – 1.39% และน้ำตาลต่ำเพียง 0.3 – 0.8% ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณโปรตีนที่ต่ำ และสูงกว่าที่เตรียมจากกากถั่วเหลือง 50 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญ แต่จะมีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง โดยที่กากถั่วเหลือง 80 กรัมต่อลิตรมีโปรตีนสูงแต่สร้างสารยับยั้งได้ต่ำกว่าที่ 50 กรัมต่อลิตร

3.6 ศึกษาการสร้างสารยับยั้งในอาหารกากถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง

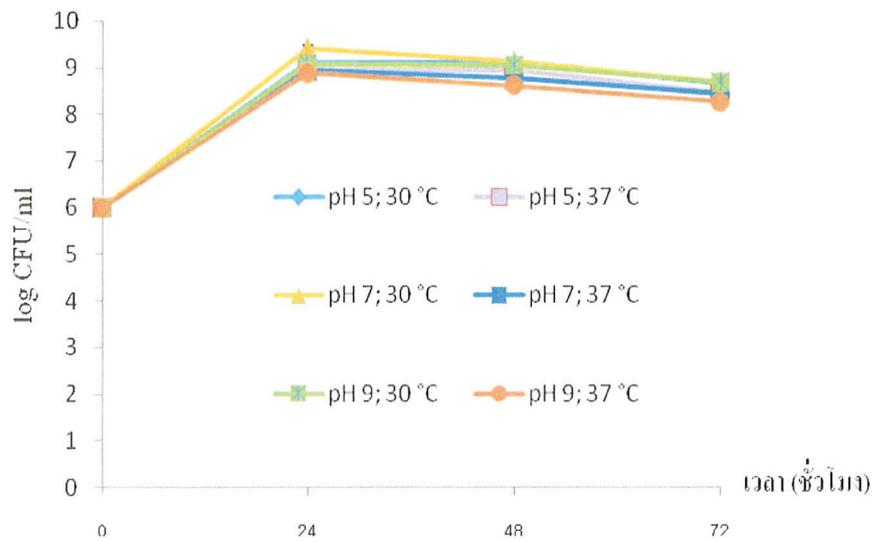
จากการศึกษาพบว่าน้ำต้มกากถั่วเหลือง 50 กรัมต่อลิตร ต้มเป็นเวลา 10 นาที จะผลิตสารยับยั้งได้เร็วและสูง อย่างไรก็ตามในการผลิตจะต้องเตรียมน้ำกากถั่วเหลืองโดยหลังจากต้มแล้วจะกรองแยกกากถั่วเหลืองออก ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตสารยับยั้งในน้ำต้มกากและจากกากถั่วเหลืองโดยตรง ซึ่งจะช่วยให้ไม่ยุ่งยากในการเตรียม จากการทดลองพบว่าอาหารกากถั่วเหลืองที่ไม่แยกกากออกจะให้กิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเพียง 800 Au/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง ต่ำกว่าที่ได้จากน้ำต้มกากที่มีกิจกรรมสูงสุดถึง 25,600 Au/ml ที่เวลาเดียวกัน (รูปที่ 9) การที่อาหารกากถั่วเหลืองมีกิจกรรมการยับยั้งต่ำอาจเนื่องมาจากการเตรียมอาหารขณะทำการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที น้ำต้มกากถั่วเหลืองได้ถูกแยกกากออกก่อนทำการ autoclave ส่วนกากถั่วเหลืองจะทำการ autoclave ทั้งกาก อาจทำให้ปริมาณสารอาหารมากเกินไป เช่นเดียวกับการผลการทดลองในรูปที่ 7 ที่เมื่อใช้กากถั่วเหลือง 80 กรัมต่อลิตร จะให้กิจกรรมการยับยั้งต่ำกว่าที่ 50 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามในการทดลองไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง การใช้กากถั่วเหลืองทดแทนน้ำต้มกากอาจทำได้โดยการลดปริมาณกากถั่วเหลืองให้ต่ำกว่า 50 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองนี้จึงยังคงใช้น้ำต้มกากถั่วเหลืองในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 9 แสดงกิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml) ของสารยับยั้งจากเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 ในอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลืองที่เตรียมจากกากถั่วเหลือง 50 กรัม และต้มเป็นเวลา 10 นาที บ่มโดยเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

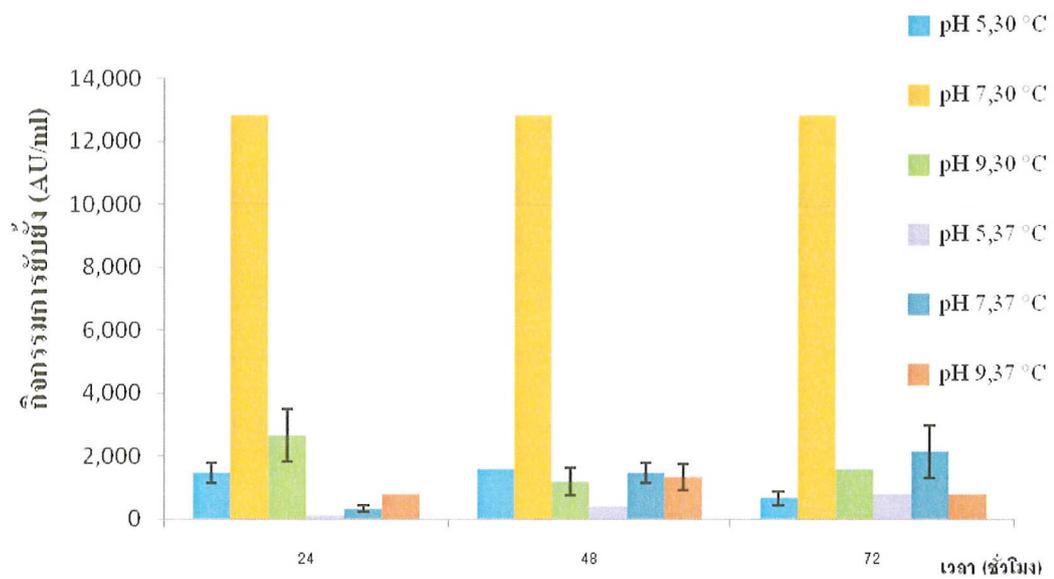
3.7 การศึกษา pH และอุณหภูมิ ที่เหมาะสมเบื้องต้น

จากผลการทดลองเบื้องต้น น้ำดื่มกากถั่วเหลือง 50 กรัมต่อลิตร ต้มเป็นเวลา 10 นาที เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้ง จึงนำมาแปรผันค่า pH และอุณหภูมิเบื้องต้น โดยใช้ค่า pH ที่ 5, 7 และ 9 ส่วนอุณหภูมิที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่า ที่ pH 7 และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญได้ดีที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำดื่มกากถั่วเหลืองที่สภาวะอื่น ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีพบเซลล์ $9.24 \log \text{CFU/ml}$ ส่วนที่ pH และอุณหภูมิอื่นๆ จะมีการเจริญแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95% และมีเซลล์อยู่ในช่วง 8.89- 9.1 $\log \text{CFU/ml}$ แสดงว่าเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 สามารถเจริญได้ในช่วง pH และอุณหภูมิที่กว้าง ซึ่งช่วงดังกล่าวไม่ค่อยมีผลต่อการเจริญ (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่บ่มในน้ำต้มกากถั่วเหลืองในสภาวะที่มีค่า pH และ อุณหภูมิต่างๆ

การวิเคราะห์กิจกรรมของสารยับยั้งที่ผลิตในน้ำต้มกากถั่วเหลืองในสภาวะที่มีค่า pH และอุณหภูมิ ต่างๆกัน พบว่าสารยับยั้งที่ผลิตในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง pH 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มี กิจกรรมการยับยั้งสูงที่เวลา 24 ชั่วโมง และคงที่ตลอดการหมักที่ 72 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้ง เท่ากับ 12,800 AU/ml ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งที่ผลิตใน สภาวะอื่นๆ (รูปที่ 11) จะเห็นได้ว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อมีการสร้างสาร ยับยั้งที่มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 7 รองลงมาคือที่ pH 9 และ pH 5 ส่วนในสภาวะที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส ทุก pH มีกิจกรรมการยับยั้งค่อนข้างต่ำ แสดงว่าเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 สามารถสร้างสารยับยั้ง ที่มีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งในการทดลองใช้อุณหภูมิต่ำสุดที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมิต่ำกว่า นี้เชื้ออาจสร้างสารยับยั้งเพิ่มขึ้นได้ ส่วนผลของ pH พบว่าที่ pH 5 และ 9 ที่ใช้ในการทดลอง เชื้อสร้าง สารยับยั้งได้ต่ำกว่าที่ pH 7 ดังนั้น pH ที่เหมาะสมจึงน่าจะอยู่ในช่วงระหว่าง 5 ถึง 9 ดังนั้น ในการ ทดลองขั้นต่อไปจึงได้ออกแบบการทดลองโดยการแปรผันอุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส และ pH ในช่วง 6 ถึง 8 โดยเพิ่มปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งได้แก่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น และความเร็วในการเขย่า



รูปที่ 11 แสดงกิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml) ของสารยับยั้งจากเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่บ่มในน้ำดื่มกากถั่วเหลืองในสภาวะที่มีค่า pH และอุณหภูมิต่างกัน

3.8 ศึกษาสภาวะการหมักที่เหมาะสม ได้แก่ pH อุณหภูมิ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นและอัตราการเขย่าในระดับฟลอสก์

จากการศึกษากิจกรรมการยับยั้งและการเจริญที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ในการหมัก 29 run ซึ่งได้จากการออกแบบการทดลองแบบ CCD ที่ทำการแปรผันปัจจัย 4 ปัจจัย และแปรผันแต่ละปัจจัยเป็น 3 ระดับ คืออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ 23, 30, 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าเพื่อให้อากาศ 150, 200, 250 รอบต่อนาที, pH ของอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลือง 6, 7, 8 และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 1, 2, 3% (v/v) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่ากิจกรรมการยับยั้ง, การเจริญ และ pH ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงของเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 ที่เลี้ยงในสภาวะต่างๆ ในอาหารน้ำต้มกาดั่วเหลือง

RUNS	ปัจจัย (variable)				Growth (log CFU/ml) 24h	Antimicrobial Activity (U/ml) 24h	pH 24 h	Growth (logCFU/ml) 48h	Antimicrobial Activity (U/ml) 48h	pH 48h
	Temp (°c)	Shaking speed (รอบ/นาที)	pH	Starter (%v/v)						
2	23	150	6	1	7.40	12,800	6.275	8.38	51,200	7.042
23	23	150	8	1	8.71	3,200	6.464	8.61	51,200	7.255
8	37	150	6	1	7.78	800	6.430	8.71	1,600	7.305
26	37	150	8	1	7.30	200	6.167	8.30	800	6.897
29	23	150	6	3	7.00	12,800	6.320	7.72	12,800	7.095
18	23	150	8	3	7.72	12,800	6.547	6.18	51,200	7.190
7	37	150	6	3	7.00	200	6.380	8.67	1,600	7.150
27	37	150	8	3	7.30	400	6.414	8.08	1,600	6.844
9	23	250	6	1	7.00	51,200	7.154	9.36	<u>102,400</u>	8.072
4	23	250	8	1	7.40	51,200	7.518	9.64	204,800	7.977
6	37	250	6	1	9.04	100	7.221	9.34	400	8.596
20	37	250	8	1	8.97	200	5.834	8.96	800	8.031
24	23	250	6	3	7.30	51,200	7.129	9.63	<u>102,400</u>	8.033
28	23	250	8	3	7.30	51,200	7.241	9.40	204,800	8.186
5	37	250	6	3	7.00	25	5.900	9.36	400	8.165
1	37	250	8	3	8.54	50	5.851	9.77	400	7.984
11	30	200	6	2	8.80	3,200	6.580	8.85	800	7.984
16	30	200	8	2	8.60	800	6.581	8.53	6,400	7.877
17	23	200	7	2	8.18	12,800	6.691	8.93	<u>102,400</u>	7.770
25	37	200	7	2	7.78	200	5.775	8.26	800	7.283
12	30	200	7	1	8.96	12,800	6.565	8.53	1,600	7.814
19	30	200	7	3	8.94	3,200	6.621	8.40	3,200	7.691
21	30	150	7	2	7.78	1,600	6.832	6.34	12,800	6.576
15	30	250	7	2	8.93	3,200	7.929	9.18	800	8.517
3	30	200	7	2	8.49	3,200	6.619	8.60	25,600	7.858

ตารางที่ 7 แสดงค่ากิจกรรมการยับยั้ง, การเจริญ และ pH ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่เลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ ในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง (ต่อ)

RUNS	ปัจจัย (variable)				Growth (logCFU/ml) 24h	Antimicrobial Activity (U/ml) 24h	pH 24 h	Growth (logCFU/ml) 48h	Antimicrobial Activity (U/ml) 48h	pH 48h
	Temp (°c)	Shaking speed (รอบต่อนาที)	pH	Starter (%v/v)						
13	30	200	7	2	9.48	6,400	6.691	8.85	1,600	7.744
14	30	200	7	2	8.98	25,600	6.636	8.64	3,200	7.684
22	30	200	7	2	9.11	6,400	6.630	9.00	3,200	8.107
10	30	200	7	2	8.85	6,400	6.537	8.49	6,400	7.828

จากตารางจะเห็นว่าเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 สามารถสร้างสารยับยั้งได้สูงสุดใน run ที่ 4 และ 28 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุด 51,200 AU/ml ที่ 24 ชั่วโมง และ 204,800 AU/ml ที่ 48 ชั่วโมง โดยเป็นการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เขย่า 250 รอบต่อนาที และที่ pH 8 เท่ากัน ต่างกันที่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 1 และ 3% ตามลำดับ แสดงว่าปริมาณหัวเชื้อ 1% ก็เพียงพอในการสร้างสารยับยั้งได้ และไม่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้ง รองลงมาได้แก่ run ที่ 9 และ 17 ซึ่งมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 102,400 AU/ml ที่ 48 ชั่วโมง โดย run ที่ 9 จะมีการหมักที่สภาวะเดียวกับ run ที่ 4 แต่ pH เท่ากับ 6 แสดงว่าที่สภาวะเดียวกัน เชื้อจะสร้างสารยับยั้งได้ดีที่ pH 8 มากกว่าที่ pH 6 ส่วน run ที่ 17 สภาวะที่ใช้หมักคือ อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที และที่ pH 7 ส่วนการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งน้อยที่สุดคือไม่เกิน 1,600 AU/ml ที่ 48 ชั่วโมง

ในส่วนของการเจริญของเชื้อเมื่อทำการวัดการเจริญของเชื้อที่ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญคือการเขย่า จะเห็นว่าโดยรวมแล้วการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ให้ผลการเจริญดีที่สุดทั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งค่อนข้างใกล้เคียงกับการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ขณะที่การเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ให้ผลการเจริญน้อยที่สุดทั้งที่ 24 และที่ 48 ชั่วโมง

เมื่อนำค่าที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมาวิเคราะห์โดยโปรแกรม design expert 7.1.5 เพื่อดูพื้นที่ผิวตอบสนองของการสร้างกิจกรรมการยับยั้งและการเจริญที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อคาดการณ์หาสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับการเจริญและการผลิตสารยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ได้ผลการทดลองดังนี้

ผลการทดลองพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology)

กิจกรรมการยับยั้ง

กิจกรรมการยับยั้งเชื้อของ *Bacillus* sp. BK9 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ค่าทางสถิติของการออกแบบการทดลองสำหรับกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองต่อกิจกรรมการยับยั้งที่ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 8

Std.Dev.	8232.52	R-Squared	0.8863	Mean	11416.38
Adj R-Squared	0.7727	C.V.%	72.11	Pred. R-Squared	0.6483
PRESS	2.936E+009	Adeq Precision	9.187		

ตารางที่ 8 แสดงค่าทางสถิติ (ค่า coefficient, F-value และ p-value) ในการวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 24 ชั่วโมง

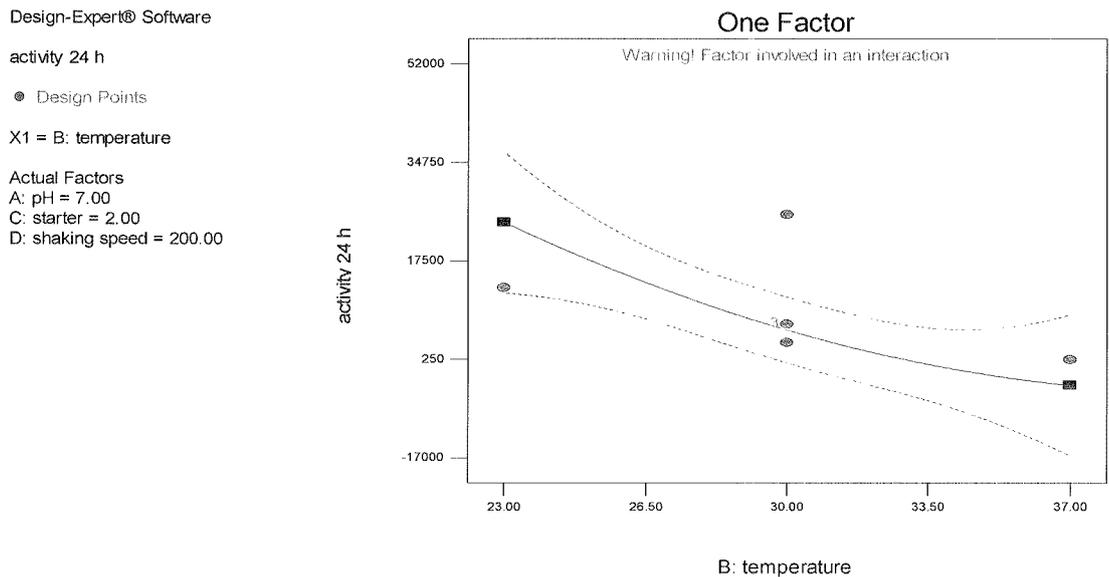
Factors	Coefficient	F-value	p-value (probe>F)
Intercept/model	5409.95	7.80	0.0002
Lack of Fit F- value	-	0.76	0.6721
x_1 -pH	-681.94	0.12	0.7305
x_2-temperature	-14279.17	54.15	< 0.0001 *
x_3 -starter	-34.72	3.202E-004	0.9860
x_4-shaking speed	8915.28	21.11	0.0004 *
$x_1 x_2$	582.81	0.080	0.7812
$x_1 x_3$	645.31	0.098	0.7585
$x_1 x_4$	632.81	0.095	0.7630
$x_2 x_3$	-639.06	0.096	0.7608
$x_2 x_4$	-10276.56	24.93	0.0002
$x_3 x_4$	-589.06	0.082	0.7789
x_1^2	81.76	2.550E-004	0.9875
x_2^2	4581.76	0.80	0.3859
x_3^2	6081.76	1.41	0.2546
x_4^2	-1068.24	0.044	0.8377

x_1, x_2, x_3, x_4 = linear effects, $x_1 x_2, x_1 x_3, x_1 x_4, x_2 x_3, x_2 x_4, x_3 x_4$ = interaction effects,

$x_1^2, x_2^2, x_3^2, x_4^2$ = quadratic effects

เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติ Analysis of variance (ANOVA) ค่า Pred R-squared 0.6483 นั้นถือว่าใกล้เคียงกับค่า Adj R- squared ที่มีค่า 0.7727 นอกจากนี้ อัตราส่วนของค่า Adeq Precision ถ้ามีค่ามากกว่า 4 แสดงว่า model ใช้ได้ และสำหรับ model นี้มีค่า Adeq precision อยู่ที่ 9.187 นั้นแสดงว่า model นี้สามารถใช้ในการคาดการณ์ผลการทดลอง และพื้นที่ผิวที่ได้จากการทดลองเป็นเหตุเป็นผล นอกจากนี้จากตารางที่ 8 เมื่อพิจารณาค่า p (p-value) ซึ่งถ้าค่า p มีค่าน้อยกว่า 0.05 จะถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ หรือมีผลต่อสิ่งที่ทำการศึกษา ในที่นี้จะเห็นว่า model หรือการออกแบบการทดลองมีค่า p = 0.0002 ถือเป็นัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับค่า F-value ที่มีค่า 7.80 แสดงว่า model นี้มีัยสำคัญทางสถิติขณะที่ค่า Lack of Fit มีค่า f-value ที่ 0.76 และมีค่า probe>f ที่ 67.21% จัดว่าไม่มีัยสำคัญ เมื่อพิจารณาค่า p ในเทอมอื่น ๆ พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งมากที่สุดคืออุณหภูมิ (x₂) โดยมีค่า p น้อยกว่า 0.0001 รองลงมาคือความเร็วในการเขย่า (x₄) มีค่า p 0.0004 ซึ่งเมื่อพิจารณาปัจจัยร่วมพบว่าอุณหภูมิ และความเร็วในการเขย่า (x₂ x₄) มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งเช่นกัน โดยมีค่า p 0.0002 รูปที่ 12 และ 13 แสดงแนวโน้มของอุณหภูมิ และความเร็วในการเขย่าที่มีต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ 24 ชั่วโมงตามลำดับ เนื่องจากปัจจัยอื่นนั้นไม่มีมีผลอย่างเป็นัยสำคัญต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ 24 ชั่วโมง ดังนั้นสมการค่าการคาดการณ์ สามารถพิจารณาเฉพาะปัจจัยอุณหภูมิกับความเร็วในการเขย่าให้อากาศ เพื่อมาคำนวณค่าการคาดการณ์ของกิจกรรมการยับยั้งที่ 24 ชั่วโมงตามสมการที่ 1

$$Y = 5409.95 - 14279.17x_2 + 8915.28x_4 - 10276.56x_2x_4 + 4581.76x_2^2 - 1068.24x_4^2 \quad (1)$$



รูปที่ 12 แสดงปัจจัยอุณหภูมิที่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่เลี้ยงในอาหารน้ำต้มกากลั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมง

Design-Expert® Software

activity 24 h

● Design Points

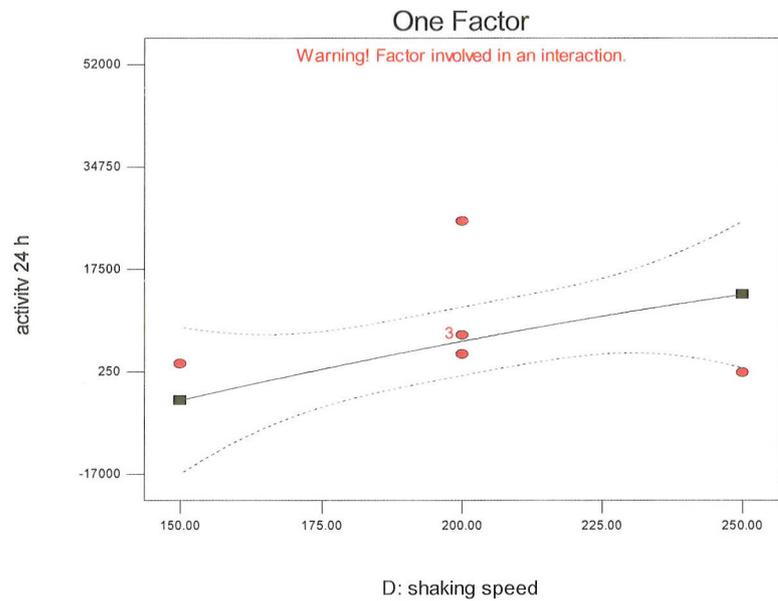
X1 = D: shaking speed

Actual Factors

A: pH = 7.00

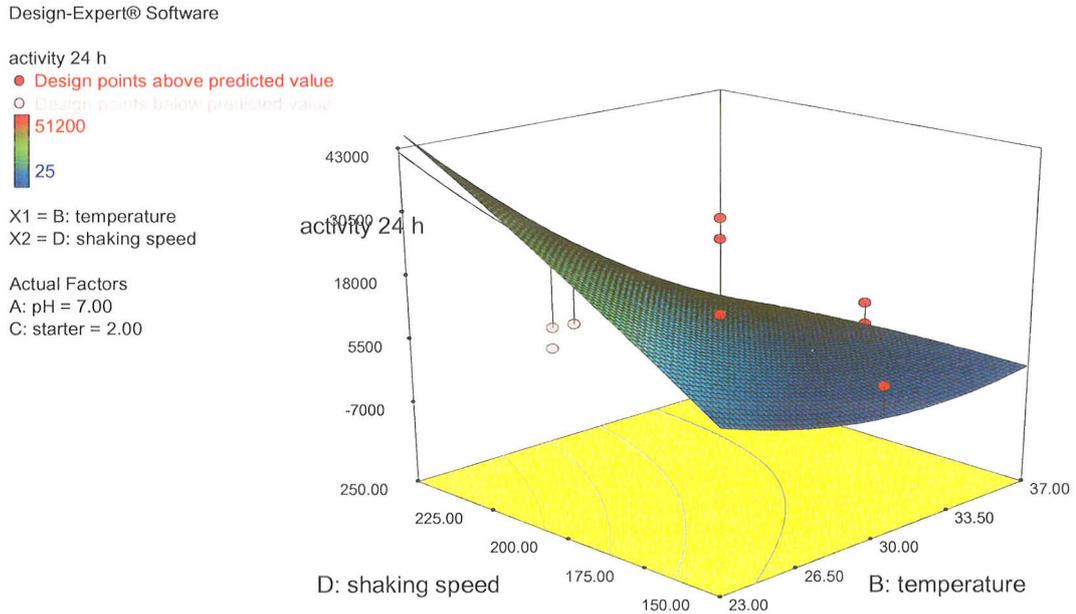
B: temperature = 30.00

C: starter = 2.00



รูปที่ 13 แสดงปัจจัยความเร็วในการเขย่าที่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่เลี้ยงในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมง

จากกราฟรูปที่ 12 และ 13 จะเห็นว่า ปัจจัยทางด้านอุณหภูมิ และความเร็วในการเขย่ามีผลต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 โดยที่เมื่ออุณหภูมิต่ำลงมีแนวโน้มการเกิดกิจกรรมการยับยั้งที่มากขึ้น ในขณะที่เมื่อในความเร็วในการเขย่ามากขึ้น ทำให้เกิดกิจกรรมการยับยั้งที่สูงขึ้นเช่นกัน และเมื่อพิจารณาทั้งสองปัจจัยคือทั้งอุณหภูมิและความเร็วในการเขย่าร่วมกันทำให้ได้กราฟตอบสนองพื้นที่ผิวดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 กราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface) ของการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านอุณหภูมิและความเร็วในการเขย่าร่วมกัน

จากรูปที่ 14 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส และการเขย่าสูงสุดคือ 250 รอบต่อนาที เกิดกิจกรรมการยับยั้งเมื่อเลี้ยงเชื่อนาน 24 ชั่วโมง ได้ดีที่สุด ซึ่งอุณหภูมิที่เกิดกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเป็นอุณหภูมิที่ต่ำสุดที่ทำการทดลอง เช่นเดียวกับความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมในการทดลองนี้จะเป็นความเร็วที่สูงสุดในการทดลอง ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองจึงทำให้ไม่สามารถหาสถานะที่เหมาะสมได้ จึงควรออกแบบการทดลองซ้ำอีกครั้ง โดยให้มีอุณหภูมิต่ำกว่า 23 องศาเซลเซียส และความเร็วในการเขย่ามากกว่า 250 รอบต่อนาที

กิจกรรมการยับยั้งเชื้อของ *Bacillus* sp. BK9 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ค่าทางสถิติของการออกแบบการทดลองสำหรับกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองต่อกิจกรรมการยับยั้งที่ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 9)

Std.Dev.	17318.42	R-Squared(R ²)	0.9550	Mean	31282.76
Adj R-Squared	0.9100	C.V. %	55.36	Pred. R-Squared	0.7774
PRESS	2.078E+010	Adeq Precision	16.995		

ตารางที่ 9 แสดงค่าทางสถิติ (ค่า coefficient, F-value และ p-value) ในการวิเคราะห์ถดถอยการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง

Factors	Coefficient	F-value	p-value (probe>F)
Intercept/model	7071.84	21.22	< 0.0001
Lack of Fit F- value		3.81	0.1048
x₁-pH	16555.56	16.45	0.0012*
x₂-temperature	-45844.44	126.13	< 0.0001*
x ₃ -starter	733.33	0.032	0.8600
x₄-shaking speed	26755.56	42.96	< 0.0001*
x₁ x₂	-18325.00	17.91	0.0008*
x ₁ x ₃	-675.00	0.024	0.8783
x ₁ x ₄	7375.00	2.90	0.1106
x ₂ x ₃	-675.00	0.024	0.8783
x₂ x₄	-31325.00	52.35	< 0.0001*
x ₃ x ₄	-775.00	0.032	0.8605
x ₁ ²	-2698.38	0.063	0.8058
x₂²	45301.62	17.69	0.0009*
x ₃ ²	-3898.38	0.13	0.7228
x ₄ ²	301.62	7.843E-004	0.9781

x₁, x₂, x₃, x₄ = linear effects, x₁ x₂, x₁ x₃, x₁ x₄, x₂ x₃, x₂ x₄, x₃ x₄ = interaction effects,

x₁², x₂², x₃², x₄² = quadratic effects

จากตารางที่ 9 พบว่าค่า model การออกแบบการทดลองมีค่า p น้อยกว่า 0.0001 แสดงว่าการออกแบบการทดลองน่าเชื่อถือ และพบว่าปัจจัยที่มีผลค่อนข้างมากต่อการสร้างสารยับยั้งที่ 48 ชั่วโมง (significant model term) จะเหมือนกับที่ 24 ชั่วโมง คือ อุณหภูมิ (x₂) และ อัตราเร็วในการเขย่า (x₄) แต่ที่ 48 ชั่วโมงพบว่า pH (x₁) มีผลด้วยเช่นกัน เมื่อพิจารณา 2 ปัจจัยร่วมกัน พบว่าปัจจัยร่วมระหว่าง pH กับอุณหภูมิ (x₁ x₂) และ อุณหภูมิกับความเร็วในการเขย่า (x₂ x₄) มีผลต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อที่ 48 ชั่วโมงเช่นกัน ขณะที่พิจารณาผลทาง quadratic (quadratic effect) พบว่า มีเพียงอุณหภูมิเท่านั้น (x₂²) ที่มีผลโดยทุกค่ามีค่า p น้อยกว่า 0.05 ส่วนค่า model F-value และ lack of fit F-value มีค่าเท่ากับ 21.22

และ 3.81 ตามลำดับ การที่มีค่า F-value สูงและค่า lack of fit มากกว่า 0.1 ถือว่าไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.1$) แสดงว่า model นี้สามารถใช้ในการคาดการณ์ผลการทดลองได้ เนื่องจากปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ 48 ชั่วโมงได้แก่ ปัจจัยด้านอุณหภูมิ, ความเร็วในการเขย่า และค่า pH ดังนั้น สมการสำหรับค่าการคาดการณ์จะพิจารณาเฉพาะ 3 ปัจจัยนี้โดยไม่นำปัจจัยด้านความปริมาตรหัวเชื้อเริ่มต้นมาพิจารณาด้วย ได้สมการ regression คาดการณ์การสร้างสารยับยั้ง (Y) ดังสมการที่ 2

$$Y = 7071.84 + 16555.56x_1 - 45844.44x_2 + 26755.56x_4 - 18325x_1x_2 + 7375x_1x_4 - 31325x_2x_4 \quad (2)$$

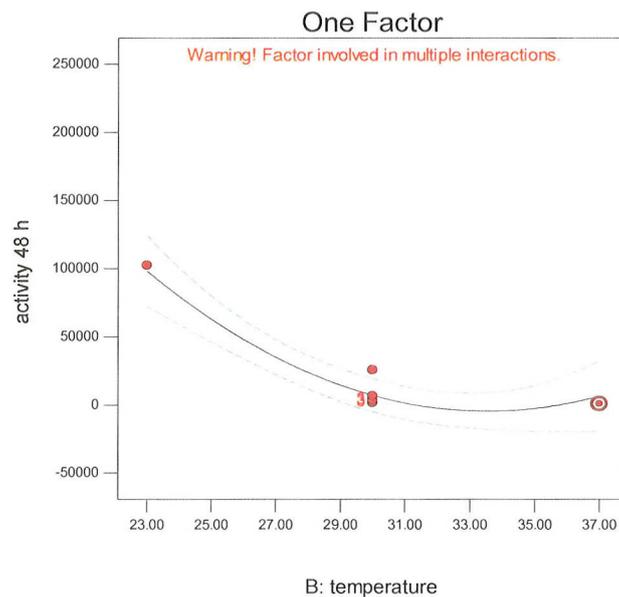
$$- 2698.38x_1^2 + 45301.02x_2^2 + 301.62x_3^2$$

จากสมการที่ได้พบว่าค่า R^2 (multiple correlation coefficient) มีค่า 0.9550 Adj R-Squared มีค่า 0.9100 และ Pred. R-Squared ที่มีค่า 0.7774 แสดงว่าสมการมีความน่าเชื่อถือเนื่องจากค่า R^2 เข้าใกล้ 1 และค่าทั้ง 3 มีค่าเป็นบวกและมีค่าใกล้เคียงกัน ขณะที่ค่า Adeq precision มีค่าอยู่ที่ 16.995 ซึ่งมากกว่า 4 แสดงว่า ผลการทดลองนี้เมื่อนำมาสร้างกราฟ response surface แล้วกราฟมีความน่าเชื่อถือ และสามารถใช้ในการคาดการณ์ผลการทดลองได้ กราฟรูปที่ 15, 16 และ 17 แสดงแนวโน้มค่าของปัจจัยเดียวที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของเชื้อที่ 48 ชั่วโมง คือ อุณหภูมิ, ความเร็วในการเขย่า และค่า pH

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
activity 48 h
activity 48 h = 800
--- CI Bands

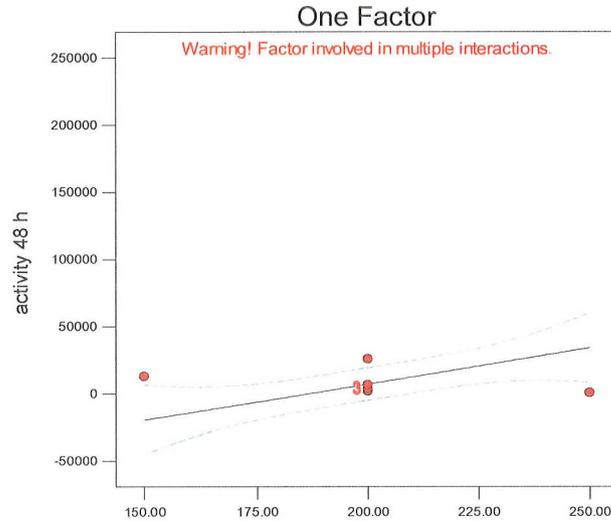
X1 = B: temperature = 37.00

Actual Factors
A: pH = 7.00
C: starter = 2.00
D: shaking speed = 200.00



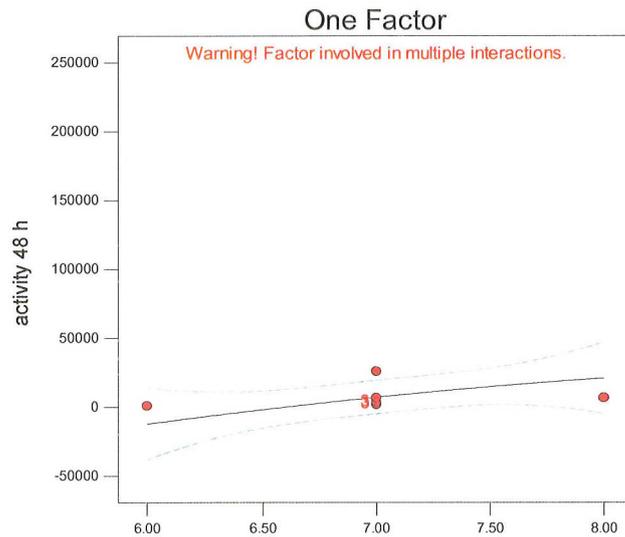
รูปที่ 15 แสดงปัจจัยอุณหภูมิที่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่เลี้ยงในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลืองที่ 48 ชั่วโมง

Factor Coding: Actual activity 48 h
 ... CI Bands
 X1 = D: shaking speed
 Actual Factors
 A: pH = 7.00
 B: temperature = 30.00
 C: starter = 2.00



รูปที่ 16 แสดงปัจจัยความเร็วในการเขย่าที่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่เลี้ยงในอาหารน้ำคั้นกากถั่วเหลืองที่ 48 ชั่วโมง

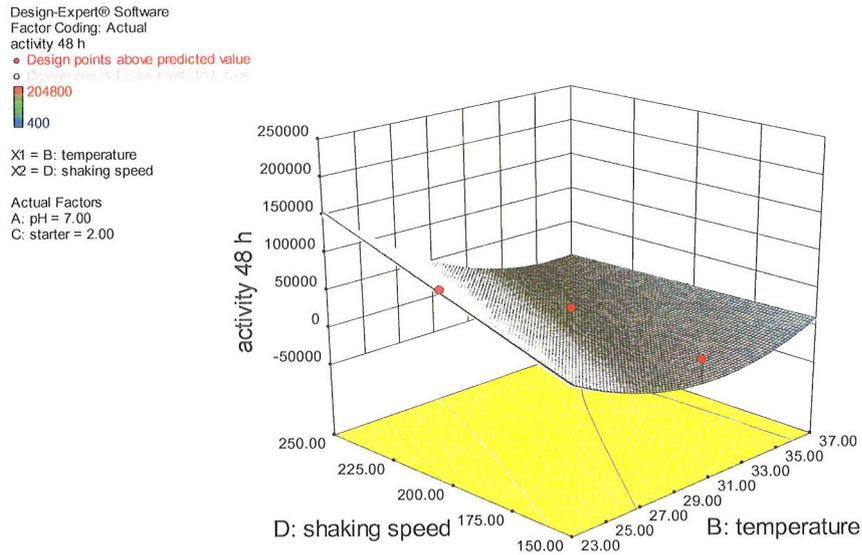
Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual activity 48 h
 ... CI Bands
 X1 = A: pH
 Actual Factors
 B: temperature = 30.00
 C: starter = 2.00
 D: shaking speed = 200.00



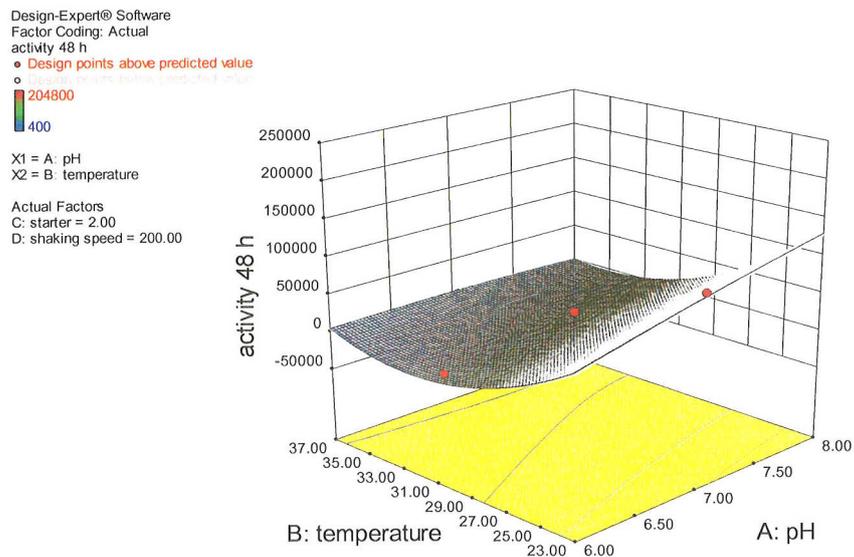
รูปที่ 17 แสดงปัจจัย pH อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่เลี้ยงในอาหารน้ำคั้นกากถั่วเหลืองที่ 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาจากกราฟที่ 15, 16 และ 17 จะเห็นว่า สำหรับอัตราการเขย่าและ pH ยังมีค่ามาก จะเกิดการสร้างสารยับยั้งมาก ตรงข้ามกับอุณหภูมิที่ยังต่ำก็ยิ่งเกิดการสร้างสารยับยั้งได้มาก โดยที่เมื่อดูจากกราฟจะเห็นว่าอุณหภูมิที่เปลี่ยนไปค่อนข้างส่งผลอย่างมากต่อการสร้างสารยับยั้ง และเมื่อพิจารณา

ปัจจัยสองปัจจัยควบคู่กัน สามารถสร้างกราฟ 3-D response surface เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่เชื้อจะสามารถสร้างสารยับยั้งได้สูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 18 - 20



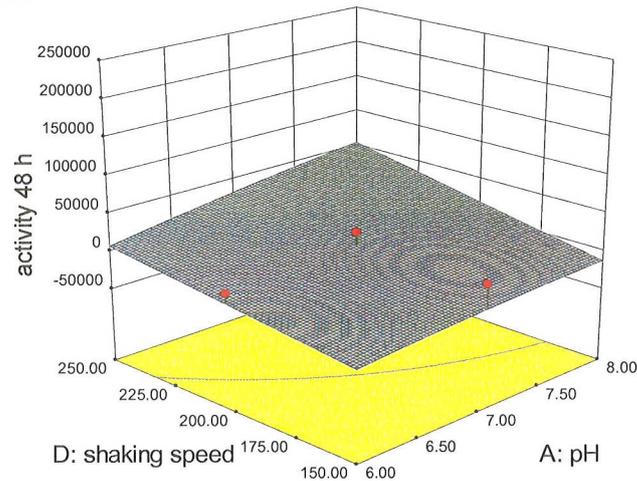
รูปที่ 18 แสดงกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface) ของการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านความเร็วในการเขย่าและอุณหภูมิร่วมกัน



รูปที่ 19 แสดงกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface) ของการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านอุณหภูมิและ pH ของอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลืองร่วมกัน



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
activity 48 h
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
204800
400
X1 = A: pH
X2 = D: shaking speed
Actual Factors
B: temperature = 30.00
C: starter = 2.00



รูปที่ 20 แสดงกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface) ของการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาปัจจัยความเร็วในการเขย่าและ pH ของอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลืองร่วมกัน

จากรูปที่ 18 – 20 แสดงพื้นที่ผิวตอบสนองเมื่อพิจารณาจากสองปัจจัยร่วมกันพบว่า ปัจจัยด้านอุณหภูมิร่วมกับความเร็วในการเขย่า ส่งผลต่อกิจกรรมการยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิกับ pH ของอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลืองขณะที่ปัจจัยร่วมระหว่าง pH อาหารกับความเร็วในการเขย่ามีผลต่อการสร้างสารยับยั้งไม่มากนัก และกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองทั้งสาม ไม่มีจุดกึ่งกลางระหว่างค่าต่ำสุดกับค่าสูงสุด เช่นเดียวกับค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ 24 ชั่วโมง เนื่องจากปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งเช่นอุณหภูมิ, ความเร็วในการเขย่า รวมทั้ง pH ค่าที่ให้ผลดีที่สุดในการเกิดกิจกรรมการยับยั้ง เป็นค่าต่ำสุดและสูงสุดที่ออกแบบใช้กับการทดลองนี้ กล่าวคือ อุณหภูมิที่ทำให้เกิดกิจกรรมการยับยั้งได้ดีที่สุด คืออุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิต่ำที่สุดที่ทำการทดลอง ในขณะที่ความเร็วในการเขย่าและ pH ของอาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลืองที่ทำให้เกิดการยับยั้งสูงสุดก็เป็นค่าที่สูงที่สุดที่ใช้ในการทดลองเช่นกัน ดังนั้นจึงต้องออกแบบการทดลองใหม่อีกครั้งเพื่อให้สามารถทำนายสถานะที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างกิจกรรมยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง

การเจริญของเชื้อ *Bacillus sp. BK9*

การเจริญของเชื้อ *Bacillus sp. BK9* ที่ 24 ชั่วโมง

ค่าทางสถิติของการออกแบบการทดลองสำหรับกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองต่อการเจริญที่ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 10)

Std.Dev.	0.51	R-Squared	0.8083	Mean	8.09
Adj R-Squared	0.6166	C.V. %	6.34	Pred. R-Squared	-0.1981
PRESS	22.99	Adeq Precision	7.150		

ตารางที่ 10 แสดงค่าทางสถิติ (ค่า coefficient, F-value และ p-value) ในการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ

Bacillus sp. BK9 ที่ 24 ชั่วโมง

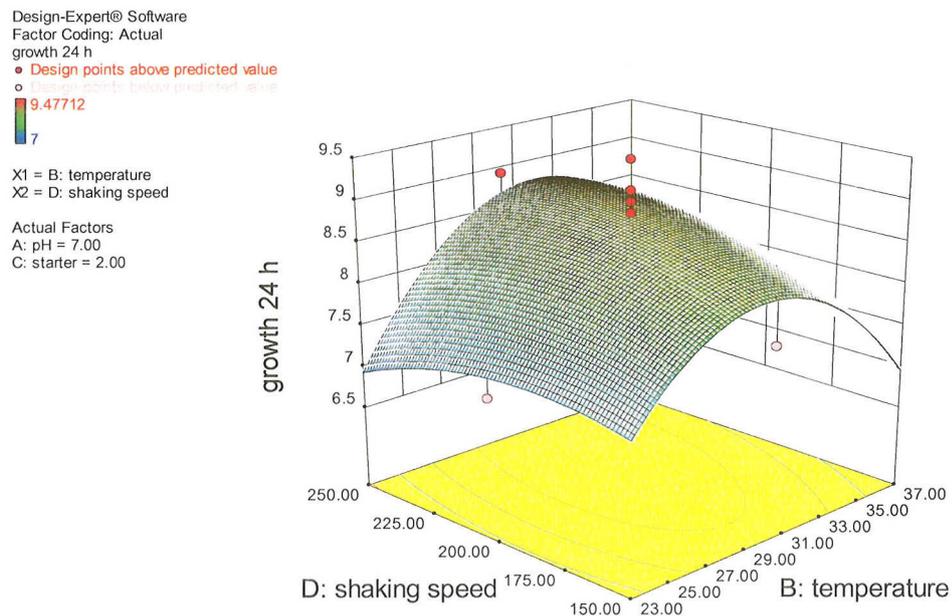
Factors	Coefficient	F-value	p-value (probe>F)
Intercept/model	8.81	4.22	0.0055
Lack of Fit F- value	-	2.42	0.2047
x_1 -pH	0.20	2.63	0.1272
x_2 -temperature	0.21	2.92	0.1093
x_3 -starter	-0.25	4.18	0.0601
x_4 -shaking speed	0.19	2.60	0.1290
$x_1 x_2$	-0.070	0.30	0.5922
$x_1 x_3$	0.087	0.47	0.5062
$x_1 x_4$	1.513E-003	1.393E-004	0.9907
$x_2 x_3$	-0.13	1.01	0.3314
$x_2 x_4$	0.37	8.56	0.0111*
$x_3 x_4$	-6.167E-003	2.316E-003	0.9623
x_1^2	0.042	0.017	0.8968
x_2^2	-1.18	13.74	0.0023*
x_3^2	0.29	0.85	0.3733
x_4^2	-0.30	0.91	0.3552

x_1, x_2, x_3, x_4 = linear effects, $x_1 x_2, x_1 x_3, x_1 x_4, x_2 x_3, x_2 x_4, x_3 x_4$ = interaction effects,

$x_1^2, x_2^2, x_3^2, x_4^2$ = quadratic effects

พิจารณาจาก Analysis of variance (ANOVA) ของ model พบว่าค่า p ที่มีค่าเท่ากับ 0.0055 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าแสดงว่า model มีความเหมาะสมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์และคาดการณ์ได้เนื่องจากมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับค่า Lack of Fit ไม่มีนัยสำคัญ โดยมีค่าเท่ากับ 0.2047 ($p > 0.1$) และค่า Adeq precision มีค่าเท่ากับ 7.150 (>4)

เมื่อพิจารณาค่า p ของแต่ละปัจจัย (linear effects) ในตารางที่ 10 จะเห็นว่าไม่มีปัจจัยใดที่ส่งผลอย่างชัดเจนกับการเจริญของเชื้อที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับค่า coefficient ที่ถึงแม้จะมีปัจจัยที่ให้ค่าเป็นบวก ได้แก่ อุณหภูมิ, ความเร็วในการเขย่า และค่า pH ของอาหารน้ำต้มกากลั่วเหลือง แต่ก็มีค่าไม่สูงนัก แสดงว่าปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้มีผลต่อการเจริญอยู่บ้าง แต่ไม่มากนัก อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิและความเร็วในการเขย่า (x_2x_4) และปัจจัยด้านอุณหภูมิในเทอมของ quadratic effect (x_2^2) พบว่ามีผลต่อการเจริญที่ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในกราฟรูปที่ 21



รูปที่ 21 แสดงกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface) ของการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านความเร็วในการเขย่าและอุณหภูมิร่วมกัน

รูปที่ 21 พบว่ากราฟมีช่วงพื้นที่ที่แสดงจุดกึ่งกลางที่เป็นจุดสูงสุด ที่ค่อนข้างชัดเจน ทำให้สามารถคาดเดาได้จากข้อมูลการทดลองนี้ว่าช่วงอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่เวลา 24 ชั่วโมงคือที่อุณหภูมิประมาณ 29–31 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราเร็วในการเขย่าในช่วง 200–250 รอบต่อนาที ซึ่งค่า

การคาดการณ์การเจริญของเชื้อสูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยสภาวะในช่วงนี้ จะอยู่ที่ประมาณ 8.7 – 8.8 log CFU/ml ซึ่งเป็นค่าที่ไม่ต่างกันมาก ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองจริงเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 200 และ 250 รอบต่อนาที จะให้ค่าการเจริญ 8.49 และ 8.93 log CFU/ml ตามลำดับ ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อที่ช่วงอุณหภูมิและความเร็วในการเขย่าที่ 29 – 31 องศาเซลเซียส และ 200–250 รอบต่อนาที จะให้ค่าการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 24 ชั่วโมงใกล้เคียงกับค่าการคาดการณ์ คืออยู่ที่ระหว่าง 8.5 – 8.9 log CFU/ml

การเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง

ค่าทางสถิติของการออกแบบการทดลองสำหรับกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองต่อการเจริญที่ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 11)

Std.Dev.	0.58	R-Squared	0.8176	Mean	8.58
Adj R-Squared	0.6353	C.V.%	6.74	Pred. R-Squared	-0.2427
PRESS	31.85	Adeq Precision	9.457		

ตารางที่ 11 แสดงค่าทางสถิติ (ค่า coefficient, F-value และ p-value) ในการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง

Factors	Coefficient	F-value	p-value (probe>F)
Intercept/model	8.52	4.48	0.0041
Lack of Fit F- value		10.75	0.0175
x ₁ -pH	-0.14	1.10	0.3111
x ₂ -temperature	0.090	0.43	0.5214
x ₃ -starter	-0.15	1.17	0.2985
x₄-shaking speed	0.87	40.65	< 0.0001*
x ₁ x ₂	0.14	0.98	0.3400
x ₁ x ₃	-0.23	2.54	0.1335
x ₁ x ₄	0.15	1.09	0.3148
x₂ x₃	0.35	5.91	0.0291*
x ₂ x ₄	-0.22	2.27	0.1541

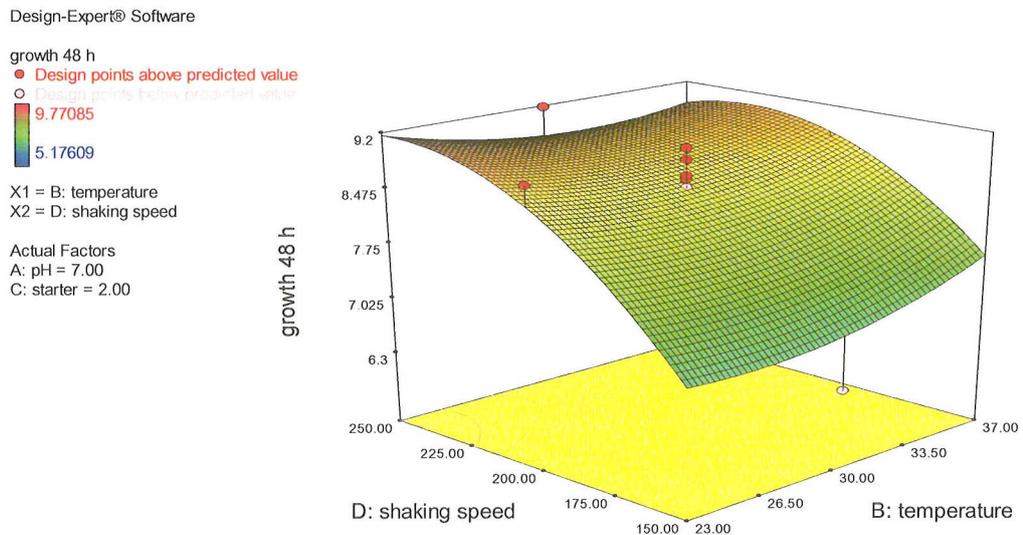
ตารางที่ 11 แสดงค่าทางสถิติ (ค่า coefficient, F-value และ p-value) ในการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง (ต่อ)

Factors	Coefficient	F-value	p-value (probe>F)
x_3, x_4	0.26	3.33	0.0894
x_1^2	0.34	0.88	0.3646
x_2^2	0.24	0.44	0.5190
x_3^2	0.11	0.094	0.7639
x_4^2	-0.59	2.70	0.1225

x_1, x_2, x_3, x_4 = linear effects, $x_1 x_2, x_1 x_3, x_1 x_4, x_2 x_3, x_2 x_4, x_3 x_4$ = interaction effects,

$x_1^2, x_2^2, x_3^2, x_4^2$ = quadratic effects

model ที่ถูกออกแบบนี้มีความน่าเชื่อถือเนื่องจากค่า p ของ model ต่ำกว่า 0.05 นอกจากนี้ค่า Adeq precision ก็มีค่ามากกว่า 4 คือมีค่าเท่ากับ 9.457 ก็แสดงว่า model นี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์พื้นที่กราฟพื้นที่ผิวตอบสนองได้เช่นกัน ในขณะที่ค่าของปัจจัยในเทอม ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญที่ 48 ชั่วโมงนั้น พบว่าค่า p ของปัจจัยความเร็วในการการเขย่าให้อากาศนั้น น้อยกว่า 0.0001 นั่นคือความเร็วในการเขย่าเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับค่า coefficient ที่ค่าของความเร็วในการเขย่ามีค่ามากที่สุด ส่วนค่าอุณหภูมิพบว่ามีค่า p เท่ากับ 0.5314 ซึ่งสูงกว่า 0.05 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่าปัจจัยร่วมพบว่า ปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิและปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ($x_2 x_3$) ที่มีค่า p น้อยกว่า 0.05 คืออยู่ที่ 0.0291 ดังนั้น อุณหภูมิน่าจะมีผลอยู่บ้างต่อการเจริญของเชื้อ BK9 ที่ 48 ชั่วโมง รูปที่ 22 แสดงกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองต่อปัจจัยร่วมระหว่างความเร็วในการเขย่ากับอุณหภูมิ จากกราฟจะเห็นว่า ความเร็วในการเขย่ามีผลเป็นอย่างมากต่อการเจริญของเชื้อที่ 48 ชั่วโมง ตั้งแต่ที่อุณหภูมิที่ 23-37 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองของการเจริญที่ 24 ชั่วโมงที่พิจารณาปัจจัยร่วมระหว่างความเร็วในการเขย่าและอุณหภูมิที่เหมือนกัน (รูปที่ 22) จะเห็นว่าแตกต่างกัน แสดงว่าการให้ความเร็วในการเขย่าและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน มีผลต่อการเจริญของเชื้อที่อายุต่างกัน



รูปที่ 22 แสดงกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface) ของการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านอุณหภูมิและความเร็วในการเขย่าร่วมกัน

จากการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 เพื่อศึกษาการสร้างกิจกรรมการยับยั้ง และการเจริญเติบโตทั้ง 29 run โดยใช้ 4 ปัจจัยเป็นตัวแปรได้แก่ ปริมาณหัวเชื้อ เริ่มต้น อุณหภูมิ pH และความเร็วของการเขย่า จะเห็นว่าปัจจัยที่มีผลทั้งต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้ง และการเจริญคือ อุณหภูมิและความเร็วในการเขย่า และมีผลอย่างมากต่อการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ ซึ่งเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 สามารถสร้างสารยับยั้งได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำที่สุดที่ทำการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ทั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ความเร็วในการเขย่าสูงสุดคือ 250 รอบต่อนาที ส่วนในแง่การเจริญของเชื้อ พบว่าความเร็วในการเขย่ามีผลที่สุดต่อการเจริญของเชื้อ โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นความเร็วสูงสุดในการทดลอง ทำให้เกิดการเจริญที่ดีที่สุด

เนื่องจากปัจจัยที่มีผลสูงสุดทั้งต่อการสร้างสารยับยั้งไม่อยู่ในช่วงที่ออกแบบการทดลองในครั้งแรก จึงทำการออกแบบการทดลองอีกครั้ง โดยเพิ่มความเร็วในการเขย่าให้ค่าสูงสุดสูงกว่า 250 รอบต่อนาที และลดอุณหภูมิขณะทำการเลี้ยงเชื้อให้ต่ำกว่า 23 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งต่อไป

การออกแบบการทดลองครั้งที่ 2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง

จากการทดลองเบื้องต้นจะเห็นว่าจากปัจจัยที่ศึกษา 4 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ ความเร็วในการเขย่า ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น และ pH ต่อการสร้างกิจกรรมการยับยั้ง และการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 พบมีเพียง 2 ปัจจัยหลัก ได้แก่ อุณหภูมิและความเร็วในการเขย่าที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้ง ดังนั้นสำหรับการออกแบบการทดลองในครั้งนี้ จะพิจารณาเฉพาะปัจจัยด้านอุณหภูมิและความเร็วในการเขย่าให้อากาศเท่านั้น โดยจะให้ค่าปริมาณหัวเชื้อและ pH คงที่ที่ 1% และ pH 7 โดยออกแบบให้มีอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 23 องศาเซลเซียส จากการจัดจำแนกเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ด้วยวิธี 16s rDNA sequence analysis พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ถูกจัดจำแนกเป็น เบื้องต้นเป็น *Bacillus subtilis* และใกล้เคียงกับสายพันธุ์อื่นๆ อีกเช่น *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus mojavenis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus vallismotis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งเชื้อ *Bacillus* ในกลุ่มนี้มีรายงานว่าสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 15 – 45 องศาเซลเซียส และ pH ในช่วง 5 – 10 (Critina *et.al.*,2005) ดังนั้นอุณหภูมิต่ำสุดที่เลือกสำหรับการออกแบบการทดลองคือ 15 องศาเซลเซียส สูงสุดคือ 31 องศาเซลเซียส โดยจะมีค่ากลางอยู่ที่ 23 องศาเซลเซียส ส่วนความเร็วในการเขย่ากำหนดให้มีความเร็วสูงสุด 300 รอบต่อนาที และค่าต่ำสุดคือ 200 รอบต่อนาที โดยจะมีค่ากลางอยู่ที่ 250 รอบต่อนาที จากการออกแบบจะได้การทดลองทั้งหมด 13 run รวมทำซ้ำจุดกลาง 5 ซ้ำ (ตารางที่ 12) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12

เนื่องจากการออกแบบการทดลองครั้งนี้ ปัจจัยลดลงเหลือสองปัจจัย โดยให้ x_1 คือปัจจัยด้านอุณหภูมิ และ x_2 เป็นปัจจัยความเร็วในการเขย่านั้น สมการค่าคาดการณ์จึงเป็นดังสมการที่ 3 ดังนี้

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (3)$$

โดยที่

Y คือค่าการคาดการณ์

b_0 คือค่าสัมประสิทธิ์หรือค่าคงที่ (intercept)

b_1 คือค่า linear coefficient ของอุณหภูมิ

b_2 คือค่า linear coefficient ของความเร็วการเขย่า

b_{11} คือค่า quadratic coefficient ของอุณหภูมิ

b_{22} คือค่า quadratic coefficient ของความเร็วการเขย่า

เขย่า

b_{12} คือค่า interaction coefficient ระหว่างอุณหภูมิและความเร็วการเขย่า

ตารางที่ 12 แสดงค่ากิจกรรมการยับยั้ง, การเจริญ และ pH ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่เลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ ในอาหารน้ำต้มกากั่วเหลือง ในการออกแบบการทดลองครั้งที่ 2 แบบ CCD

runs	Factor1 (x_1) temperature ($^{\circ}$ C)	Factor2 (x_2) speed of shaking(รอบ ต่อนาที)	Response1; activity 24 H (AU/ml)	Response2; growth 24 h (log CFU/ml)	Response3; activity 48 h (AU/ml)	Response4; growth 48 H (log CFU/ml)
4	15.00	200.00	1600	6.17	51200	9.51
13	31.00	200.00	6400	6.53	51200	9.18
1	15.00	300.00	800	6.85	51200	8.89
10	31.00	300.00	25600	8.99	51200	9.09
12	15.00	250.00	6400	8.24	202400	8.88
3	31.00	250.00	25600	6.92	102400	9.25
2	23.00	200.00	25600	8.42	102400	9.19
6	23.00	300.00	25600	8.87	51200	9.12
11	23.00	250.00	51200	7.34	204800	9.65
7	23.00	250.00	51200	7.30	204800	9.33
9	23.00	250.00	51200	7.33	204800	9.34
8	23.00	250.00	51200	7.35	204800	9.64
5	23.00	250.00	51200	7.36	204800	9.50

จากตารางที่ 12 เมื่อทำการทดลองตามสภาวะต่าง ๆ ทั้ง 13 run พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมงแตกต่างกันที่ 48 ชั่วโมง โดยที่ ที่ 24 ชั่วโมง สภาวะที่ดีที่สุดได้แก่ RUN ที่ 10 คือที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที มีค่าการเจริญที่ 8.99 log CFU/ml แต่ไม่แตกต่างมากกับที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที คืออยู่ที่ 8.87 log CFU/ml ในขณะที่เวลา 48 ชั่วโมงการเจริญของเชื้อสูงสุดอยู่ที่ 9.65 log CFU/ml ในสภาวะอุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที และไม่แตกต่างมากนักกับ run ที่ 4 ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ค่าการเจริญคือประมาณ 9.51 log CFU/ml อย่างไรก็ตามที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อสามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันทุกสภาวะ พบว่าที่

สภาวะอุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 250 รอบต่อนาที (ค่ากึ่งกลางของปัจจัยทั้งสองตัว ;level=0) ใน run ที่ 5,7,8,9 และ 11 เชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งได้สูงที่สุดทั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมงคือ เกิดกิจกรรมการยับยั้ง 51,200 และ 204,800 ตามลำดับ รองลงมาคือเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส คือ 6,400 และ 204,800 AU/ml ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ (run ที่ 12) จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการออกแบบการทดลองสำหรับกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองต่อกิจกรรมการยับยั้งและการเจริญที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงจะได้ค่าทางสถิติ และการคาดการณ์ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 13

Std.Dev.	0.58	R-Squared	0.8176	Mean	8.58
Adj R-Squared	0.6353	C.V.%	6.74	Pred. R-Squared	-0.2427
PRESS	31.85	Adeq Precision	9.457		

ตารางที่ 13 ค่าสถิติของสมการคาดการณ์ผลการทดลอง

Response	R-Squared	Adj R-Squared	Pred. R-Squared	Adeq Precision
สารยับยั้ง (24 ชม)	0.9842	0.9112	0.6238	12.796
สารยับยั้ง (48 ชม)	0.9271	0.8750	0.2809	10.101
การเจริญ (24 ชม)	0.4774	0.1042	-3.5295	3.725
การเจริญ (48 ชม)	0.5768	0.2746	-1.5875	4.393

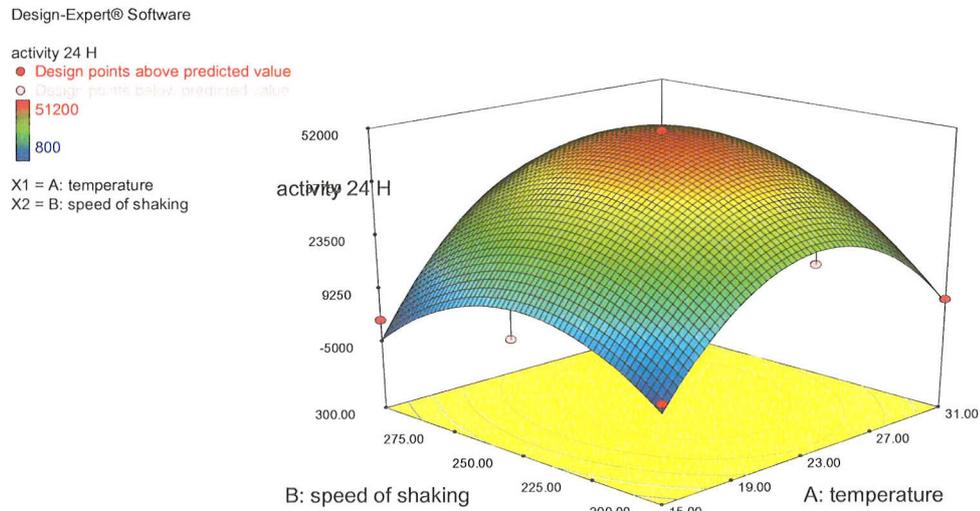
จากตารางจะเห็นว่าค่า R-Square ของการเจริญทั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมงมีค่าต่ำกว่า 0.75 (ค่าที่ควรเข้าใกล้ 1) Adj R-Squared และ Pred R-Squared ยังมีค่าต่างจาก R-Square มาก (3 ค่านี้ควรใกล้เคียงกัน และควรมีค่าเป็นบวก) ค่า Adeq-Precision (signal to noise ratio ค่าควรมากกว่า 4) เท่ากับและน้อยกว่า 4 ซึ่งทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าการ ออกแบบการทดลองในครั้งที่ 2 นั้น model ไม่มีนัยสำคัญต่อการเจริญของเชื้อจึงไม่เหมาะที่จะใช้วิเคราะห์ค่าการเจริญทั้งที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ส่วนค่าการสร้างสารยับยั้งพบว่า ค่าต่างๆ ซึ่งให้เห็นว่าข้อมูลผลการทดลองมีความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวแทนของชุดข้อมูลได้ และสมการที่ได้เหมาะสมต่อการทำนายค่าตอบสนอง จึงจะทำการวิเคราะห์ข้อมูลเฉพาะการสร้างสารยับยั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่านั้น ตารางที่ 14 แสดงค่าทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งที่เวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 14 แสดงค่าทางสถิติ (ค่า coefficient, F-value และ p-value) ในการวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 24 ชั่วโมง

Factors	Coefficient	F-value	p-value (probe>F)
Intercept/model	48689.66	25.62	0.0002
x_1 - temperature	8133.33	10.56	0.0141
x_2 - shaking speed	3066.67	1.50	0.2601
x_1^2	5000.00	2.66	0.1469
x_2^2	-26413.79	51.27	0.0002
$x_1 x_2$	-16813.79	20.77	0.0026

x_1, x_2 = linear effects, $x_1 x_2$ = interaction effects, x_1^2, x_2^2 = quadratic effects

จากค่าทางสถิติในตารางที่ 14 เมื่อพิจารณาค่า model หรือการออกแบบการทดลองพบว่ามีนัยสำคัญต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ 24 ชั่วโมง เนื่องจากมีค่าน้อยกว่า 0.05 และพบว่าอุณหภูมิเท่านั้นที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง โดยมีค่า p เท่ากับ 0.0141 แต่เมื่อสองปัจจัยนี้อยู่ร่วมกัน ($x_1 x_2$) ก็จะมีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งเช่นกัน เนื่องจากค่า p น้อยกว่า 0.05 คือมีค่าอยู่ที่ 0.0026 และปัจจัยความเร็วในการเขย่าในเทอม quadratic effect (x_2^2) ก็มีผลเช่นเดียวกันเนื่องจากค่า p มีค่าเพียง 0.0002 โดยอุณหภูมิมีผลต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งมากกว่าความเร็วในการเขย่า รูปที่ 23 แสดงพื้นที่ผิวตอบสนองของการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 24 ชั่วโมง ต่ออุณหภูมิและอัตราการเขย่าโดยจะเห็นว่าเชื้อจะมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 23 – 27 องศาเซลเซียส และที่อัตราเร็วในการเขย่า 250-260 รอบต่อนาที



รูปที่ 23 แสดงกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface) ของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 24 ชั่วโมง ต่อ อุณหภูมิ และอัตราการเขย่า

จากการนำผลการทดลองที่ได้ตามตารางที่ 12 จากการวางแผนแบบ CCD โดยใช้ ANOVA ใน โปรแกรม design expert มาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาสมการที่แสดงความสัมพันธ์ของค่าตอบสนอง (กิจกรรมการยับยั้ง) และปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง (อุณหภูมิและอัตราการเขย่า) โดยได้สมการค่าตอบสนองของการยับยั้ง จะได้สมการ regression ดังสมการที่ 4

กิจกรรมการยับยั้ง (24 ชม)

$$Y = 48689.66 + 8133.33x_1 + 3066.67x_2 + 5000 x_1 x_2 - 26413.79 x_1^2 - 16813.799x_2^2 \quad (4)$$

จากสมการสามารถทำนายค่ากิจกรรมการยับยั้งเปรียบเทียบกับค่าจริงที่ได้จากการทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 15 และจากการให้โปรแกรมทำการวิเคราะห์หาสถานะที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดของที่ 24 ชั่วโมง ได้อุณหภูมิที่เหมาะสมคือที่ 24.32 องศาเซลเซียส และความเร็วในการเขย่าให้อากาศ 255.82 รอบต่อนาที จะให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 49,537.7 AU/ml ค่า desirability 0.967 (96.7%) โดยเป็นจุดกึ่งกลาง หรือจุดสูงสุดของกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองดังแสดงในรูปที่ 25 จากตารางที่ 15 จะเห็นว่าค่าคาดการณ์จะมีค่าต่ำกว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ได้จากการทดลองที่ได้ค่าสูงสุด คือได้กิจกรรมการยับยั้ง 51200 Au/ml ที่สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ตารางที่ 15 แสดงค่าจริงที่ได้จากการทดลองและค่าคาดการณ์จากโปรแกรมของค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ 24 ชั่วโมง

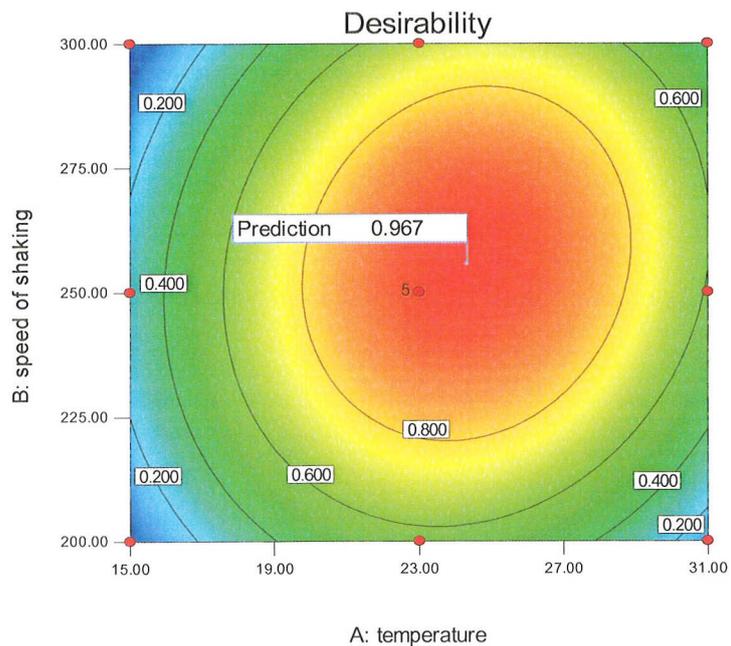
Response 1 activity 24 H Transform: None

Diagnostics Case Statistics

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Internally	Externally	Influence on	Cook's Distance	Run Order
					Studentized Residual	Studentized Residual	Fitted Value DFFITS		
1	1600.00	-737.93	2337.93	0.790	0.833	0.812	1.576	0.435	4
2	6400.00	5528.74	871.26	0.790	0.310	0.289	0.561	0.060	13
3	800.00	-4604.60	5404.60	0.790	1.925	2.597	* 5.04	* 2.33	1
4	25600.00	21662.07	3937.93	0.790	1.402	1.531	* 2.97	* 1.23	10
5	6400.00	14142.53	-7742.53	0.494	-1.776	-2.218	* -2.19	0.514	12
6	25600.00	30409.20	-4809.20	0.494	-1.103	-1.124	-1.111	0.198	3
7	25600.00	28809.20	-3209.20	0.494	-0.736	-0.709	-0.701	0.088	2
8	25600.00	34942.53	-9342.53	0.494	-2.143	-3.382	* -3.34	0.748	6
9	51200.00	48689.66	2510.34	0.172	0.450	0.423	0.193	0.007	11
10	51200.00	48689.66	2510.34	0.172	0.450	0.423	0.193	0.007	7
11	51200.00	48689.66	2510.34	0.172	0.450	0.423	0.193	0.007	9
12	51200.00	48689.66	2510.34	0.172	0.450	0.423	0.193	0.007	8
13	51200.00	48689.66	2510.34	0.172	0.450	0.423	0.193	0.007	5

* Exceeds limits

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Desirability
 ● Design Points
 1
 0
 X1 = A: temperature
 X2 = B: speed of shaking



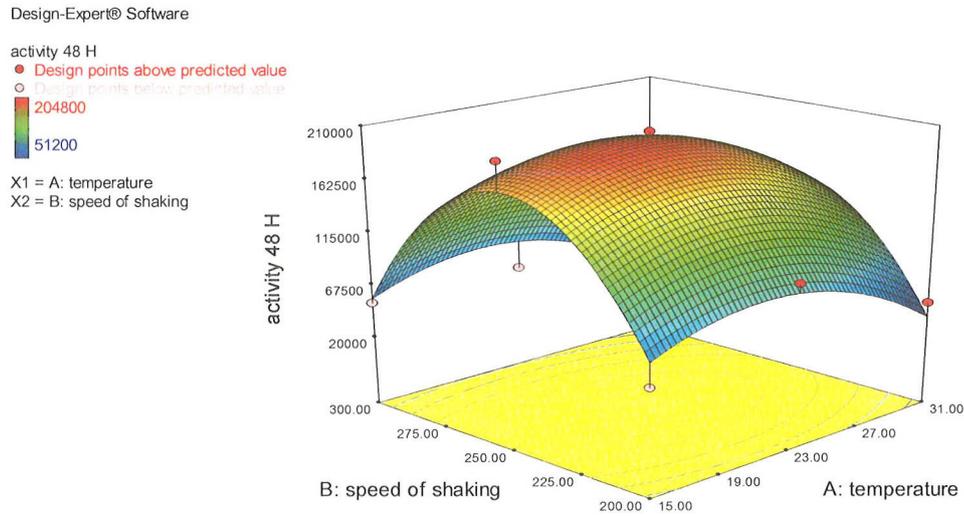
รูปที่ 24 ค่าอุณหภูมิ และอัตราการเขย่าที่คาดว่าจะให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง บนกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง

ตารางที่ 16 แสดงค่าทางสถิติ (ค่า coefficient, F-value และ p-value) ในการวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง

Factors	Coefficient	F-value	p-value (probe>F)
Intercept/model	2.013E+005	17.81	0.0007
x_1 - temperature	-17066.67	2.54	0.1552
x_2 - shaking speed	-8533.33	0.63	0.4519
x_1^2	0.000	0.000	1.0000
x_2^2	-38841.38	6.05	0.0435
$x_1 x_2$	-1.156E+005	53.63	0.0002*

x_1, x_2 = linear effects, $x_1 x_2$ = interaction effects, x_1^2, x_2^2 = quadratic effects

จากตารางที่ 16 ค่าทางสถิติของการยับยั้งที่ 48 ชั่วโมง ที่ค่า model มีค่าน้อยกว่า 0.05 คือมีค่าที่ 0.0007 นั่นคือการออกแบบนี้มีนัยสำคัญต่อการสร้างกิจกรรมของเชื้อที่ 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับค่า Adecq precision มากกว่า 4 คือ 10.101 (ตารางที่ 13) แสดงว่าการออกแบบการทดลองนี้น่าเชื่อถือสำหรับใช้คาดการณ์การเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อที่ 48 ชั่วโมง แต่ปัจจัยทั้ง 2 ชนิดคือ อุณหภูมิและความเร็วในการเขย่า ไม่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งเมื่อพิจารณาจากทั้งค่า p และ ค่า coefficient ในเทอมของ linear effect แต่เมื่อพิจารณาปัจจัยร่วมพบว่าทั้งอุณหภูมิและอัตราการเขย่า ($x_1 x_2$) มีผลต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้ง และในเทอม quadratic effect พบว่าปัจจัยความเร็วในการเขย่าให้อากาศ (x_2^2) มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้ง เมื่อดูจากค่า p ที่มีค่าน้อยกว่า 0.05 คือมีค่าอยู่ที่ 0.0002 และ 0.0435 ตามลำดับรูปที่ 25 แสดงผลของอุณหภูมิและอัตราการเขย่าต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาจากกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองเห็นว่า ความเร็วในการเขย่าที่ทำให้เกิดกิจกรรมการยับยั้งที่ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 48 ชั่วโมง คือช่วงความเร็วที่ประมาณ 250 รอบต่อนาที ขณะที่อุณหภูมิที่มีผลทำให้เกิดกิจกรรมการยับยั้งที่ดีที่สุดคืออยู่ในช่วง 19 – 27 องศาเซลเซียส



รูปที่ 25 แสดงกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface) ของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ต่ออุณหภูมิ และอัตราการเขย่าที่เวลา 48 ชั่วโมง

จากการนำผลการทดลองที่ได้ตามตารางที่ 12 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาสมการที่แสดงความสัมพันธ์ของค่าตอบสนอง (กิจกรรมการยับยั้ง) และปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง (อุณหภูมิ และอัตราการเขย่า) โดยได้สมการค่าตอบสนองของการยับยั้ง จะได้สมการ regression ดังนี้

กิจกรรมการยับยั้ง (48 ชม)

$$Y = (-2.91908 \times 10^6) + 25783.90805x_1 + 22957.60920x_2 + (1.35969 \times 10^{-12}) x_1 x_2 - 606.8955 x_1^2 - 46.5655 x_2^2$$

เมื่อ Y เป็นค่าคาดการณ์ของปริมาณสารยับยั้ง และ x_1 และ x_2 เป็นปัจจัยที่ใช้คืออุณหภูมิ และอัตราการเขย่า ตามลำดับ

ตารางที่ 17 แสดงค่าทำนายกิจกรรมการยับยั้งเปรียบเทียบกับค่าจริงที่ได้จากการทดลองที่เวลา 48 ชั่วโมง จากการให้โปรแกรมทำการวิเคราะห์หาสถานะที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดของที่ 48 ชั่วโมง ได้สถานะที่เหมาะสมคืออุณหภูมิ 21.25 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 248.14 รอบต่อนาที จะให้ค่า activity สูงสุดที่ 203,301 AU/ml ซึ่งเป็นจุดกึ่งกลางหรือจุดสูงสุดของกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองดังแสดงในรูปที่ 26

ตารางที่ 17 แสดงค่าจริงที่ได้จากการทดลอง และค่าคาดการณ์จากโปรแกรมของค่ากิจกรรมการยับยั้ง ที่ 48 ชั่วโมง

Response 3 activity 48 H

Transform: None

Diagnostics Case Statistics

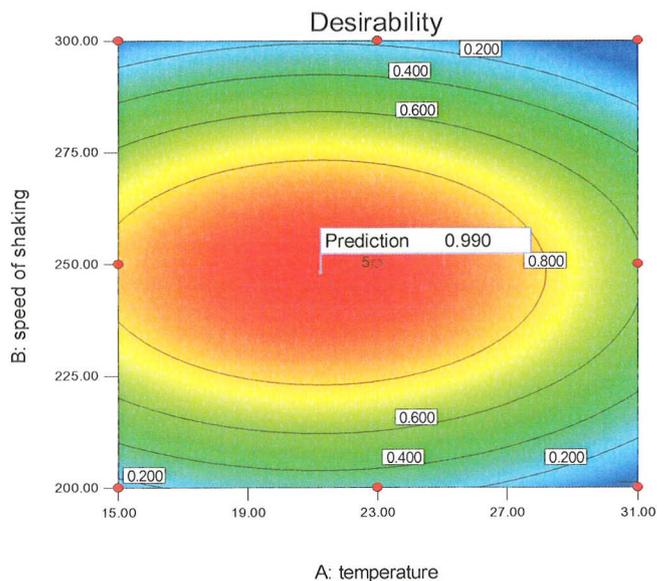
Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Internally	Externally	Influence on	Cook's Distance	Run Order
					Studentized Residual	Studentized Residual	Fitted Value DFFITS		
1	51200.00	72386.21	-21186.21	0.790	-1.763	-2.188	* -4.25	* 1.95	4
2	51200.00	38252.87	12947.13	0.790	1.077	1.092	* 2.12	0.728	13
3	51200.00	55319.54	-4119.54	0.790	-0.343	-0.320	-0.621	0.074	1
4	51200.00	21186.21	30013.79	0.790	2.497	** 6.99	* 13.58	* 3.91	10
5	2.048E+005	1.795E+005	25305.75	0.494	1.356	1.462	1.445	0.299	12
6	1.024E+005	1.454E+005	-42960.92	0.494	-2.302	** -4.32	* -4.27	0.863	3
7	1.024E+005	94160.92	8239.08	0.494	0.441	0.415	0.410	0.032	2
8	51200.00	77094.25	-25894.25	0.494	-1.387	-1.509	-1.491	0.314	6
9	2.048E+005	2.013E+005	3531.03	0.172	0.148	0.137	0.063	0.001	11
10	2.048E+005	2.013E+005	3531.03	0.172	0.148	0.137	0.063	0.001	7
11	2.048E+005	2.013E+005	3531.03	0.172	0.148	0.137	0.063	0.001	9
12	2.048E+005	2.013E+005	3531.03	0.172	0.148	0.137	0.063	0.001	8
13	2.048E+005	2.013E+005	3531.03	0.172	0.148	0.137	0.063	0.001	5

** Case(s) with |External Stud. Residuals| > 4.24

* Exceeds limits

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Desirability
 • Design Points
 1
 0

X1 = A: temperature
 X2 = B: speed of shaking



รูปที่ 26 ค่าอุณหภูมิและอัตราเร็วในการเขย่าที่คาดว่าจะให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง บนกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง



ในการทำนายสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญจากการใช้ข้อมูลในการทดลองครั้งแรก (29 run) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 24 ชั่วโมงคือ อุณหภูมิ 31.4 องศาเซลเซียส โดยเขย่าให้อากาศ 206 รอบต่อนาที pH 7.68 ปริมาณหัวเชื้อ 1% จะให้ค่าการเจริญสูงสุดที่ 9.48 log CFU/ml ซึ่งเป็นจุดสูงสุดของกราฟ (รูปที่ 27) โดยที่สภาวะดังกล่าวเชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งได้น้อย โดยจะได้ค่ากิจกรรมการยับยั้ง 3500 AU/ml (ค่าทำนาย) ส่วนที่เวลา 48 ชั่วโมง สภาวะที่เหมาะสมที่โปรแกรมทำการวิเคราะห์ออกมาได้แก่ pH 8.0 ปริมาณหัวเชื้อ 1% อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส โดยเขย่าให้อากาศ 250 รอบต่อนาที จะให้ค่าการเจริญสูงสุดที่ 9.94 log CFU/ml โดยเป็นจุดสูงสุดของกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองดังรูปที่ 28 โดยที่สภาวะนี้เป็นสภาวะเดียวกับที่ทำให้เชื้อสร้างกิจกรรมการยับยั้งได้ดีทั้งที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงอีกด้วย ดังนั้นปัจจัยหลักที่ต้องควบคุมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ก็คือ อุณหภูมิและความเร็วในการเขย่า เพื่อให้ได้กิจกรรมการยับยั้งของเชื้อและการเจริญสูงสุด จึงกำหนดสภาวะการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ให้อุณหภูมิเท่ากับ 23 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที pH เริ่มต้นระหว่าง 6-8 และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 1% โดยจะใช้สภาวะนี้ในการขยายเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตต่อไป

Design-Expert® Software

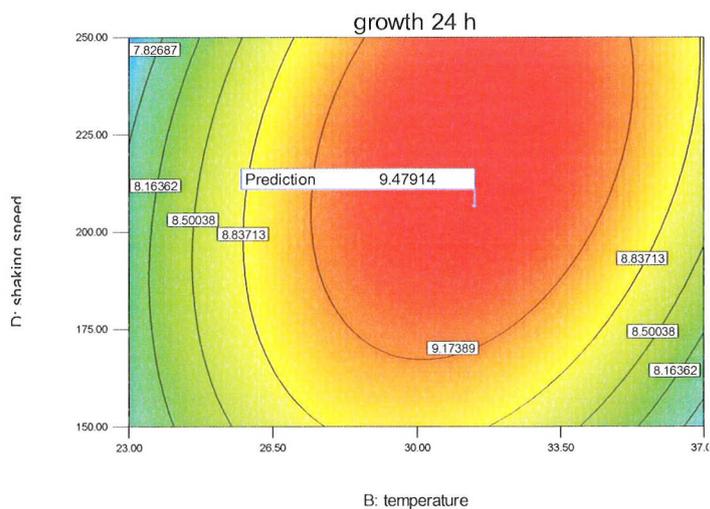
growth 24 h

9.47712

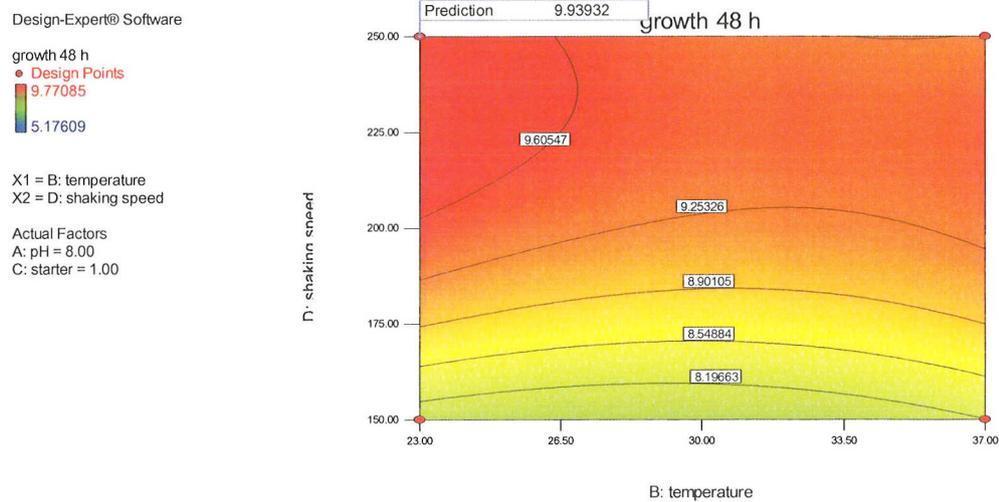
7

X1 = B: temperature
X2 = D: shaking speed

Actual Factors

A: pH = 7.68
C: starter = 1.00

รูปที่ 27 แสดงค่าอุณหภูมิและอัตราการเขย่าที่คาดว่าจะให้ค่าการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง บนกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง โดยมีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.68 และปริมาณหัวเชื้อ 1%



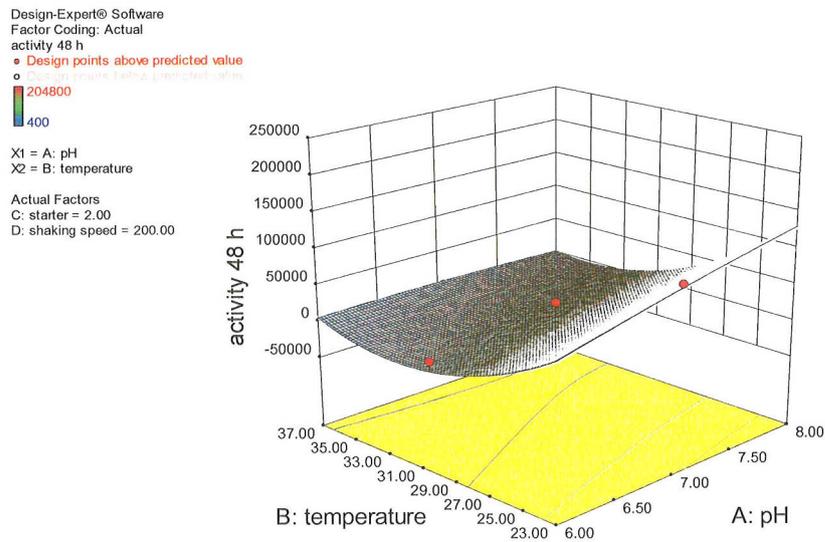
รูปที่ 28 แสดงค่าอุณหภูมิและอัตราการเขย่าที่คาดว่าจะให้ค่าการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง บนกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง โดยมีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 8 และปริมาณหัวเชื้อ 1%

จากการทดลองด้วยการออกแบบการทดลองทั้ง 2 ครั้ง เพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 เพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมการยับยั้งและการเจริญสูงสุด เพื่อใช้เป็นสภาวะในการเพิ่มปริมาณการผลิต โดยการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก พบว่าสำหรับค่ากิจกรรมการยับยั้งควรใช้การออกแบบการทดลองในครั้งที่ 2 มาวิเคราะห์การออกแบบการทดลอง แม้ว่าการออกแบบทั้งสองครั้งค่า model การออกแบบจะมีนัยสำคัญต่อค่ากิจกรรมการยับยั้ง แต่เมื่อพิจารณาจากกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองแล้วพบว่ากราฟที่ได้จากการออกแบบในครั้งที่ 2 เห็นจุดกึ่งกลางสูงสุดชัดเจน ทำให้การคาดการณ์ค่ากิจกรรมการยับยั้งออกมาเชื่อถือได้ สำหรับค่าการเจริญ จะใช้การออกแบบในครั้งแรก วิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง เนื่องจากการออกแบบการทดลองในครั้งที่ 2 นั้น model ไม่มีนัยสำคัญต่อการเจริญของเชื้อจึงไม่เหมาะที่จะใช้วิเคราะห์ค่าการเจริญทั้งที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง และการออกแบบการทดลองในครั้งที่ 1 ค่าทางสถิติของการออกแบบ หรือ model แสดงว่ามีนัยสำคัญต่อการเจริญ และกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองสามารถเห็นจุดกึ่งกลางสูงสุด (contour) ของกราฟ

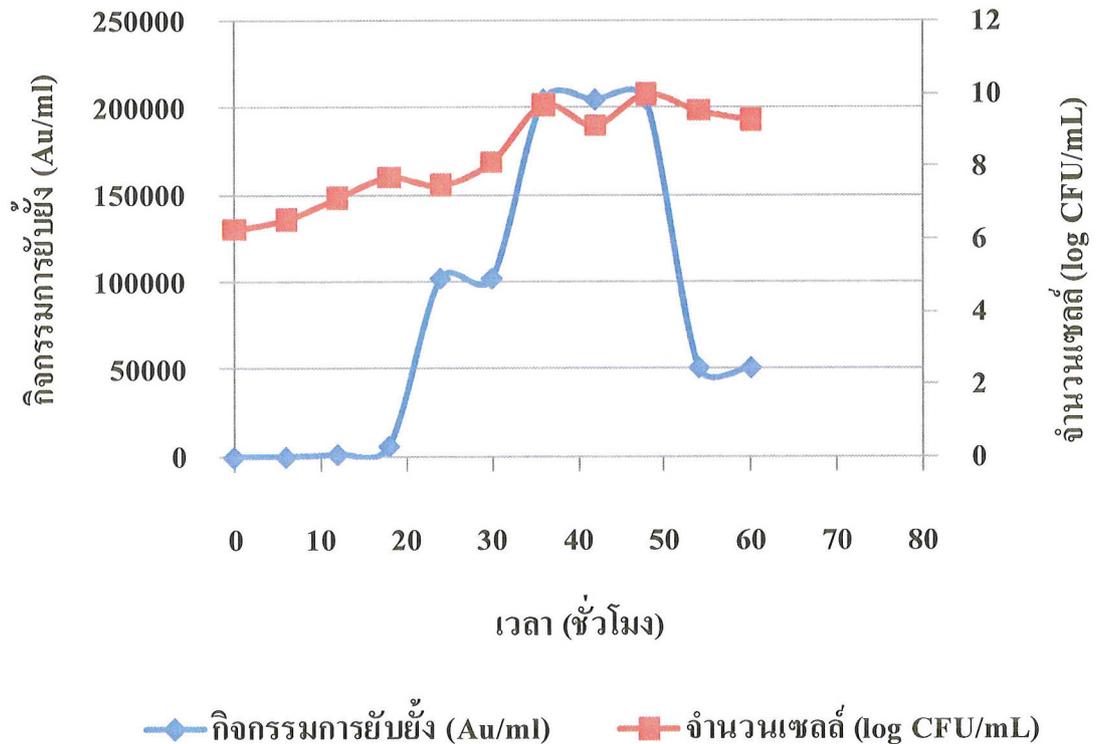
3.9 ผลการเจริญและการสร้างสารยับยั้งในถังหมักขนาด 2 ลิตร

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งในอาหารสุตรน้ำต้มกากั่ว เหลืองในพลาสติก พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. BK9 มีการเจริญและการสร้างสารยับยั้งได้ดีที่สุดในสภาวะที่ pH 7 อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 1 % และอัตราการเขย่าโดยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จึงทำการศึกษาการเจริญและการสร้างสารยับยั้งในสเกลที่ใหญ่ขึ้น เพื่อนำไป

ประยุกต์ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม โดยทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีน้ำต้มกากถั่วเหลืองความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ต้มเป็นเวลา 10 นาที ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 23 องศาเซลเซียส ส่วนค่า pH ไม่ได้ทำการปรับเนื่องจากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าที่ pH 6-8 ไม่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง (รูปที่ 29) และอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลืองหลังฆ่าเชื้อจะมี pH เริ่มต้นประมาณ 6.0 และในการหมักไม่มีการควบคุม pH ในการหมักให้อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1 vvm เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากการวัดการเจริญและการสร้างสารยับยั้งได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 30 และผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและ pH ดังแสดงในรูปที่ 29



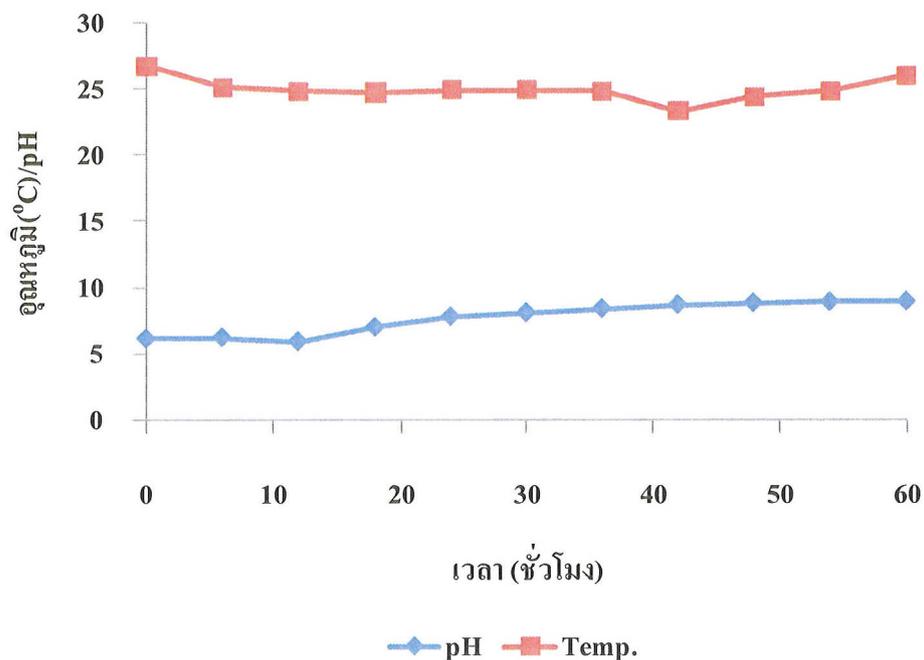
รูปที่ 29 แสดงกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface) ของการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านอุณหภูมิและ pH ของอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลืองร่วมกัน



รูปที่ 30 แสดงการเจริญและกิจกรรมของสารยับยั้งจากเชื้อ *Bacillus* sp.BK9 ในอาหารน้ำดื่มภาคั่ว เหลืองเข้มขึ้น 50 กรัมต่อลิตร ต้ม 10 นาที ปริมาตร 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 3 ลิตร และสภาวะที่เหมาะสม โดยให้อากาศ 1 VVM อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที

จากกราฟรูปที่ 30 จะเห็นว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งของเชื้อในถังหมัก 2 ลิตรมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทดลองในระดับฟลาสก์ โดยในฟลาสก์วัดค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมงได้เท่ากับ 51,200 และ 20,4800 AU/ml ในขณะที่ในถังหมักวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งที่เวลา 24 ชั่วโมงได้เท่ากับ 102,400 AU/ml และสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 204,800 AU/ml จากการติดตามการเจริญและการสร้างสารยับยั้งทุก 6 ชั่วโมง พบว่าเชื้อเริ่มสร้างสารยับยั้งที่เวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อเจริญเข้าสู่ exponential phase และเข้าสู่ช่วง stationary phase ที่เวลา 36 โดยมีปริมาณเซลล์อยู่ที่ 9.68 log CFU/ml และค่อนข้างคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 60 แสดงว่าเชื้อมีการสร้างสารยับยั้งไปพร้อมกับการเจริญ (growth associated pattern) ซึ่งเป็นลักษณะการสร้างสารพวกแบคทีเรียโอซิน การสร้างสารแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียแลคติกส่วนมากมีรายงานว่า เป็นสาร primary metabolite โดยจะเริ่มสังเคราะห์ในช่วง exponential growth phase และสูงสุดในช่วงกลางหรือปลายช่วง exponential phase หรือต้น stationary phase ซึ่งจะต่างจากสารพวกสารปฏิชีวนะ ซึ่งจัดเป็นกลุ่ม secondary metabolite ที่จะมี

รูปแบบการสร้างสารยับยั้งแบบ non-growth associated คือเริ่มมีการสร้างสารยับยั้งเมื่อเชื้อเจริญในช่วง stationary phase หรือ death phase (Parente et al., 1994; Mortvedt-Abildgaard et al., 1995; Mataragas et al., 2003) และจากกราฟจะเห็นว่าเชื้อมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมงซึ่งเป็นช่วงต้น stationary phase เท่ากับ 204,800 AU/ml และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 48 จากนั้นจึงค่อยลดลงมาอยู่ที่ 51,200 AU/ml ในชั่วโมงที่ 54 และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 60 การลดลงของกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกมีรายงานว่าเกิดจากหลายสาเหตุ เช่นการถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (De Vuyst and Vandamme, 1992; Parente et al., 1994) และการดูดซับของสารยับยั้งที่ผิวเซลล์ของเชื้อที่ผลิตสารยับยั้ง (Yang et al., 1992; De Vuyst et al., 1996; Callewaert et al., 1999) ซึ่งการรู้ถึงระยะเวลาการสร้างสารยับยั้งได้สูงสุดและเวลาที่เริ่มลดกิจกรรมการยับยั้งลงมีความสำคัญในการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งให้ได้ปริมาณสารยับยั้งสูงสุดเมื่อผลิตในระดับ large scale



รูปที่ 31 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและ pH ในถังหมักขนาด 3 ลิตร

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของ pH และอุณหภูมิ พบว่าค่า pH (รูปที่ 31) มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อจากเริ่มต้นที่ 6.1 เป็น 8.9 ในชั่วโมงที่ 60 โดยที่ชั่วโมงที่ 36-48 ซึ่งเชื้อมีการเจริญและการสร้างสารยับยั้งสูงสุด pH ของอาหารมีค่าเท่ากับ 8.36-8.79 แสดงว่าเชื้อยังสามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งได้ดีที่ pH ช่วงนี้ ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าที่ pH 9 กิจกรรมการ

ยับยั้งของเชื้อจะต่ำกว่าที่ pH 7 (รูปที่ 11) แต่ไม่มีผลต่อการเจริญ (รูปที่ 10) ในการเตรียมอาหารน้ำดื่ม กากถั่วเหลือง จะมี pH เริ่มต้นประมาณ 6-6.5 ซึ่งจากที่กล่าวมาแล้วว่า pH ในช่วง pH 6-8 ไม่มีผลต่อการ สร้างสารยับยั้ง ส่วนอุณหภูมิของถังหมักนั้น เนื่องจากระบบทำความเย็นของถังหมักเป็นแบบน้ำหล่อ เย็นรอบนอกตัวถังหมัก ทำให้ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิให้คงที่เมื่อตั้งค่าอุณหภูมิต่ำ ๆ ได้ ซึ่งอุณหภูมิ ของถังหมักที่วัดค่าได้จะอยู่ที่ประมาณ 24 – 25 องศาเซลเซียส ในช่วง 6 – 54 ชั่วโมง ซึ่งการ เปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงนี้จะไม่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง เนื่องจากการทดลองในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้โปรแกรม design expert ช่วยคาดการณ์สภาวะที่เหมาะสมต่อการทดลอง พบว่า อุณหภูมิในช่วง 19 – 25 องศาเซลเซียส ที่การเขย่า 250 รอบต่ออนาที เชื้อจะให้ค่ากิจกรรมการ ยับยั้งใกล้เคียงกันในช่วง 190,000 – 203,000 AU/ml (red zone) (รูปที่ 26)

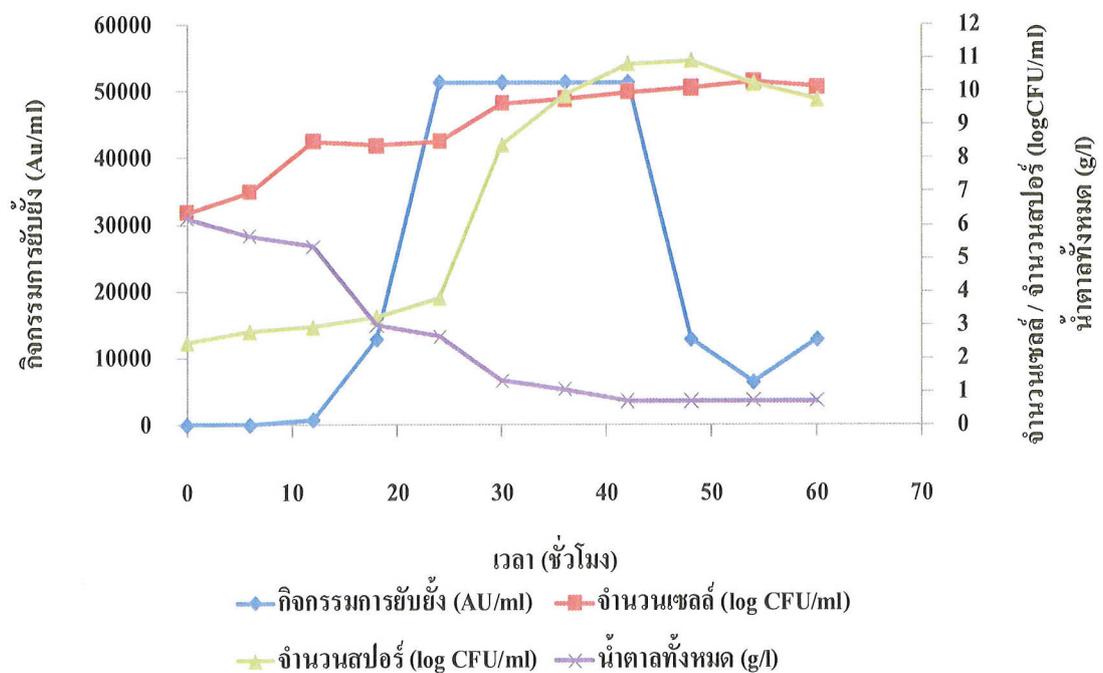
3.10 ผลการศึกษาการเจริญและการสร้างสารยับยั้งในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ผลการศึกษาการเพิ่มขนาดการหมักในการผลิตสารยับยั้ง โดยใช้อาหารน้ำดื่มกากถั่วเหลือง 3 ลิตร หมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีสภาวะการหมักเช่นเดียวกับการหมักในถังหมัก 2 ลิตร แสดงในรูปที่ 32 และรูปที่ 33 โดยรูปแบบการเจริญพบว่าคล้ายกับการหมักในถังหมัก 2 ลิตร โดยเชื้อจะเจริญเข้าสู่ exponential phase อย่างรวดเร็วภายใน 20 ชั่วโมง และเข้าสู่ stationary phase ที่เวลาประมาณ 30 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ $9.65 \log \text{CFU/ml}$ และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อหมักครบ 60 ชั่วโมง และมีปริมาณ เซลล์สูงสุดมากกว่าในถังหมักขนาด 2 ลิตร เล็กน้อย โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุดที่เวลา 54 ชั่วโมงเท่ากับ $10.29 \log \text{CFU/ml}$ ขณะที่ในถังหมัก 2 ลิตร ให้ปริมาณเชื้อสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ $9.97 \log \text{CFU/ml}$ ในการทดลองได้ศึกษาจำนวนสปอร์ของเชื้อพบว่าเชื้อเริ่มสร้างสปอร์ตั้งแต่วเวลา 6 ชั่วโมง และค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึงเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนสปอร์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแบบ exponential ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อเริ่มมีการเจริญคงที่เข้าสู่ stationary phase จนถึงเวลา 40 ชั่วโมง และสูงขึ้นอีกเล็กน้อยที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีจำนวนสปอร์สูงสุดเท่ากับ $10.93 \log \text{CFU/ml}$ และเริ่มลดลงหลัง 48 ชั่วโมง เชื้อ *Bacillus* จัดเป็นเชื้อที่สามารถสร้างสปอร์ที่มีความทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดี การเตรียมเชื้อ โดย เก็บในรูปสปอร์จะสามารถยืดอายุการเก็บเชื้อเพื่อการใช้งานได้นานกว่าในรูป vegetative cell

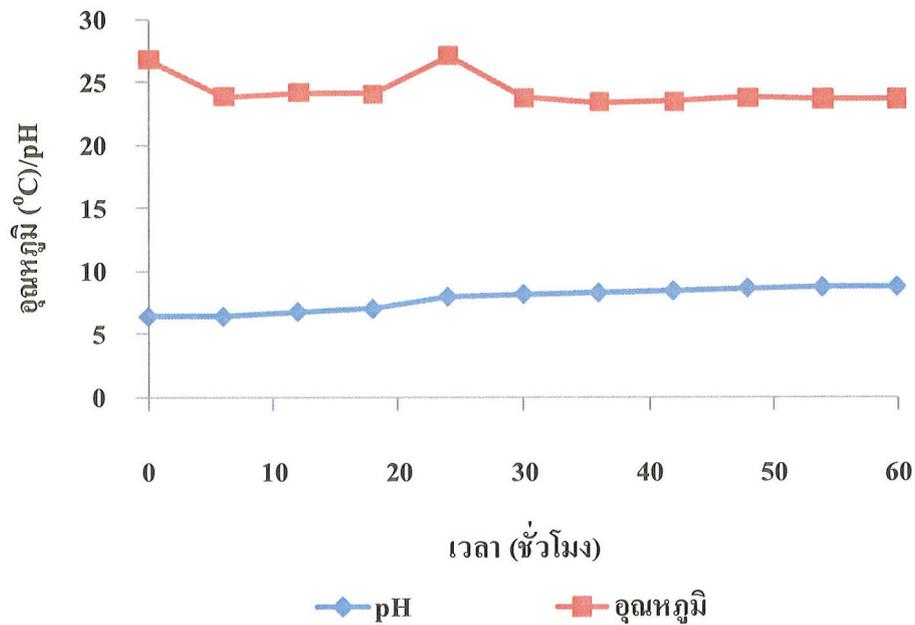
การสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตรมีแนวโน้มที่ แตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร เชื้อสามารถ สร้างสารยับยั้งได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 – 48 คือได้ถึง $204,800 \text{ AU/ml}$ และเริ่มลดลงหลังชั่วโมงที่ 48 โดยมีกิจกรรมลดลงเหลือ $51,200 \text{ AU/ml}$ ขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร เชื้อสร้างสารยับยั้ง ได้น้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในถัง 2 ลิตร โดยเชื้อมีการสร้างสารยับยั้งสูงสุด $51,200 \text{ AU/ml}$ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และคงที่จนถึงเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะลดลงอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับการหมักในถังหมัก 2 ลิตร

ค่าน้ำตาลทั้งหมดที่เปลี่ยนแปลงเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ลดลงอย่างรวดเร็ว ในช่วงชั่วโมงที่ 10 – 28 ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญที่ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วงเวลาดังกล่าวนี้เช่นกัน หลังจากชั่วโมงที่ 30 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงอีกเล็กน้อย จนถึงชั่วโมงที่ 42 เป็นต้นไปที่ปริมาณน้ำตาลค่อนข้างคงที่คือเหลืออยู่ที่ประมาณ 0.7 กรัมต่อลิตร จากเริ่มต้น 6.2 กรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 7.3 กรัมต่อลิตร และทำการวัดโปรตีนที่เหลือหลัง 60 ชั่วโมงได้เท่ากับ 5.2 กรัมต่อลิตร (ไม่ได้แสดงผล) การที่โปรตีนลดลงเพียงเล็กน้อย อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อมีการสร้างโปรตีนอื่นๆ ขึ้นและปลดปล่อยออกมาในน้ำหมักเช่น เอนไซม์ เป็นต้น จึงไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่เชื้อใช้ไปได้

การเปลี่ยนแปลงของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีแนวโน้มเป็นเช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร คือ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากเริ่มต้น 6.42 เป็น pH 8.0 ที่ 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ไปตลอดการหมัก โดยที่ 60 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 8.74 ส่วนอุณหภูมิจะค่อนข้างคงที่ที่ 23 องศาเซลเซียส (รูปที่ 33)



รูปที่ 32 แสดงการเจริญและกิจกรรมของสารยับยั้งจากเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ในอาหารน้ำต้มกาคั่วเหลืองเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ต้ม 10 นาที ปริมาตร 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และสภาวะที่เหมาะสม โดยให้อากาศ 1 VVM อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที



รูปที่ 33 แสดงค่า pH และอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงขณะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ในอาหารน้ำคั้นกากถั่วเหลืองปริมาณ 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในสภาวะที่เหมาะสม โดยให้อากาศ 1 VVM อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที

จากการ scale up การหมักจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตรไปเป็นอาหาร 3 ลิตรในถังหมัก 5 ลิตร พบว่าเชื้อเจริญได้ใกล้เคียงกัน แต่ให้ค่าการยับยั้งน้อยกว่าในถังหมักขนาดเล็ก แม้ว่าจะใช้สภาวะการทดลองที่เหมือนกัน ปัญหาที่ผลการทดลองในระดับถังหมักที่ใหญ่ขึ้นไม่เหมือนการทดลองระดับฟลาสก์ หรือถังหมักขนาดเล็ก มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่นการเปลี่ยนแปลงของ heat transfer, mass transfer หรือ oxygen transfer ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญหลังเพิ่มปริมาณอาหารหรือขนาดถังหมัก ซึ่งอาจแก้ไขเบื้องต้นโดยการปรับค่า geometric similarity ของถังหมักใหญ่ให้เท่ากับขนาดเล็ก เช่นค่า impeller diameter ratio ค่า total height ratio และค่า liquid height ratio (Junker, 2004) การปรับค่า volumetric coefficient of oxygen transfer (KLa) ในการ scale up การหมักแบบเติมอากาศ การควบคุมให้ค่า power consumption per volume ratio คงที่ โดยการปรับความเร็วในการกวน (agitation speed) เป็นต้น (Stephenie et al., 2007)