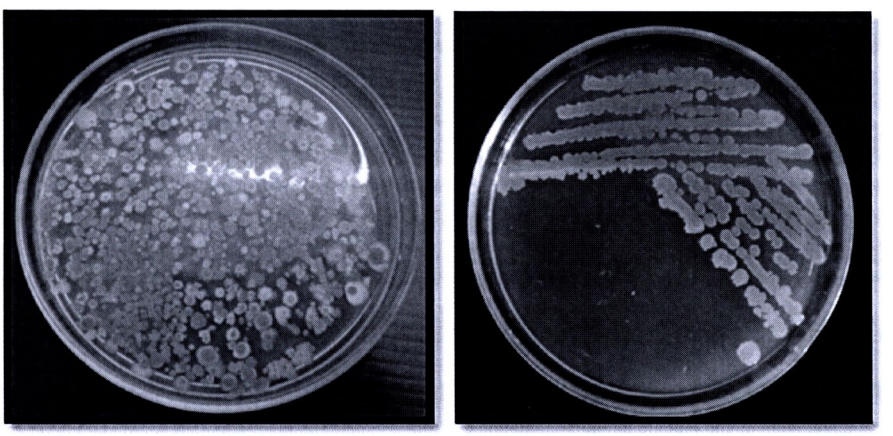
บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดแยก *Bacillus* spp. จากลำไส้ไก่เนื้อ

โคโลนีของเชื้อที่ได้จากลำไส้ไก่บนอาหาร Nutrient Agar ทั้ง 40 ตัวอย่าง มีลักษณะของ *Bacillus* คือผิวด้านและแผ่กระจายด้านข้าง โคโลนีมีหลายชนิด แตกต่างกันทั้งขนาด และลักษณะนูนเว้า ดังภาพที่ 4-1 เก็บตัวอย่าง 1 โคโลนีจากกลุ่มของโคโลนีชนิดที่พบมากที่สุดบน Nutrient Agar ของแต่ละตัวอย่างลำไส้ไก่ ลากบนอาหาร Nutrient Agar ด้วยวิธี Cross Streak Plate เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อสำหรับเก็บรักษา และดูความบริสุทธิ์ของเชื้อ (บางตัวอย่างลำไส้ไก่อาจต้องเก็บ 2 ถึง 3 โคโลนี เนื่องจากสังเกตเห็นได้ชัดว่า มีเชื้อกลุ่มใหญ่ที่ขึ้นบนอาหาร Nutrient Agar มากกว่า 1 กลุ่ม) ดังนั้นจากลำไส้ไก่ 40 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกโคโลนีเดี่ยวของ *Bacillus* กลุ่มหลักได้ทั้งหมด 85 สายพันธุ์ นำไปคัดเลือกหา *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ยับยั้งเชื้อ ก่อโรค *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ดวยวิธี Agar Well Diffusion ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4-1 เชื้อที่ให้ลักษณะของ *Bacillus* spp. และเชื้อเดี่ยวที่ได้จากการ Cross Streak Plate

สามารถพบแบคทีเรียในลำไส้ไก่ได้หลายชนิด เช่น *Lactobacillus* sp., *Eubacterium* sp., *Propionibacterium* sp., *Clostridium* sp., *Bacteroides* sp., *Acidaminococcus* sp., *Megasphaera* sp., *Peptostreptococcus* sp., *E. coli*, *Streptococcus* sp. และ *Proteus* sp. (Coloe, Bagust and Ireland, 1984) รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Clostridium perfringens* type A ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค Poultry Necrotic Enteritis ทำให้ไก่ตาย เนื่องจากเชื้อนี้สามารถผลิต Alpha Toxin (CPA) ในลำไส้ไก่ทำลายระบบภูมิคุ้มกันในไก่ (Abildgaard, et al., 2010; Coursodon, et al., 2010) *Bacillus* sp. เป็น

แบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในลำไส้ไก่ ดังจะเห็นจากการรายงานการวิจัยต่าง ๆ เช่น

Chaiyawan, et al. (2010) สุ่มเก็บตัวอย่างไก่พื้นบ้านที่มีสุขภาพดีจำนวน 38 ตัว นำส่วน Duodenum, Jejunum, Ileum และCecum เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ในอาหาร TSB และ WC broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน Anaerobic Jar และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สามารถคัดแยกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีต่างกัน 164 โคโลนี ซึ่ง 78 โคโลนีเป็นโคโลนีที่เกิดจากสปอร์บนอาหาร TSA Agar ในสภาวะที่มีออกซิเจน ในขณะที่ 86 โคโลนีพบในอาหาร WC Agar ในสภาวะไร้ออกซิเจน สปอร์ของเซลล์แสดงเป็น Antibiotic คือ สายพันธุ์ T 1-2, T 2-3, T 3-1, T 7-5, T 8-2, T 11-4, M 4-1, W 1-1 และ W 1-2 การจัดจำแนกเชื้อระบุว่า T2-3 และT3-1 เป็นเชื้อ *Bacillus* sp. 97 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Thirabunyanon and Thongwittaya (2011) สุ่มเก็บตัวอย่างไก่พื้นบ้านที่มีสุขภาพดีจำนวน 23 ตัว นำสารละลายที่ได้จากลำไส้เล็ก Spread บนอาหาร Nutrient Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้โคโลนีที่แตกต่างกัน 6 ถึง 9 โคโลนีต่อไก่ 1 ตัว และรวบรวมแบคทีเรียได้ทั้งหมด 240 โคโลนี พบ 117 สายพันธุ์ เป็น Bacilli และผลการตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยวิธี Molecular ของ 16S rRNA Sequencing Gene ของสายพันธุ์ NC11 แสดงว่าเป็น *Bacillus subtilis* 99 เปอร์เซ็นต์

4.2 ผลการคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

พบว่า *Bacillus* spp. ที่คัดแยกมาได้ทั้งหมด 85 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ 27 สายพันธุ์ และสามารถสร้างสารยับยั้ง *Escherichia coli* ได้ 8 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4-1) โดยที่ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ยับยั้ง *Escherichia coli* จะยับยั้ง *Staphylococcuc aureus* ได้ด้วย จากการเปรียบเทียบบริเวณยับยั้ง พบว่า *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ 02, 04 และ 26 มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งสองชนิดได้สูงที่สุด จึงคัดเลือก *Bacillus* B04 นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยต่อไป

ตารางที่ 4-1 ผลการทดสอบความสามารถของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี Agar Well Diffusion

สายพันธุ์ *Bacillus* spp.	Inhibition Zone (cm) ; $\bar{x}$ ±SD		สายพันธุ์ *Bacillus* spp.	Inhibition Zone (cm) ; $\bar{x}$ ±SD	
	Staphylococcus aureus	*Escherichia coli*		*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*
1	1.68±0.10	-	29	1.40±0.08	-
2	1.53±0.15	1.43±0.05	30	1.25±0.07	-
3	1.25±0.07	-	33	1.25±0.07	-
4	1.58±0.21	1.35±0.07	38	1.40±0.14	-
7	1.45±0.07	-	39	1.63±0.10	-
8	1.43±0.05	-	40	1.35±0.17	-
9	1.30±0.14	-	41	1.45±0.07	-
10	1.45±0.07	-	43	1.48±0.05	1.30±0.00
11	1.05±0.07	-	44	1.50±0.08	-
15	1.50±0.29	-	45	1.58±0.10	-
21	1.15±0.06	-	50	1.25±0.06	-
26	1.48±0.10	1.35±0.06	78	1.20±0.08	1.13±0.13
27	1.38±0.05	1.33±0.05	80	1.35±0.06	1.28±0.15
28	1.40±0.08	1.30±0.00			

มีผลการรายงานการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของ ภัทริดา และคณะ (2554) พบว่า *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* และ *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*Aeromonas hydrophila* ABRCA1 และ *Streptococcus agalactiae* ABRCS1) ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยทดสอบด้วยวิธี Cross Streak Method

Barboza-Corona, et al. (2009) ศึกษาการใช้ *Bacillus thuringiensis* ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทดสอบด้วยวิธี Well Diffusion Method โดยใช้ 100 ไมโครลิตร หยดในหลุมที่มีขนาด 0.8 เซนติเมตร บนอาหาร Tryptic Soy Broth ที่ผสมวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง และบ่มที่ 28 หรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา

24 ชั่วโมง พบว่า Morricin 269 และ Kurstacin 287 แสดงกิจกรรมสูงสุด ตามด้วย Kenyacin 404, Entomocin 420 และ Tolworthcin 524 โดยสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ STA 70, STA 72, STA 76, STA 81, STA 86 และ STA 90 ได้ดี

Dhanapathi, Prabhakar and Prabhakar (2008) ศึกษาคัดแยก *Bacillus subtilis* จากดินที่สามารถสร้าง Subtilin ในการยับยั้ง *Escherichia coli* จาก Scour Origin และ *Staphylococcus aureus* จาก Mastitis Origin ของลูกโค โดย Streak บนอาหาร Tryptone Soya Agar Plates จากนั้นทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion Method ซึ่งปริมาณ Subtilin ที่เหมาะต่อการยับยั้งเชื้อทั้งสองเท่ากับ 100 mg/ml

Santong, et al. (2008b) ใช้ *Bacillus spp.* ที่คัดแยกจากนมดิบในการยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 517 และ *Escherichia coli* TISTR 887 ใน Mueller Hinton Broth ด้วยวิธี Spot on Lawn และ Agar Diffusion Method บนอาหาร Mueller Hinton Agar ด้วยวิธี Spread Plate เจาะหลุมขนาด 0.6 เซนติเมตร หยดส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดระยะจากขอบของหลุม และเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง ตรวจสอบสายพันธุ์เทียบกับ API Database บ่งชี้ว่า BA8, BA1659, BA26, BA27, BA38 เป็นสายพันธุ์ *Geobacillus thermoglucosidasius* BA16, *Brevibacillus* non reactive BA26, *Brevibacillus* non reactive BA27 และ *Bacillus pumilus* BA38 ปริมาณ 59.1, 91.5, 93.6, 55.0 และ 99.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ *Bacillus pumilus* BA38 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งในช่วง 1.2 ถึง 1.65 เซนติเมตร ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* TISTR 517 และ *Bacillus pumilus* BA38 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งในช่วง 1.12 ถึง 1.35 เซนติเมตร ในการยับยั้ง *Escherichia coli* TISTR 887 เมื่อใช้วิธี Spot on Lawn Method ส่วนเมื่อใช้วิธี Agar Diffusion Method ไม่แสดงการยับยั้ง

Yilmaz, Soran and Beyatli (2006) คัดแยก *Bacillus* จากดิน พบสายพันธุ์ที่ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ด้วยวิธี Agar Well Diffusion โดยใช้ Spread Plate แบคทีเรียบนอาหาร Nutrient Agar เจาะหลุมขนาด 0.6 เซนติเมตร และหยดส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* 100 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง พบว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของ *Bacillus* สายพันธุ์ *Bacillus brevis* M6 มีการแสดงการยับยั้งแบคทีเรีย *Staphlococcus aureus* ATCC 25923 (1.6 เซนติเมตร) ได้มากกว่าสารปฏิชีวนะ (1.4 เซนติเมตร)

สุวณี (2550) ศึกษาการสร้างสารต้านจุลชีพ ของ *Bacillus subtilis* K-05 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (De Man Rogosa Sharp) และนำส่วนใสมาทดสอบด้วยวิธี Agar Well Diffusion เจาะหลุมขนาด 0.8 เซนติเมตร บนอาหารที่มีเชื้อทดสอบ (OD_{625} เท่ากับ 0.1)โดยใช้ส่วนใสปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งจากขอบหลุมจนถึงบริเวณยับยั้ง พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus*

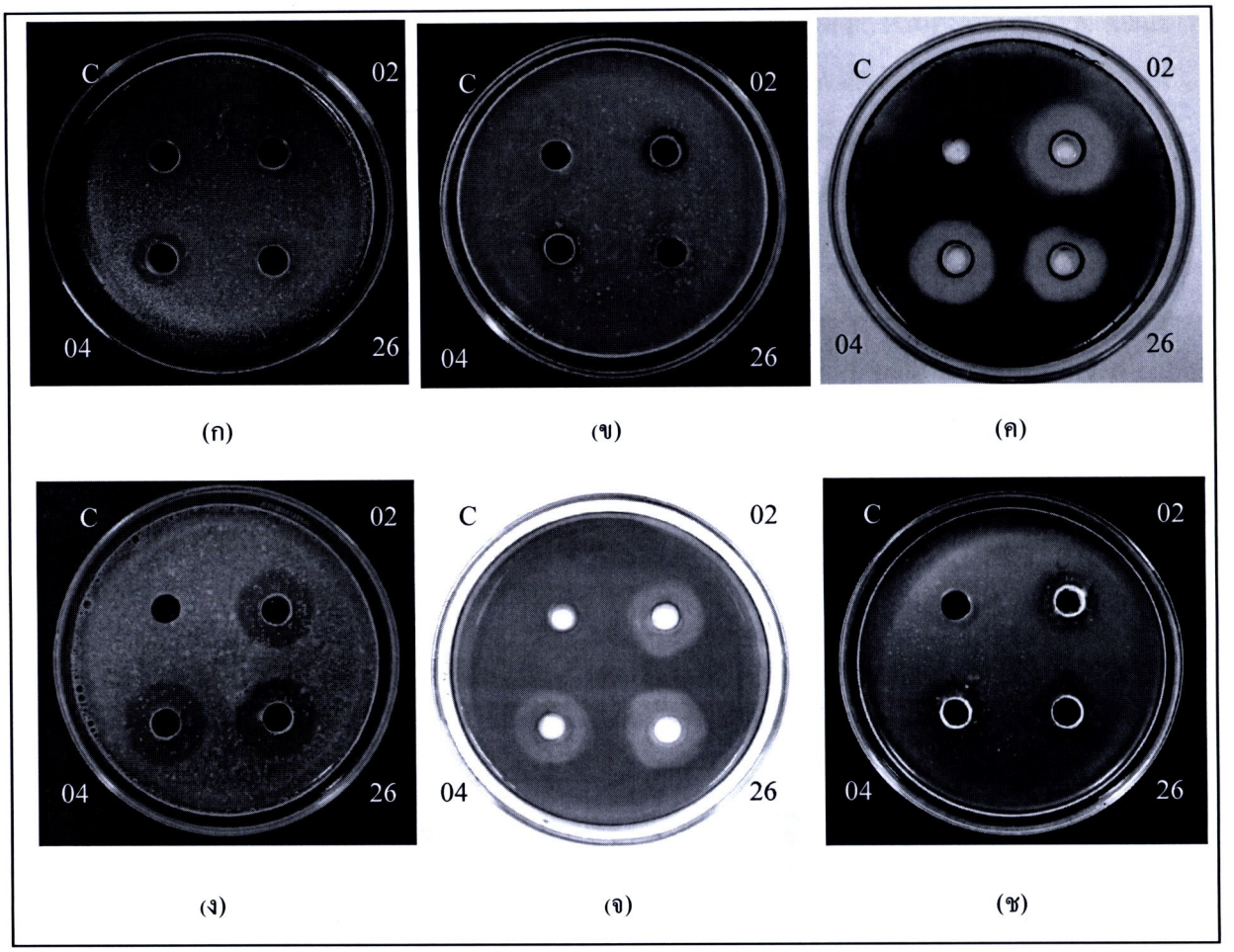
sutilis ATCC 6633 (0.22 เซนติเมตร) และ *Staphlococcus aureus* ATCC 25923 (1.3 เซนติเมตร) แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 (2.2 เซนติเมตร) และ *Pseudomonas aerugenosa* ATCC (0.12 เซนติเมตร) ยีสต์ ได้แก่ *Candida albocan* ATCC 70014 (1.5 เซนติเมตร) และราเส้นใย 2 ชนิด ได้แก่ *Altermaria* sp. (1.7 เซนติเมตร) และ *Fusarium* sp. (1.4 เซนติเมตร)

4.3 ผลการคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปส ด้วยวิธี Agar Well Diffusion

จากการนำส่วนใสของ *Bacillus* spp. B02, B04 และ B26 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปส พบว่า *Bacillus* spp. ทั้งสามสายพันธุ์สามารถสามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 4 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ผลการคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปส ด้วยวิธี Agar Well Diffusion

Bacillus spp.	Inhibition Zone (cm) ; $\bar{X}$ ±SD		Clear Zone (cm) ; $\bar{X}$ ±SD			
	Escherichia coli	*Staphylococcus aureus*	Strach Agar	Skim Milk Agar	Carboxymethyl-cellulose Agar	Tributyrin Agar
02	1.31±0.14	1.24±0.09	3.34±0.72	2.03±0.09	2.13±0.07	1.64±0.14
04	1.49±0.16	1.18±0.13	2.44±0.42	2.19±0.14	2.31±0.14	1.68±0.15
26	1.25±0.12	0.99±0.18	2.40±0.11	2.10±0.08	2.36±0.27	1.63±0.10



ภาพที่ 4-2 การคัดเลือก *Bacillus* spp. B02, B04 และ B26 (Control บนซ้าย) แสดงบริเวณยับยั้ง ได้แก่ *Escherichia coli* (ก) และ *Staphylococcus aureus* (ข) บริเวณใส ได้แก่ อะไมเลส (ค) โปรติเอส (ง) เซลลูเลส (จ) และไลเปส (ช)

Bacillus B02 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงที่สุดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.34±0.72 เซนติเมตร *Bacillus* B04 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส และไลเปสได้สูงที่สุดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.19±0.14 และ 1.68±0.15 เซนติเมตร ตามลำดับ และ *Bacillus* B26 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.36±0.27 เซนติเมตร และเมื่อพิจารณาร่วมกับความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่า *Bacillus* B04 มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งได้ทั้ง *Escherichia coli* และ *Staphylococcuc aureus* และสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และ ไลเปสได้ จึงเลือก *Bacillus* B04 เป็นจุลินทรีย์ โปรไบโอติกในการศึกษาต่อไป

แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด ได้แก่ โปรติเอส (Wang and Gu, 2010; Schallmey, Singh and Ward, 2004) อะไมเลส (Konsoula and Liakopoulou-Kyriakides, 2006;

Wang and Gu, 2010; Riaz, Ikram-Ul-Haq and Qadeer, 2003; Schallmey, Singh and Ward, 2004) เซลลูเลส (Schallmey, Singh and Ward, 2004),ไลเปส (Wang and Gu, 2010; Schallmey, Singh and Ward, 2004; Hasan and Hameed, 2001), β-Galactosidase (Sreekumar and Soundarajan, 2010; Schallmey, Singh and Ward, 2004), Alginase (Hansen, Doubet and Ram, 1984), Chitosanase, Pullulanases, Xylanase, Esterases, Chitinases, β-Glucanase (Schallmey, Singh and Ward, 2004)

Konsoula and Liakopoulou-Kyriakides (2006) พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ และเพิ่มการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธี Immobilization ด้วยแคปซูลที่เตรียมจาก Sodium Alginate 2% (w/v) และ $CaCl_2$ 3.5% (w/v) ได้ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส มากกว่าการใช้เซลล์เดี่ยวถึง 2.5 เท่า Riaz, Ikram-Ul-Haq and Qadeer (2003) พบว่า *Bacillus subtilis* GCBUCM-25 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูง ส่วน *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกได้จากดินของ Federal University of Technology Minna จากการรายงานของ Oyeleke, Oyewole and Egwim (2011) สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้

Santong, et al. (2008a) คัดแยก *Bacillus* sp.ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ มากกว่า 1.0 เซนติเมตร จำนวน 10 สายพันธุ์ ทดสอบบน Skim Milk Agar Tyrosine โดยสายพันธุ์ BA26 และ BA27 ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด 12 U/mg protein และ Oyeleke, Oyewole and Egwim (2011) พบ *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกได้จากดินของ Federal University of Technology Minna สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ถึง 0.83 mg/ml/sec ด้วยวิธี Protease Enzyme Assay

Bacillus sp. หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Bacillus stearothermophilus* แสดงกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 90.57±0.07 U/ml (Massadeh and Sabra,2011) *Bacillus subtilis* lipA และ lipB สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ (Eggert, et al., 2003) *Bacillus subtilis* MTCC 6808 แสดงกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 4.5 U/g (Chaturvedi, et al., 2010) *Bacillus subtilis* OCR-4 แสดงกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 4.5 U/g (Singh, et al., 2010) *Bacillus Subtilis* ที่คัดแยกได้จากดินสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้สูงในช่วง 0.01033 และ 0.01066 µg/min/ml (Kanimozhi, et al., 2011)

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่ *Bacillus* sp.หลายชนิดสามารถผลิตได้ ตัวอย่างเช่น *Bacillus* ที่แยกจากดินและน้ำบริเวณ Amazon พบว่า *Bacillus* sp. BL16 และ *Bacillus subtilis* BL62 แสดงกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในระดับสูงเท่ากับ 0.89 และ 1.08 UI/mg ptotein ตามลำดับ (Heck, Hertz and Ayub, 2002) สอดคล้องกับการรายงานของ Deka, et al. (2011) ที่พบว่า *Bacillus subtilis* AS3 สามารถผลิตเซลลูเลสได้สูงสุด 0.07 U/ml ในสภาวะที่เหมาะสมในอาหาร Carboxymethyl Cellulose การรายงานของ Maki, Leung and Qin (2009) แสดง *Bacillus subtilis* DR สามารถที่ผลิตเอนไซม์ Thermostable Cellulase ได้ Yin, Lin and Xiao (2010) ศึกษาสภาวะที่

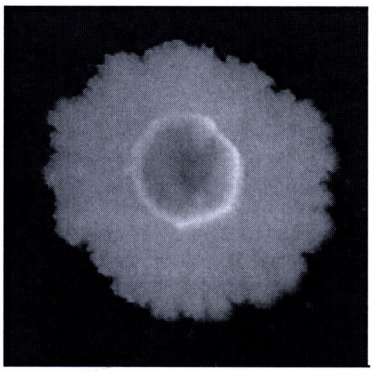
เหมาะสมของ *Bacillus subtilis* YJ1 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีมวลโมเลกุลขนาด 32.5 kDa และการรายงานของ Shabeb, et al (2010) พบ *Bacillus subtislis* KO เกิด Clear Zone บนอาหาร Carboxymethyl Cellulose และด้วยวิธี Dinitro Salicylic Acid Technique แสดงกิจกรรม สูงสุด 35 I.U และ 420 μg/ml และ Chaiyawan, et al. (2010) สุ่มเก็บตัวอย่างไก่พื้นบ้านจำนวน 38 ตัว การจัดจำแนกเชื้อระบุว่า T3-1 เป็นเชื้อ *Bacillus* sp. สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ด้วย

นอกจากนี้ ยังพบว่า *Bacillus* บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น จักรพันธ์และสุพรรนี (2552) เพาะเลี้ยง *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้จากดินทั้งหมด 9 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอนไซม์ โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส บนอาหารสูตร Skim Milk Agar, Starch Agar และ Tributyrin Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส พบสายพันธุ์ 3 ที่เจริญบนอาหาร Starch Agar ทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear Zone ได้ 5.0 และ 6.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ บนอาหาร Skim Milk Agar วัดได้ 13 และ 15 มิลลิเมตร ตามลำดับ และบนอาหาร Tributyrin Agar วัดได้ 5.0 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

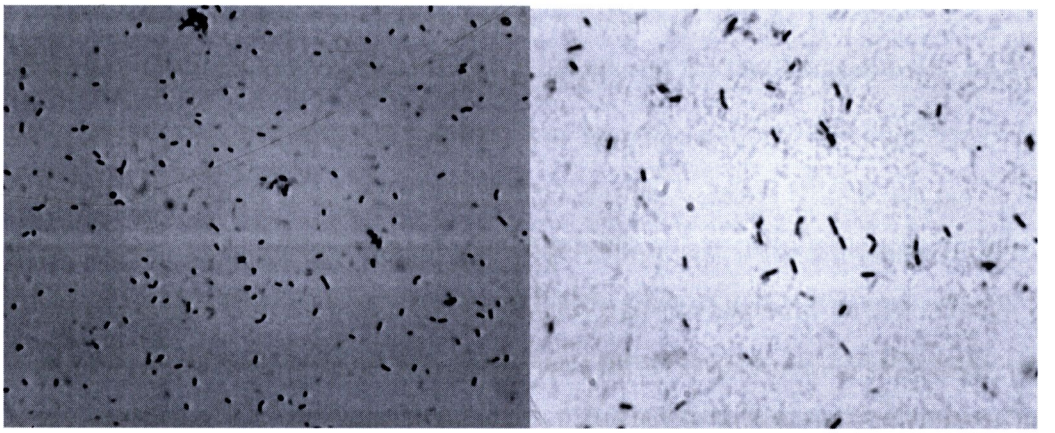
4.4 การตรวจลักษณะของ *Bacillus* B04 และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น

โคโลนี *Bacillus* B04 ที่คัดเลือกได้ มีสีขาว รูปร่างกลม (Circular) โค้งนูนมีปุ่มตรงกลาง (Umbonate) ผิวหยาบด้าน (Dull) ขอบไม่เรียบ (Undulate) (ภาพที่ 4-3) และการตรวจดูลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Gram' Strain ดังภาพที่ 4-4 พบว่า *Bacillus* B04 มีลักษณะรูปท่อน (Rod) เซลล์ติดสีน้ำเงิน เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยเชื้อเคลื่อนที่ออกจากรอย Stap ในอาหาร Motility อย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4-5) ซึ่งเชื้อ *Bacillus* ก่อโรคที่สำคัญ เช่น *Bacillus anthracis* จะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Williams and Wilkins, 1957; Logan and Berkeley, 1984) เมื่อทดสอบการใช้น้ำตาลและการสร้างกรดโดย Steak บนอาหาร Mannitol Salt Agar พบว่า *Bacillus* B04 สามารถเจริญบนอาหาร Mannitol Salt Agar ได้โคโลนีสีเหลือง (ภาพที่ 4-6) แสดงว่า *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกสามารถสร้างกรดและใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้ ดังนั้น *Bacillus* B04 จึงไม่ใช่ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล Mannitol ได้ และทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย (Vyletelova, et al., 2002)

จากการส่งเชื้อเพื่อจำแนกสายพันธุ์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พบว่า *Bacillus* B04 ที่คัดเลือกได้เป็นสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 2057 (ภาคผนวก ค) 97.4 เปอร์เซ็นต์ จากการประมวณผลด้วยโปรแกรม API 50CHB System หลังการทดสอบทางชีวเคมี

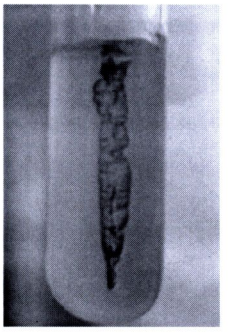


ภาพที่ 4-3 ลักษณะโคโลนี *Bacillus* B04 บนอาหาร Nutrient Agar

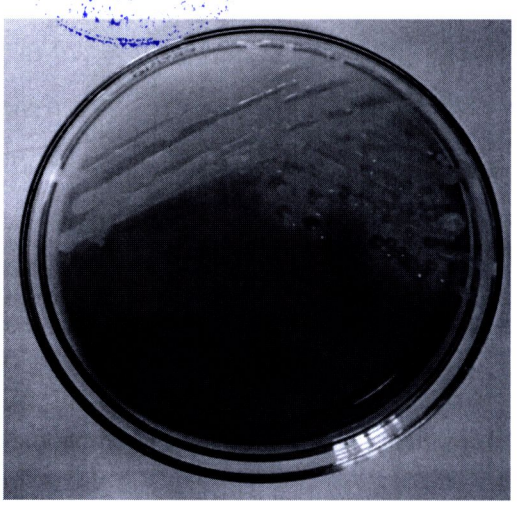


40x 100x

ภาพที่ 4-4 ลักษณะ *Bacillus* B04 ที่กำลังขยาย 40x และ 100x ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



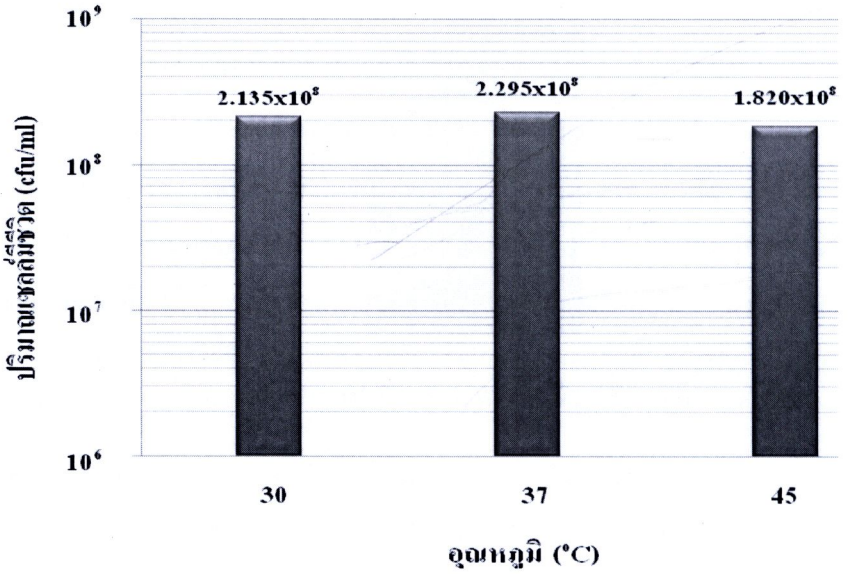
ภาพที่ 4-5 การเคลื่อนที่ *Bacillus* B04 ในอาหาร Motility Test



ภาพที่ 4-6 *Bacillus* B04 บนอาหาร Mannitol Salt Agar หลังเพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04

Bacillus subtilis B04 สามารถเจริญได้ทั้ง 3 อุณหภูมิ (ภาพที่ 4-7) โดยสามารถเจริญได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณเซลล์สูงที่สุด 2.3×10^8 cfu/ml รองลงมาคือสามารถเจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเซลล์ 2.14×10^8 และ 1.82×10^8 cfu/ml ตามลำดับ ดังนั้นจึงใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4-7 ปริมาณ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

Bacillus แต่ละสายพันธุ์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตที่แตกต่างกัน อาจแบ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Bacillus* เป็น 3 กลุ่ม คือ ที่อุณหภูมิต่ำ (Psychrophile) อุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic) และอุณหภูมิสูง (Thermophilic)

Bacillus ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ *Bacillus subtilis* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 11 องศาเซลเซียส (Nichols, et al., 1995 อ้างถึงใน Budde, 2006) *Bacillus subtilis* 168 สามารถเจริญต่อเนื่องได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส หลังจากถ่ายเชื้อจากการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญต่อเนื่องได้เมื่อถ่ายเชื้อลงใน 12 องศาเซลเซียส หลังจากถ่ายเชื้อจากการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (Neale and Chapman, 1970) *Bacillus subtilis* B246 สามารถเจริญได้เล็กน้อย ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส (Korsten and Cook, 1996)

Bacillus ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *Bacillus* sp. BA26, BA27, BA31, BA32, BA33, BA36, B38, B39, B40, B41 สามารถที่จะเจริญสร้างสปอร์และสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ (Santong, et al., 2008a) *Bacillus subtilis* B246 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส (Korsten and Cook, 1996) *Bacillus subtilis* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 ถึง 45 องศาเซลเซียส โดยสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ^{-h}) เท่ากับ 0.22^{-h} (Nandy, Prasad and Venkatesh, 2008) *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus* และ *Bacillus subtilis* สามารถที่เจริญในช่วงอุณหภูมิที่กว้างตั้งแต่ 25 ถึง 50 องศาเซลเซียส (Purivirojkul, Maketon and Areechon, 2005) *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus firmus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Barbosa, et al., 2005) *Bacillus subtilis* SK09 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25, 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยสามารถสร้างเอนไซม์ β-Galactosidase ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Sreekumar and Soundarajan, 2010) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Vidyalakshmi, et al. (2009) พบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส *Bacillus* spp. สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงที่สุด นอกจากนั้น *Bacillus* sp. S11 ที่ได้รับการคัดเลือกมาจากลำไส้ของกุ้ง นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเจริญได้ที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ศิริรัตน์, 2541)

Bacillus ที่สามารถเจริญได้อุณหภูมิสูง *Bacillus* sp. BA26, BA27, BA31, BA32, BA33, BA36, B38, B39, B40, B41 สามารถที่จะสร้างสปอร์และสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่อุณหภูมิมากกว่า 50 องศาเซลเซียส จนถึง 100 และ 121 องศาเซลเซียส (Santong, et al., 2008a) *Bacillus* BA14 และ BA29 ที่คัดแยกได้จากนมดิบ สามารถที่จะเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 ถึง 50 องศาเซลเซียส (Santong, et al., 2008b) *Bacillus subtilis* B246 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส (Korsten

and Cook, 1996) *Bacillus coagulans* TB/04 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติก สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส (Payot, Chemaly and Fick, 1999)

แบคทีเรียจีนัส *Bacillus* ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารและอุจจาระของไก่ เช่น *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus megaterium* และ*Bacillus firmus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางประมาณ 37 องศาเซลเซียส (Barbosa et al., 2005)

4.6 การทดสอบความทนต่อสภาวะกรดของ *Bacillus subtilis* B04

การทดสอบความสามารถในการทนต่อค่ากรดของ *Bacillus subtilis* B04 ที่คัดเลือกได้ โดยใช้ค่าความเป็นกรดใกล้เคียงกับกระเพาะอาหารและลำไส้ไก่เนื้อ จากผลการทดลองดังตารางที่ 4-3 พบว่าที่ความเป็นกรดเท่ากับ 4 และ 5 มีปริมาณเซลล์มีชีวิตใกล้เคียงกับที่สภาวะที่มีค่ากรดเท่ากับ 6.5 (ไม่ได้ปรับค่าความเป็นกรดด่าง) ที่สภาวะที่มีค่ากรดเท่ากับ 3.0 มีปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงเล็กน้อย ส่วนที่สภาวะที่มีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 2.0 พบว่ามีปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงเพียง 1 log จากรายงานที่ผ่านมา ค่าความเป็นกรดด่างในระบบทางเดินอาหารของไก่เนื้ออยู่ในช่วง 2 ถึง 8.5 (Rahmani and Speer, 2005) และระยะเวลาที่อาหารอยู่ในบริเวณทางเดินอาหารส่วนใหญ่ประมาณ 70 นาที (Dhawale, 2005) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *Bacillus subtilis* B04 สามารถทนต่อสภาวะกรดในระบบทางเดินอาหารของไก่เนื้อได้

ตารางที่ 4-3 ปริมาณเซลล์มีชีวิตที่ทนต่อสภาวะกรดด่างต่าง ๆ

ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)	ปริมาณเซลล์มีชีวิต (cfu/ml)
6.5	$1.735x10^8$
5.0	$1.565x10^8$
4.0	$1.530x10^8$
3.0	$1.350x10^8$
2.0	$1.655x10^7$

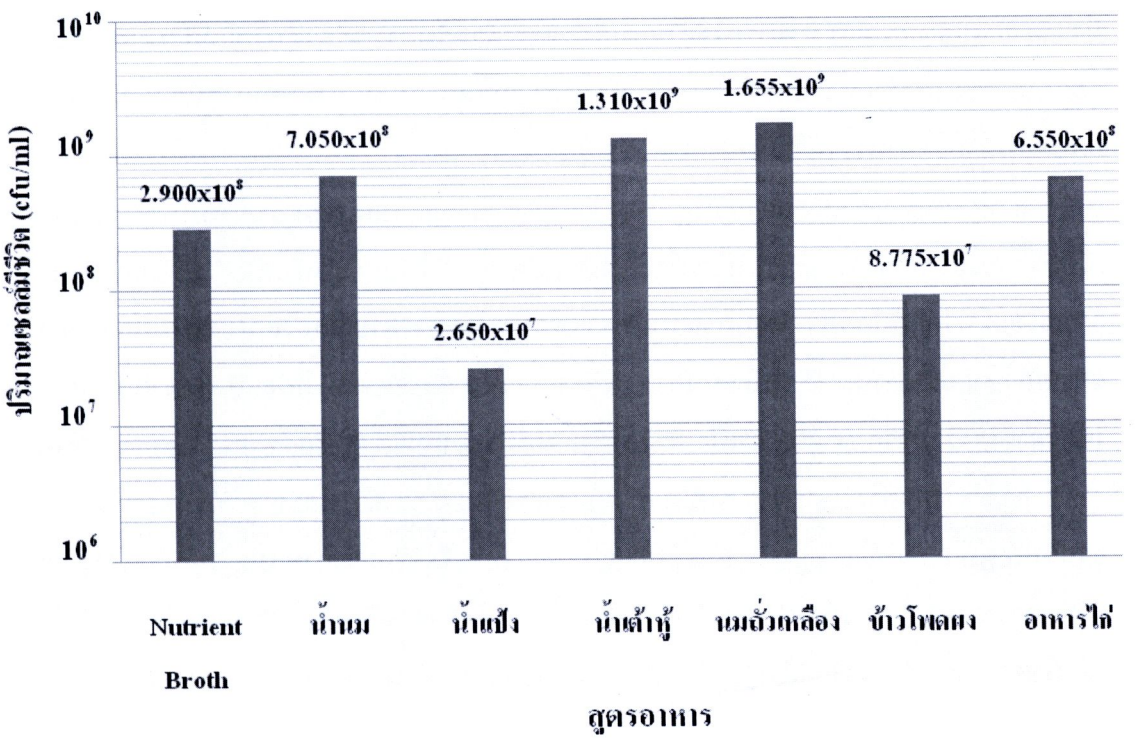
ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการรายงานของ Barbosa, et al. (2005) ที่พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ 3, 37, 56, 197, 200, 210 และ 259 สามารถทนต่อสภาวะกรดที่ใกล้เคียงกับกระเพาะอาหารของไก่ ที่ค่ากรดเท่ากับ 2 โดยเชื้อมีปริมาณลดลงน้อยกว่า 1 log เมื่ออยู่ในสภาวะกรดเป็นระยะเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง และ Cenci, Trotta and Caldini (2006) รายงานการศึกษาความสามารถใน การทนกรดของโปรไบโอติก *Bacillus clausii* ที่ค่าความเป็นกรด 2, 4 และ 6 เป็น

ระยะเวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมง โดยพบว่า สปอร์ (Spores) สามารถทนต่อค่าความเป็นกรดได้ถึง 2 ส่วน เซลล์ (Vegetative Cells) มีปริมาณเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงที่ค่าความเป็นกรดเท่ากับ 6 แต่จะมีปริมาณเซลล์ลดลงที่ค่าความเป็นกรดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4

4.7 ผลการผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารอย่างง่ายและราคาถูก

4.7.1 ผลการผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารอย่างง่ายและราคาถูก

พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากน้ำนม น้ำเต้าหู้ นมถั่วเหลือง และอาหารไก่ (ภาพที่ 4-8) ให้ปริมาณเซลล์มีชีวิตสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth โดยที่นมถั่วเหลืองให้จำนวนเซลล์สูงที่สุด 1.655×10^9 cfu/ml เนื่องจากอาหารเหล่านี้มีคุณค่าทางอาหารสูงและง่ายต่อการที่ *Bacillus subtilis* B04 นำสารอาหารไปใช้ ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากข้าวโพดผงและน้ำแป้งให้จำนวนเซลล์ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth เนื่องจากข้าวโพดผง ประกอบไปด้วยโมเลกุลขนาดใหญ่ของข้าวโพดบดหยาบ แป้งถั่วเหลือง นมผง น้ำตาล และใยอาหาร ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Bacillus subtilis* B04 ส่วนน้ำแป้งให้ปริมาณเซลล์มีชีวิตต่ำที่สุดเพียง 2.650×10^7 cfu/ml และเนื่องจากน้ำแป้งมีโมเลกุลของสารอาหารเป็นโพลีแซคคาไรด์ ซึ่ง *Bacillus subtilis* B04 นำไปใช้ได้ยากแม้ว่าจะสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้



ภาพที่ 4-8 ปริมาณ *Bacillus subtilis* B04 มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายหลังการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แบคทีเรียหลายชนิดสามารถใช้น้ำนมถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารได้ เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Streptococcus thermoph*ilus สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่เตรียมจากน้ำนมถั่วเหลือง (37 และ 42 องศาเซลเซียส) (Bozanic, Lovkovic and Jelicic, 2011) นอกจากนี้ *Bacillus subtilis* CS90 สามารถเติบโตได้ดีในอาหาร Chenoggukjang ซึ่งเตรียมจากถั่วเหลืองที่หนึ่งด้วยไอน้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับจำนวนเซลล์มีชีวิตบนอาหาร Tryptic Soy Agar Plate พบปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นที่ 24 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์ $5.2x10^{10}$cfu/ml ที่ 48 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์ $6.8x10^{11}$cfu/ml แสดงกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ β-Glucosidase 24.1 U/g และ Esterase 20.4 U/g ที่ 36 ชั่วโมง (Cho, et al., 2011)

น้ำนมโคอุดมไปด้วยสารอาหาร เช่น ไขมัน (Fat) 3.100±0.683 เปอร์เซ็นต์, Non Fat Solid 8.406±0.989 เปอร์เซ็นต์, โปรตีน 2.868±0.814 เปอร์เซ็นต์, วิตามิน และแร่ธาตุอื่น ๆ (Ozrenk and Inci, 2008) ทำให้เป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับแบคทีเรีย แต่น้ำนมที่จำหน่ายทั่วไปมีหลายสูตรซึ่งมีปริมาณไขมันไม่เท่ากัน ซึ่งไขมันเป็นส่วนที่แบคทีเรียนำไปใช้ได้ยากดังนั้นจึงควรเลือกน้ำนมชนิดที่มีไขมันต่ำสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

อาหารไก่ประกอบด้วย ข้าวโพดเหลือง 56.45 เปอร์เซ็นต์, ถั่วเหลืองบด (Crude Protein 47.5 เปอร์เซ็นต์) 27.33 เปอร์เซ็นต์, เนื้อและกระดูกป่น (Crude Protein 50 เปอร์เซ็นต์) 7.00 เปอร์เซ็นต์ ไขมันจากผักและสัตว์ 1.82 เปอร์เซ็นต์ วิตามิน และแร่ธาตุ (Chiba, 2009) ซึ่ง *Bacillus subtilis* B04 สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตได้ดี อาหารไก่มีราคาถูกและมีอยู่ในฟาร์มเพาะเลี้ยงไก่อยู่แล้ว ทำให้สะดวกต่อการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกก่อนผสมน้ำหรืออาหารให้ไก่กิน

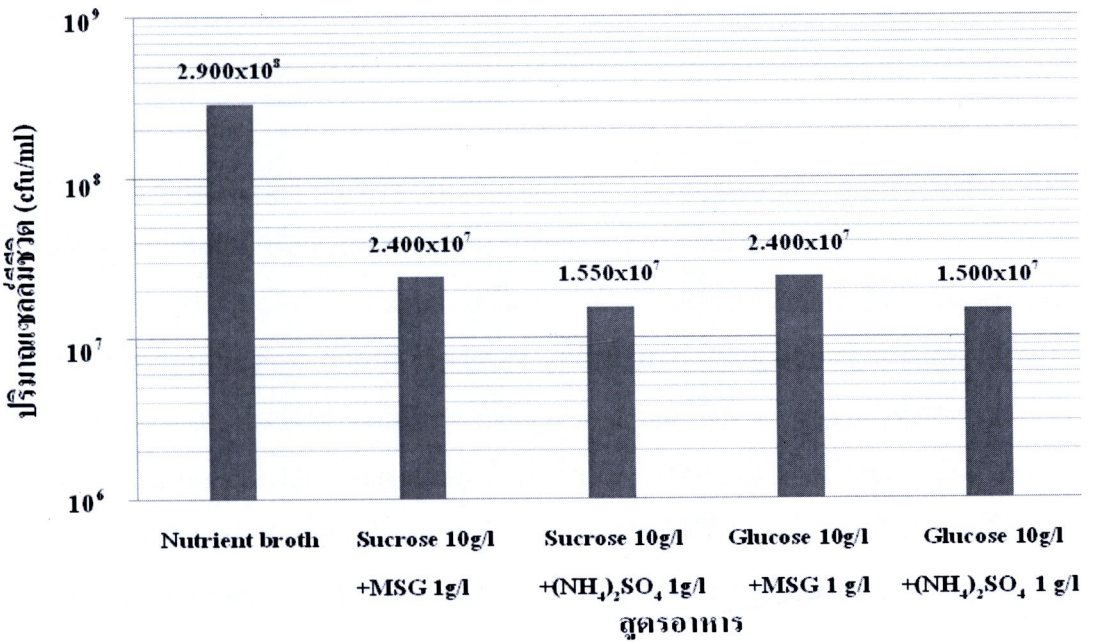
สำหรับอาหารที่เตรียมจากแป้ง แม้ว่า *Bacillus subtilis* B04 สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้เนื่องจากเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่น พบว่ามีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสภาวะในการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ มีรายงานการใช้แป้งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากดิน สามารถใช้อาหารที่เตรียมจากสารละลายแป้ง 10 g/l เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Teodoro and Martins, 2000)

ผงข้าวโพดเตรียมจากข้าวโพดอบแห้งแล้วบดให้ละเอียด ทำให้ละลายได้ไม่ดีเมื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ใช้เป็นแหล่งอาหารได้ยากกว่าอาหารชนิดอื่น แต่ใช้ได้ดีกว่าอาหารที่เตรียมจากแป้งข้าวเจ้า การใช้ข้าวโพดเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้ได้ปริมาณมากอาจเตรียมอยู่ในรูปของแป้งข้าวโพด ตัวอย่างเช่น การเพาะเลี้ยง *Bacillus macerans, Bacillus coagulan, Bacillus licheniformis, Bacillus circulans, Bacillus magaterium, Bacillus polymyxa* และ *Bacillus Subtilis* (Amylolytic *Bacillus* Species) ที่คัดแยกได้จากดิน ของเสียน้ำและ แหล่งอาหาร นำมาทดลองเพาะเลี้ยงในแป้งข้าวโพดป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งมีราคาต้นทุนต่ำ

เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสารละลายแป้ง และ Nutrient Broth นับปริมาณเซลด้วยวิธีการ Pour Plate พบว่า สารละลายแป้ง และแป้งข้าวโพดเป็นซับสเตรทหลักของการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดี โดยที่ *Bacillus licheniformis* (S2) สามารถผลิตเอนไซม์ β-Amylase ได้สูงที่สุด 4.2 (U/ml) *Bacillus* spp. ทุกสายพันธุ์สามารถที่จะใช้แป้งข้าวโพดซึ่งมีราคาต่ำในการเจริญเติบโตได้ ซึ่งค่าเฉลี่ยรวมปริมาณเซลล์มีชีวิตทั้งหมด 1.158 x 10^3 cfu/ml จากการเพาะเลี้ยงในแป้งข้าวโพด, 1.01 x 10^3 cfu/ml ในสารละลายแป้ง และ 7.4 x 10^2 cfu/ml ใน Nutrient Broth (Ajayi and Fagade, 2003)

4.7.2 ผลการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์

ผลการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ พบว่า *Bacillus subtilis* B04 สามารถใช้อาหารสังเคราะห์สำหรับการเติบโตได้ แต่ให้จำนวนเซลล์มีชีวิตน้อยกว่า Nutrient Broth ทุกตัวอย่าง เนื่องจากอาหารสังเคราะห์ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเท่านั้น และพบว่า *Bacillus subtilis* B04 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ใกล้เคียงกัน โดยดูได้จากอาหารที่ใช้น้ำตาลต่างชนิดกันแต่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดเดียวกัน ทั้งอินทรีย์ไนโตรเจน (Monosodium Glutamate) และอนินทรีย์ไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ให้ปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกัน ในทางตรงข้ามเมื่อใช้น้ำตาลชนิดเดียวกัน (ทั้งน้ำตาลกลูโคสและซูโครส) *Bacillus subtilis* B04 สามารถใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในการเจริญได้ดีกว่าอนินทรีย์ไนโตรเจน (ภาพที่ 4-9)



ภาพที่ 4-9 ปริมาณ *Bacillus subtilis* B04 มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์หลังการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

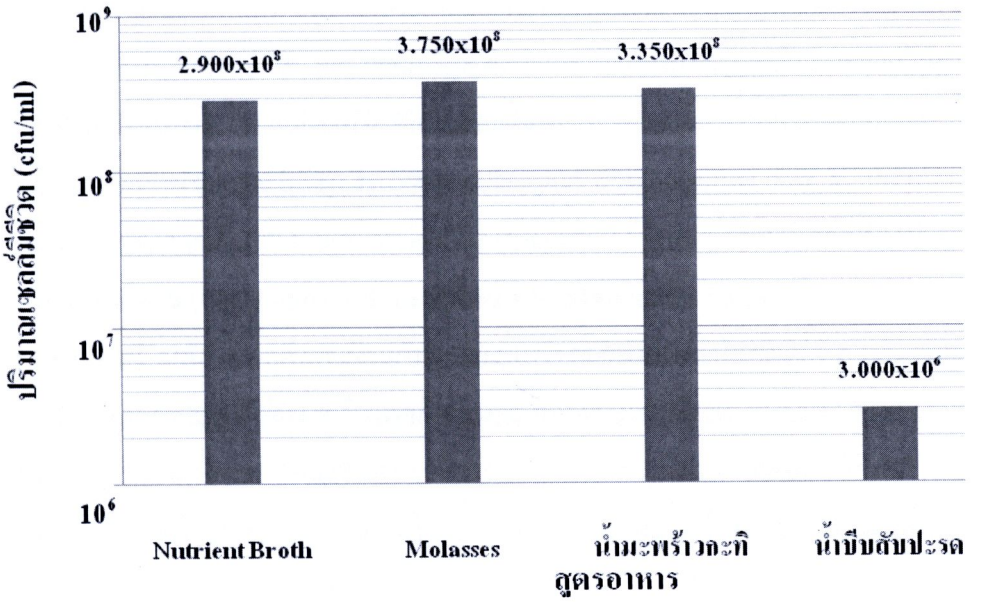
กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถใช้ในการจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากมีโมเลกุลเดี่ยว เชื้อสามารถดูดซึมได้ง่ายและนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ทันที ส่วนน้ำตาลซูโครส *Bacillus* บางชนิด มีการรายงานว่าสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี ตัวอย่างเช่น การเพาะเลี้ยง *Bacillus coagulans* เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติก พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 60 g/l สามารถผลิต Biomass และ Lactic Acid ได้ดี โดยมีค่าเท่ากับ 3.1 และ 55 g/l ตามลำดับ (Payot, et al., 1999) เช่นเดียวกับ Yuksekdag, et al. (2004) ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* 25 และ *Bacillus megaterium* 12 ในแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส, ซูโครส, แมนนิทอล และ อะราบิโนส อย่างละ 2 เปอร์เซ็นต์ เติมในอาหาร Nutrient Broth และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ L-Cysteine, L-Glycine, Protease Peptone, $(NH_4)_2SO_4$ และ Potassium Nitrate อย่างละ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* 25 ในอาหารทั้งหมด (ยกเว้น L-Glycine)ให้ปริมาณ Cell Dry Weight (g/l) สูงกว่าการเพาะเลี้ยงใน Nutrient Broth โดยการเพาะเลี้ยงใน น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และ $(NH_4)_2SO_4$ มีค่าเท่ากับ 1.23±0.43, 0.95±0.04 และ 4.88±1.47 g/l ตามลำดับ และการเพาะเลี้ยงในน้ำตาลกลูโคสสามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุด 0.240±0.05 g/l และการเพาะเลี้ยง *Bacillus megaterium* 12 ในอาหารที่เป็นน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส แมนนิทอล L-Cysteine และ Potassium Nitrate ให้ปริมาณ Cell Dry Weight (g/l) สูงกว่าการเพาะเลี้ยงใน Nutrient Broth โดยการเพาะเลี้ยงในน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และ $(NH_4)_2SO_4$ มีค่าเท่ากับ 1.59±0.41, 1.26±0.72 และ1.35±0.19 g/l ตามลำดับ และการเพาะเลี้ยงในน้ำตาลกลูโคส สามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุด 0.310±0.01 g/l จากผลการศึกษาของ Yuksekdag, et al. (2004) จะเห็นได้ว่า *Bacillus subtilis* 25 และ *Bacillus megaterium* 12 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดี และสอดคล้องกับการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. CCMI 1051 ในถังหมักด้วยอาหารที่เตรียมจาก $(NH_4)_2SO_4$ 1.5 g/l, KH_2PO4, 1.7 g/l, $Na_2HPO_42H_2O$ 1.7 g/l, $MgSO_47H_2O$ 0.2 g/l, Yeast Extract (Difco) 0.1 g/l และน้ำตาลกลูโคส 2 g/l พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดี และมีอัตราการเจริญจำเพาะในช่วง 0.1 และ 0.55 h^{-1} (Caldeira, et al., 2006)

การใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนร่วมกัน เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และกิจกรรมต่าง ๆ การรายงาน ของ Rothstein, Devlin and Cate (1986) เพาะเลี้ยง *Bacillus licheniformis* SA1 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำตาลกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ Sodium Glutamate 0.4 เปอร์เซ็นต์ พบการเจริญและสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้อย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับ Joo, et al. (2004) ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.ในอาหารที่เตรียมจาก Glutamate ที่ผสมใน Sodium Carbonate 0.4 เปอร์เซ็นต์ แป้งสาลี 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus* sp.สามารถเติบโตได้ และยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส นอกจากนั้น อรพิน และสุชาดา (2536) ศึกษาเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B31 และ NTG 259 โดยใช้ Glucose Monohydrete 0.3

เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ L-Glutamic Acid 0.4 เปอร์เซ็นต์ และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และผสมแร่ธาตุที่จำเป็นอื่น ๆ และสามารถใช้ Monosodium Glutamate 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่ผลิตในประเทศไทยแทนการใช้ L-Glutamic Acid 0.4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการผลิตในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร พบว่า สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากทั้งสองสายพันธุ์มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกัน โดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ ก่อโรคในสัตว์ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

4.7.3 ผลการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารที่เตรียมจากผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตร

พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เตรียมจาก Molasses ความเข้มข้น 10 g/l และน้ำมะพร้าวกะทิความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth ซึ่ง การเพาะเลี้ยงใน Molasses ความเข้มข้น 10 g/l ให้จำนวนเซลล์มีชีวิตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในน้ำมะพร้าวกะทิ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 3.750×10^8 และ 3.350×10^8 cfu/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 4-10) ส่วนน้ำบีบสับปะรดมีจำนวนเซลล์มีชีวิตต่ำมากถึง 3×10^6 cfu/ml เนื่องจากค่ากรดด่างของอาหารที่เตรียมจากน้ำบีบสับปะรดต่ำมากถึง 3.61 ส่งผลให้ปริมาณเซลล์มีปริมาณต่ำลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม แสดงถึง *Bacillus subtilis* B04 ที่คัดเลือกมีความสามารถทนค่ากรดด่างที่ต่ำได้ถึง 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-10 ปริมาณ *Bacillus subtilis* B04 มีชีวิตในอาหารที่เตรียมจากผลพลอยได้ทางอุตสาหกรรมเกษตรหลังการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การใช้ผลพลอยได้อุตสาหกรรมเกษตรสำหรับการเพาะเลี้ยงมีการศึกษามากมายสำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacilus* เช่น การศึกษาของ Cladera-Olivera, Caron and Brandelli (2004) ในการใช้ Response-Surface Data แสดงการผลิตแบคเทอริโอซิน โดย *Bacillus licheniformis* P40 ได้สูงที่สุด (3000 AU/ ml) ในการใช้ Cheese Whey ที่มีความเข้มข้น 70 g /l รวมทั้งให้ปริมาณเซลล์สุงสุดเท่ากับ 5.7×10^8 cfu/ml

ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตร Molasses ประกอบไปด้วยสารอาหาร ได้แก่ น้ำตาล (น้ำตาลซูครา โลส กลูโคส ฟรุกโตส) ประมาณ 62 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่ไม่ใช้น้ำตาล (Nitrogenous Material, กรดอิสระ และสารละลายที่มีลักษณะเหนียว) ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นยังประกอบไปด้วยแร่ธาตุที่เป็นอนินทรีย์ (SiO_2, K_2O, CaO, MgO, P_2O_5, Fe_2O_3 Al_2O_3, SO_3 และ Cl) ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ (Olbrich, 2006) ดังนั้น *Bacillus subtilis* B04 จึงสามารถใช้ Molasses ในการเจริญได้สูงที่สุด สอดคล้องกับการทดลองเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* ในสูตรอาหารแบบขวดเขย่า 2 สูตร คือ สูตรที่มี Molasses และกากถั่วเหลืองเป็นหลัก พบว่าสูตรอาหาร Molasses มีสูตรที่เหมาะสมคือ Molasses 19.85 g/l (คิดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์), $CaC_{12}.2H_2O$ 0.35 g/l และ $MnSO_4$ $.H_2O$ 0.15 g/l ได้ความเข้มข้นสปอร์ 5.5×10^9 cfu/ml สูตรถั่วเหลืองเป็นหลักที่เหมาะสม คือ กากถั่วเหลือง 20 g/l, Molasses 3 g/l และ K_2HPO_4 0.5 g/l ได้ความเข้มข้นสปอร์ 1.3×10^9 cfu/ml เนื่องจากอาหารสูตรที่มีMolasses เป็นหลักทำให้เกิดฟองมากซึ่งเกิดปัญหายุ่งยากในการเพาะเลี้ยงในถังหมัก ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหารที่มีกากถั่วเหลืองเป็นหลัก และเติม Molasses เพื่อใช้ทดลองเมื่อใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร ความเข้มข้นของสปอร์เมื่อเวลา 48 ชั่วโมงคือ 1.78×10^9 และ 4.03×10^9 cfu/ml สำหรับการเลี้ยงแบบกะและกึ่งกะตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามการยับยั้งเชื้อก่อโรคหลายชนิดโดยวิธี Well Diffusion และ Paper Disc พบว่า จุลินทรีย์โปรไบโอติกดังกล่าว ไม่ได้สร้างสารต่อต้านเชื้อก่อโรคที่ทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* LTH, *Staphylococcus aureus, Salmonella typhi* และ *Salmonella anatum* SO86105 (ไวรุจน์ และคณะ, 2550) สอดคล้องกับศึกษาการใช้ Molasses 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ผสมกับแร่ธาตุเพียงเล็กน้อย ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* EFRL 01 พบว่า สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอส เนื่องจาก Molasses สารอาหารที่มากเพียงพอต่อความต้องการสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พร้อมกับการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส ทั้งสองระดับความเข้มข้น (0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์) ในการเป็นแหล่งคาร์บอนของ Molasses (Qureshi, et al., 2011) อีกทั้ง Molasses มีต้นทุนต่ำและคุ้มค่าเป็นแหล่งพลังงานที่มีประสิทธิภาพในการหมักขนาดใหญ่ของนักวิจัยในสาขาต่าง ๆ เช่น รายงานการผลิตโปรติเอสโดย Molasses ซึ่งของเสียอุตสาหกรรมเกษตร การใช้ประโยชน์จากของเสียจากอุตสาหกรรมการเกษตร ไม่เพียงแต่ตอบสนองความความต้องการในการใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิต และเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ แต่ยังช่วยลดมลพิษ (Abidi, Limam and Nejib, 2008) นอกจากนั้น

พบการเจริญเติบโตสูงสุดของ *Bacillus subtilis* KO มีค่าเท่ากับ 0.608 ถึง 0.780 g/ 100 ml จากการหมักโดยใช้ Molasses ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และเติม Galatin 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่เมื่อเติม $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้มีผลต่อการเจริญเพียงเล็กน้อย (0.741 g/ 100 ml) ดั้งนั้น *Bacillus subtilis* KO สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มี Inorganic Nitrogen ต่าง ๆ ที่เติมใน Molasses (Younis, et al., 2010)

น้ำมะพร้าวประกอบไปด้วยสารอาหารมากมาย ได้แก่ แหล่งของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอร์ กรดไขมัน กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ มากมาย (Yong, et al., 2009) ดังนั้น *Bacillus* BO4 จึงสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งมีการรายงานการใช้น้ำมะพร้าวสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ได้แก่ การเพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* strain TISTR976 ในน้ำมะพร้าวโดยการเลี้ยงด้วย Static Tray, แบบเขย่าขวด และถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำให้ได้เซลล์ 4.73, 5.32 และ 7.94 g/l ตามลำดับ (Suwannapinunt, Burakorn and Thaenthanee, 2007) การเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) ในน้ำมะพร้าว ซึ่งเป็นของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันมะพร้าว ทำให้เพิ่มปริมาณเซลล์ 3.1 g/l จำนวนสปอร์ $3.4x10^{11}$ Spores/ml และกิจกรรมการยับยั้งตัวอ่อนยุง (LC_{50}) 14.85 ng/ml ด้วยการบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับอาหารดั้งเดิมซึ่งมีราคาสูง (Prabakaran, et al., 2008) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chilcott and Pillai (1985) เกี่ยวกับการใช้ส่วนต่าง ๆ (สารสกัด Endrospore และน้ำมะพร้าว) ที่เป็นของเสียจากมะพร้าว นำมาเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) พบว่า การใช้น้ำพร้าวให้ปริมาณเซลล์สูง 0.25 ± 0.03 g/l เมื่อนำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำมะพร้าวนำไปทำรูปผงแสดงกิจกกรรมการยับยั้งตัวอ่อนยุง 0.013± 0.009 ng/ml

น้ำบีบสับปะรดเป็นของเสียที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรม มีสารอาหารที่เป็นส่วนประกอบได้แก่ น้ำตาลทั้งหมด 321,645 ml/l น้ำตาลรีดิวซ์ 140,000 ml/l ไนโตรเจนทั้งหมด 0.75 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 3.9 ถึง 4.0 (นฤมล, 2552) ถึงแม้ว่าประมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำบีบสับปะรดจะมีปริมาณสูง แต่น้ำบีบมีค่าความเป็นกรดต่ำมากจึงไม่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* BO4 เพื่อเพิ่มจำนวน

4.7.4 ผลการคัดเลือกอาหารอย่างง่ายและราคาถูกที่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน *Bacillus subtilis* B04

การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 พิจารณาจากปริมาณเซลล์ที่ผลิตได้ ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค การผลิตเอนไซม์ช่วยย่อย และราคาต้นทุน โดยเปรียบเทียบกำลังการผลิตเชื้อกับราคาอาหารต่อการผลิต 1 ลิตร

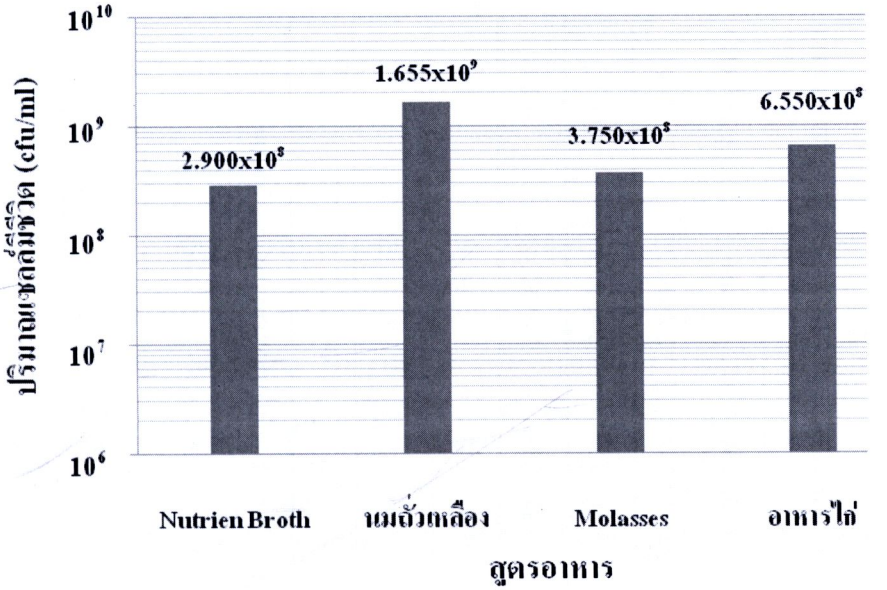
จากการคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Bacillus subtilis* B04 พบว่า *Bacillus subtilis* B04 เติบโตได้ดีที่สุดในนมถั่วเหลืองความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (อาหารอย่างง่าย) และ Molasses (ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตร) รวมทั้งอาหารไก่ซึ่งเป็นอาหารอย่างง่ายและราคาถูก จึงนำอาหารทั้ง 3 ชนิดไปศึกษาต่อ ส่วนอาหารสังเคราะห์ได้ปริมาณเซลล์มีชีวิตต่ำมาก เมื่อเทียบกับ Nutrient Broth จึงไม่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมที่จะคัดเลือกไปศึกษาต่อ

จากภาพที่ 4-11 และตารางที่ 4-4 นมถั่วเหลืองความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณเซลล์ที่ผลิตได้ สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ Nutrient Broth, Molasses และ อาหารไก่ เนื่องจากนมถั่วเหลืองอุดมไปด้วยธาตุอาหารที่สมบูรณ์ทำให้ *Bacillus subtilis* B04 สามารถนำไปใช้ในการเติบโตได้อย่างเต็มที่ เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดด่างของอาหารจากตารางที่ 4-5 จะเห็นได้ว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในน้ำนมถั่วเหลืองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง น้ำนม ถั่วเหลืองมีค่าความเป็นกรดลดลงจาก 7.74 เป็น 6.69 แสดงว่า *Bacillus subtilis* B04 สามารถผลิตกรดได้ในระหว่างการเจริญ ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ในขณะที่ Nutrient Broth, Molasses และอาหารไก่ มีค่าความเป็นกรดด่างเพิ่มสูงขึ้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามราคาต้นทุนโดยเปรียบเทียบกำลังการผลิตเชื้อกับราคาอาหารต่อการผลิต 1 ลิตรสูงกว่า Molasses และ อาหารไก่ เป็นอย่างมาก (แม้ว่าราคาต่อหน่วยจะต่ำกว่า Nutrient Broth)

Bacillus subtilis B04 สามารถเจริญได้ดี (ปริมาณเซลล์ 3.750 x 10^8 cfu/ml) ในอาหารที่เตรียมจาก Molasses ถึงแม้ว่าจะมีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับ *Bacillus subtilis* B04 ที่เพาะเลี้ยงในนมถั่วเหลืองความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ราคาต่อหน่วยของอาหารที่เตรียมจาก Molasses ถูกกว่านมถั่วเหลืองความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 50 เท่า

อาหารไก่แม้ว่าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราคาต่อหน่วยถูกที่สุด และ*Bacillus subtilis* B04 สามารถเจริญได้ดี (ปริมาณเซลล์ 6.550 x 10^8 cfu/ml) แต่ *Bacillus subtilis* B04 ที่เพาะเลี้ยงได้มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยได้น้อยที่สุด

ดังนั้นจึงเลือกอาหารที่เตรียมจาก Molasses ไปศึกษาเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และความสามารถในการผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยต่อไป



ภาพที่ 4-11 ปริมาณ *Bacillus subtilis* B04 มีชีวิตในอาหารที่ถูกคัดเลือกหลังการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth

ตารางที่ 4-4 ปริมาณ *Bacillus subtilis* B04 ที่มีชีวิต การยับยั้งเชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ จากอาหารที่ถูกคัดเลือก

Nutrient Broth Medium	ปริมาณเซลล์ (cfu/ml)	Inhibition Zone (cm) ; $\bar{x}$ ±SD		Clear Zone (cm) ; $\bar{x}$ ±SD				ราคาอาหาร (บาท/ลิตร)
		E.coli	*S. aureus*	Protease	Amylase	cellulase	lipase	
Nutrient Broth	$2.900x10^8$	1.50±0.09	1.01±0.04	2.40±0.13	3.25±0.52	3.18±0.24	2.59±0.27	52.00
นมถั่วเหลือง	$1.655x10^9$	1.88±0.05	1.49±0.04	3.10±0.41	3.58±0.61	3.56±0.52	2.59±0.59	16.67
Molasses	$3.750x10^8$	1.09±0.06	1.14±0.04	2.83±0.20	3.28±0.32	2.88±0.37	1.89±0.42	0.30
อาหารไก่	$6.550x10^8$	0.99±0.08	0.91±0.04	2.44±0.26	3.69±0.54	2.41±0.48	1.88±0.31	0.15

ตารางที่ 4-5 ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)/ อาหาร	ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ												
	อาหารอย่างง่าย						อาหารสังเคราะห์					ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการเกษตร	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	6.75	6.43	7.74	6.92	7.42	6.88	4.85	6.66	4.81	6.66	5.46	5.64	3.61
24	6.44	6.18	6.69	7.18	5.57	7.69	5.87	7.42	5.78	7.24	6.91	7.52	3.66

*1. น้ำนม (ไทย-เดนมาร์ค), 2. น้ำแป้ง, 3. นมถั่วเหลือง (แลคตาซอยไฮแคลเซียม สูตรเจ) , 4. น้ำเต้าหู้, 5. ข้าวโพดผง 10 g/l , 6. อาหารไก่, 7. น้ำตาลกลูโคสผสม Monosodium Glutamate (อายิโนะโมะโต๊ะ), 8. น้ำตาลกลูโคสผสม $(NH_4)_2SO_4$, 9. น้ำตาลซูโครสผสม Monosodium Glutamate (อายิโนะโมะโต๊ะ), 10. น้ำตาลซูโครสผสม $(NH_4)_2SO_4$, 11. Molasses, 12. น้ำมะพร้าว และ13. น้ำบีบสับปะรด 50 เปอร์เซ็นต์

4.8 การหาสูตรที่เหมาะสมของอาหาร Molasses สำหรับการเจริญ การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของ *Bacillus subtilis* B04

4.8.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนระหว่าง Molasses กับ Monosodium Glutamate ต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04 ในอาหาร Molasses

จากผลการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารอย่างง่ายและราคาถูก 3 ประเภท ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากผลพลอยได้ทางอุตสาหกรรมเกษตร พบว่า การใช้ Molasses มีความเหมาะสมที่สุด เมื่อพิจารณาจากปริมาณเซลล์ที่ผลิต ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และการผลิตเอนไซม์ช่วยย่อย รวมทั้งอาหาร Molasses มีต้นทุนในการผลิตต่อหน่วยที่ต่ำมาก

จากการทดลองเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน (Monosodium Glutamate) ได้ดีกว่าอนินทรีย์ไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากนมถั่วเหลืองแลตตาซอยหรือน้ำเต้าหู้ ซึ่งมีโปรตีนเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนปริมาณสูงจึงทำให้ *Bacillus subtilis* B04 สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคและสร้างเอนไซม์ได้ดี

การทดลองนี้ได้แปรผันอัตราส่วนระหว่าง Molasses กับ Monosodium Glutamate ในอาหาร Molasses พบว่าการเติม Monosodium Glutamate เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร Molasses มีผลต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่เติม Monosodium Glutamate) ดังตารางที่ 4-6 การเพิ่มอัตราส่วนระหว่าง Molasses กับ Monosodium Glutamate ในอาหาร Molasses จาก 5 : 1 ไปจนถึง 5 : 3 มีผลทำให้ปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้นมากขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคและการสร้างเอนไซม์ช่วยย่อยมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนระหว่าง Molasses กับ Monosodium Glutamate ในอาหาร Molasses เท่ากับ 5 : 1 ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4-6 ปริมาณเซลล์ การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค การสร้างเอนไซม์ และราคาอาหารในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก Molasses ผสม Monosodium Glutamate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Nutrient Broth Medium	ปริมาณเซลล์ (cfu/ml)	Inhibition Zone (cm) ; $\bar{X}$ ±SD		Clear Zone (cm) ; $\bar{X}$ ±SD				ราคาอาหาร (บาท/ลิตร)
		E.coli	*S. aureus*	Protease	Amylase	Cellulase	Lipase	
Molasses 10 g/l	3.550×10^8	1.03±0.05	1.28±0.15	2.58±0.04	1.23±0.15	1.925±0.10	1.53±0.05	0.30

ตารางที่ 4-6 (ต่อ)

Nutrient Broth Medium	ปริมาณเซลล์ (cfu/ml)	Inhibition Zone (cm) ; $\bar{X}$ ±SD		Clear Zone (cm) ; $\bar{X}$ ±SD				ราคาอาหาร (บาท/ลิตร)
		E.coli	*S. aureus*	Protease	Amylase	Cellulase	Lipase	
Molasses 10 g/l + MSG 2 g/l	$3.950x10^8$	1.58±0.04	2.05±0.08	2.65±0.05	1.45±0.05	2.00±0.14	1.87±0.27	0.52
Molasses 10 g/l + MSG 4 g/l	$4.050x10^8$	1.53±0.05	1.97±0.08	2.58±0.04	1.43±0.05	2.05±0.06	1.68±0.12	0.74
Molasses 10 g/l + MSG 6 g/l	$5.100x10^8$	1.50±0.06	1.93±0.08	2.60±0.00	1.45±0.05	2.08±0.05	1.85±0.10	0.97

ซึ่งการแปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน จากการใช้ *Bacillus* sp. L21 เพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจาก Moltose และ Soybean โดยการเติมเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การใช้ Moltose 20 g/l และ soybean 2 g/l (10:1) แสดงกิจกรรมการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดเท่ากับ 306.5 U/ml (Tari, Genckal and Tokat, 2006)

4.8.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ Molasses กับ Monosodium Glutamate ต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04 ในอาหาร Molasses ที่อัตราส่วน C : N เท่ากับ 5 : 1

จากการทดลองคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเพิ่มปริมาณเซลล์และความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ พบว่าการใช้อาหารที่เตรียมจาก Molasses และ Monosodium Glutamate อัตราส่วน C : N เท่ากับ 5 : 1 (Molasses 10 g/l ผสม Monosodium Glutamate 2 g/l) มีความเหมาะสมต่อการผลิต *Bacillus subtilis* B04 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ Molasses กับ Monosodium Glutamate ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04 ในอาหาร Molasses ที่อัตราส่วน C : N เท่ากับ 5 : 1 จึงแปรผันความเข้มข้นของ Molasses จาก 10 g/l จนถึง 40 g/l และความเข้มข้นของ Monosodium Glutamate จาก 2 g/l จนถึง 8 g/l พบว่า Molasses 10 g/l ผสม Monosodium Glutamate 2 g/l , Molasses 20 g/l ผสม Monosodium Glutamate 4 g/l , Molasses 30 g/l ผสม Monosodium Glutamate 6 g/l, Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ให้

ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มากนัก โดยการใช้ Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ให้ปริมาณเซลล์สูงที่สุด ($6.750x10^8$ cfu/ml) รวมทั้งให้ความสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคและสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 4-7 ดังนั้นการใช้ Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l จึงเป็นความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมที่สุด

ตารางที่ 4-7 ปริมาณเซลล์ การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค การสร้างเอนไซม์ และราคาอาหาร ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก Molasses ผสม Monosodium Glutamate อัตราส่วน C : N เท่ากับ 5 : 1

Nutrient Medium	ปริมาณเซลล์ (cfu/ml)	Inhibition Zone (cm) ; $\bar{X}$ ±SD		Clear Zone (cm) ; $\bar{X}$ ±SD				ราคาอาหาร (บาท/ลิตร)
		E.coli	*S. aureus*	Protease	Amylase	Cellulase	Lipase	
Molasses 10 g/l + MSG 2 g/l	$3.950x10^8$	1.60±0.00	1.95±0.05	2.58±0.04	1.45±0.05	1.97±0.05	1.67±0.10	0.52
Molasses 20 g/l + MSG 4 g/l	$4.150x10^8$	1.63±0.08	2.12±0.04	2.60±0.06	1.50±0.09	1.93±0.05	1.57±0.05	1.04
Molasses 30 g/l + MSG 8 g/l	$5.050x10^8$	1.73±0.05	2.10±0.00	2.55±0.08	1.51±0.10	1.93±0.08	1.53±0.12	1.57
Molasses 40 g/l + MSG 8 g/l	$6.750x10^8$	1.85±0.05	2.10±0.00	2.9±0.13	1.57±0.05	2.12±0.12	1.75±0.10	2.09

ผลการทดลองที่ได้ ใกล้เคียงกับ *Bacillus* sp. JMA 5 ที่แยกจากดิน และใช้ในการผลิต Polydroxybutyrate (PHB) ได้สูงที่สุดโดยใช้ Molasses 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับการใช้ Corn Steep Liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน (Gouda, Swellam and Omar, 2001)

จากการศึกษาของ Younis, et al. (2010) *Bacillus subtilis* KO เจริญเติบโตสูงสุด มีค่าเท่ากับ 0.780 g/ 100 ml เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้ Molasses ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่เมื่อความเข้มข้นของ Molasses ที่มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเจริญมีค่าต่ำลง และอรพิน และสุชาดา (2536) เพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B31 และ NTG 259 โดยใช้ Glucose Monohydrete 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ L-Glutamic Acid 0.4 เปอร์เซ็นต์ และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และผสมแร่ธาตุที่จำเป็นอื่น ๆ

รวมทั้งศึกษาการใช้ Monosodium Glutamate 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่ผลิตในประเทศไทยแทนการใช้ L-Glutamic Acid 0.4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการผลิตในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร พบว่า สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากทั้งสองสายพันธุ์มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันโดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ ก่อโรคในสัตว์ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

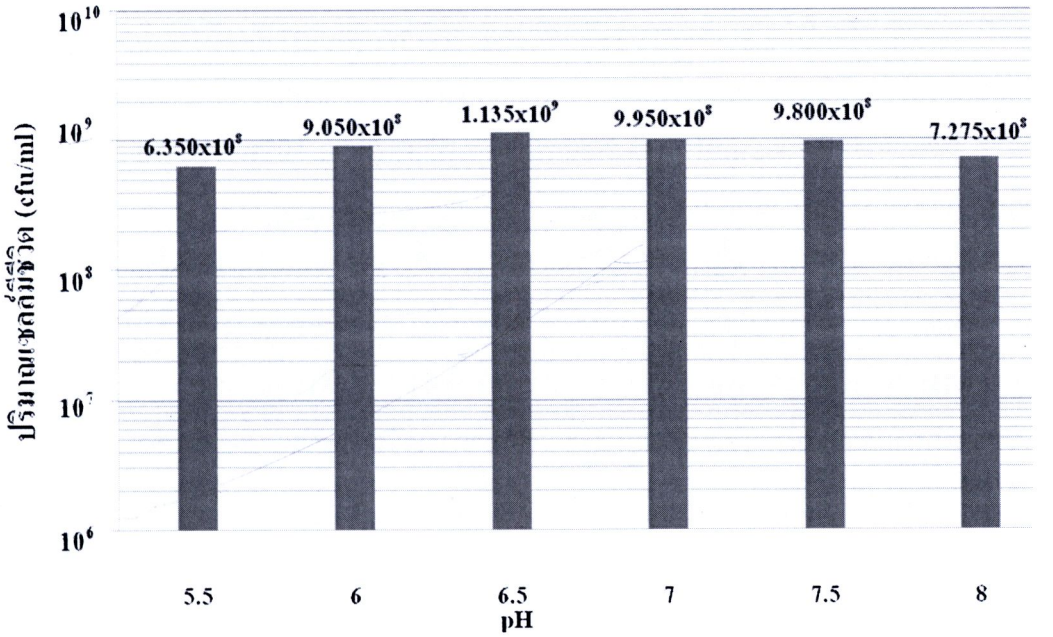
การเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารอาจทำให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลง เช่น การเพิ่มความเข้มข้นของรำสาลีในการเพาะเลี้ยง *Bacillus licheniformis* GCBU-8 ทำให้อัตราการกวนลดลงและทำให้การผสมของอากาศที่ไม่ทั่วถึง ซึ่งมักจะส่งผลในเรื่องของการเจริญเติบโตของเซลล์ และการสร้างเอนไซม์อะไมเลส (Haq, et al., 2003) และการศึกษาของ Cladera-Olivera, Caron and Brandelli (2004) ในการใช้ Response-Surface Data แสดงการผลิตแบคเทอริโอซินโดย *Bacillus licheniformis* P40 ได้ดี (3200 AU/ ml) ในการใช้ Cheese Whey ที่มีความเข้มข้น 70 g /l รวมทั้งให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ $5.7x10^8$ cfu/ml แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Cheese Whey เป็น 100 g /l พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 การบ่มที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเซลล์มีชีวิตสูงที่สุด $3.50 x10^8$ cfu/ml แต่อย่างไรก็ตาม สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน 700 AU/ml ซึ่งต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงที่ค่ากรดด่างเท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (3200 AU/ml; $2.70x10^7$ cfu/ml) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Cheese Whey เป็น 120 g /l พบว่าที่ค่ากรดด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเซลล์ $1.97x10^8$ cfu/ml สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงที่สุด (4000 AU/ml)

ดังนั้นจากการศึกษาของ Cladera-Olivera, Caron and Brandelli (2004) แสดงให้เห็นว่านอกจากความอัตราส่วน ความเข้มข้นของอาหาร ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* แล้ว ค่าความเป็นกรดด่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการเติบโตและสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค

4.8.3 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร Molasses ต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคและเอนไซม์ได้ดี จึงศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเพื่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ให้มีค่า 5.54 (ไม่ปรับ), 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 พบว่า การปรับค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเป็น 6.5 ทำให้สามารถผลิตปริมาณเซลล์ได้สูงที่สุด ($1.135x10^9$ cfu/ml) (ภาพที่ 13) และมีสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และสร้างเอนไซม์ได้ใกล้เคียงกับที่ไม่มีการปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร (ตารางที่ 4-8) ดังนั้นการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 จากอาหารที่เตรียมจาก Molasses 40 g/l ผสม

Monosodium Glutamate 8 g/l ที่ค่ากรดด่าง 6.5 เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 สำหรับการทำแห้งแบบถาด



ภาพที่ 4-12 ปริมาณ *Bacillus subtilis* B04 ที่มีชีวิตจากการเพาะเลี้ยงใน Molasses 40 g/l ที่ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่าง ๆ หลังการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4-8 ปริมาณเซลล์ การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 และ 6.5

Molasses 40 g/l + MSG 8 g/l	ปริมาณเซลล์ (cfu/ml)	Inhibition Zone (cm) ; $\bar{X}$ ±SD		Clear Zone (cm) ; $\bar{X}$ ±SD			
		E.coli	*S. aureus*	Protease	Amylase	Cellulase	Lipase
pH 5.5	$6.350x10^{8}$	1.79±0.03	2.15±0.08	2.86±0.07	1.97±0.07	1.71±0.05	1.80±0.10
pH 6.5	$1.135x10^{9}$	1.78±0.05	2.18±0.07	2.93±0.07	1.98±0.09	1.72±0.06	1.87±0.11

ค่ากรดด่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* มีผลต่อเรื่องการเจริญเติบโต การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ ซึ่งมีการรายงานการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น *Bacillus subtilis* KO เจริญเติบโตสูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.693g/100 ml และ 0.682g/100 ml

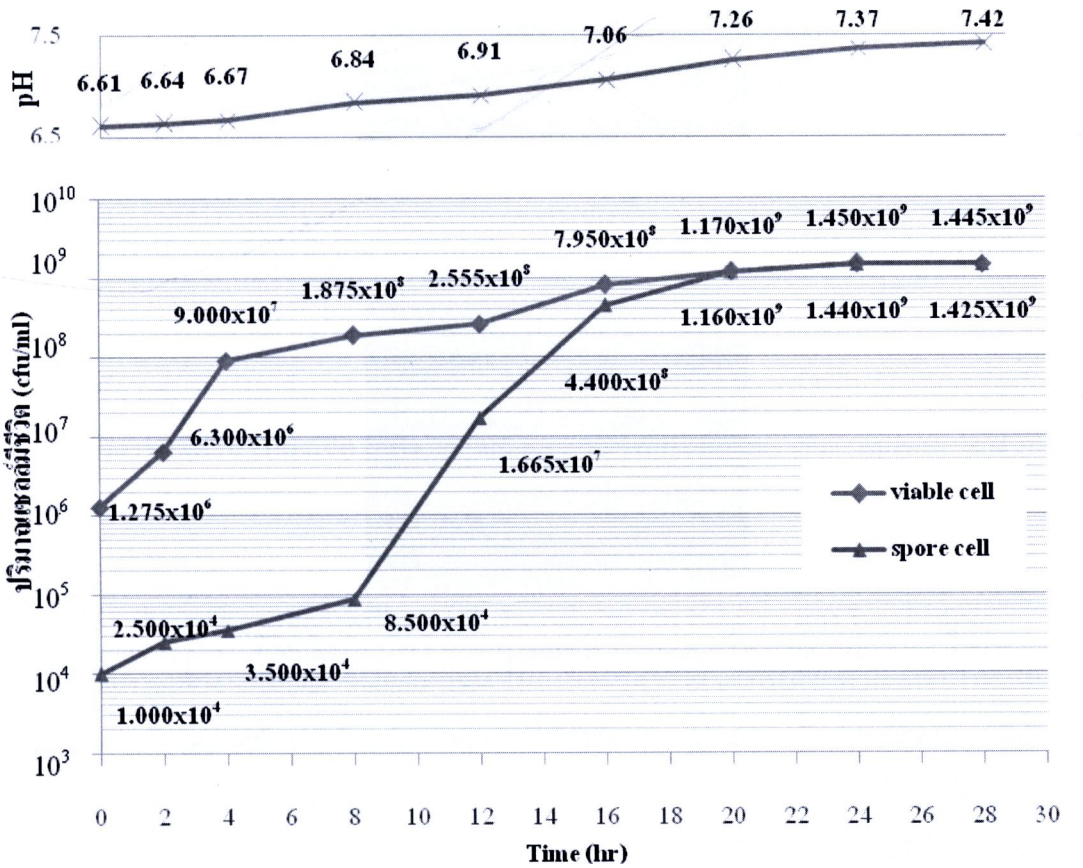
จากการหมักโดยใช้ Molasses ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในค่าความเป็นกรดด่างช่วง 6.5 และ 7 ตามลำดับ (Younis, et al., 2010) สอดคล้องกับการผลิตแบคเทอริโอซิน โดย *Bacillus licheniformis* P40 ได้สูงที่สุดที่การเพาะเลี้ยงที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.5 และ 7.5 อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 26 และ 37 องศาเซลเซียส ในการใช้ Cheese Whey ที่มีความเข้มข้น 70 g /l (Cladera-Olivera, Caron and Brandelli, 2004) และการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* S11 ที่ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 4 จะไม่มีการสร้างสารต้านจุลชีพทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Listeria monocytogenes*, *Stapylococcus aureus* และ *Escherichia coli* เนื่องจากไม่สามารถเจริญได้ที่ค่ากรดด่างนี้ แต่ *Bacillus subtilis* s11 จะเจริญได้ดีและสามารถสร้างสารขึ้นได้ในค่ากรดด่างของอาหารที่ 6 ถึง 9 และค่ากรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารต้านจุลชีพเท่ากับ 7 (ศิริรัตน์, 2541)

นอกจากนั้น Vidyalakshmi, et al. (2009) ศึกษาการเจริญ *Bacilus* spp. ในอาหารที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่า 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 พบว่า สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงที่สุด (11 U/ml) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7 เช่นเดียวกับ Teodoro and Martins (2000) พบ *Bacillus* sp. เจริญได้ดีอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารที่เตรียมจากสารละลายแป้ง และมีการเติม Calcium 10 mM หรือ Peptone 1 เปอร์เซ็นต์ และ Yeast Extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการสร้างเอนไซม์อะไมเลสที่สร้างจากเซลล์ที่เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และ 7.0 ส่วนการเพาะเลี้ยง *Bacilus subtilis* ในอาหารที่ปรับค่ากรดด่างให้มีค่า 5, 6, 7, 8 และ 9 พบว่าสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด 48.5 U/ml (Hasan and Hameed 2001) และ *Bacillus sp.* I-312 สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ดี (42,520 U /ml) ที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ 11 และ 60 องศาเซลเซียส (Joo and Chang, 2005)

4.9 ผลการศึกษาการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04 ในอาหาร Molasses

จากผลการทดลองดังภาพที่ 4-13 พบว่า *Bacillus subtilis* B04 จากเซลล์เริ่ม 1.275 $x10^6$ cfu/ml เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วจนเข้าสู่ระยะ Steady State ที่ชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณเซลล์เท่ากับ $7.950x10^8$ cfu/ml และมีปริมาณเซลล์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ $1.450x10^9$ cfu/ml ส่วนเซลล์สปอร์มีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ $1.000x10^4$ cfu/ml และเพิ่มเพียงเล็กน้อยจนถึง 8 ชั่วโมง ให้ปริมาณเซลล์ $8.500x10^4$ cfu/ml หลังจากนั้นปริมาณเซลล์สปอร์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนเริ่มมีปริมาณคงที่ที่ชั่วโมงที่ 20 โดยมีปริมาณเซลล์สปอร์เท่ากับ $1.160x10^9$ cfu/ml และมีปริมาณเซลล์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ $1.440x10^9$ cfu/ml

การเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์สปอร์แสดงให้เห็นว่าสภาวะของอาหารและค่ากรดด่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มที่จะไม่เหมาะสมการเจริญ ทำให้เซลล์มีการสร้างสปอร์เพื่อการอยู่รอดมากขึ้น จนในที่สุดเซลล์มีชีวิตที่ได้เป็นเซลล์สปอร์ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับค่ากรดด่างของอาหารที่เริ่มมีค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ถึงชั่วโมงที่ 28 ดังนั้น จึงเลือกระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ให้ปริมาณเซลล์มีชีวิตและเซลล์สปอร์สูงใกล้เคียงกับการเลี้ยงที่ระยะเวลา 28 ชั่วโมง ซึ่งสิ้นเปลืองเวลาและพลังงาน

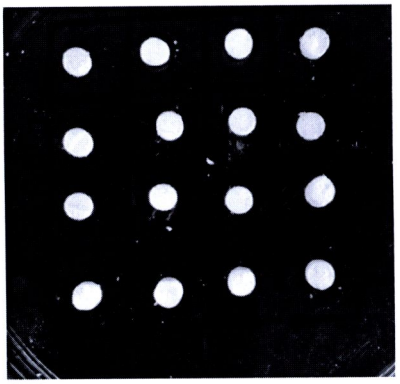


ภาพที่ 4-13 การศึกษาการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04 ในอาหาร Molasses

4.10 ผลการผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในรูปเม็ดและผงโดยวิธีการอบแห้งด้วยวิธี Tray Drying

สำหรับการผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในรูปเม็ด (ภาพที่ 4-14) พบว่าเมื่อใช้เวลาในการอบแห้งมากขึ้น ความชื้นของเม็ดเชื้อมีแนวโน้มลดลง เช่นเดียวกับปริมาณเซลล์มีชีวิตที่ลดลง โดยเวลาที่เหมาะสมในการอบแห้งเม็ดเชื้อคือ 40 นาที ซึ่งมีปริมาณเซลล์มีชีวิตเท่ากับ 3.141×10^{9} cfu/g และมีความชื้นเท่ากับ 3.72 ± 0.88 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกับการผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในรูปผง (ภาพที่ 4-15) ซึ่งพบว่า ความชื้นของผงเชื้อและปริมาณเซลล์มีชีวิตมีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้เวลาในการอบแห้งมากขึ้น โดยเวลาที่เหมาะสมในการอบแห้งเม็ดเชื้อคือ 40 นาที ซึ่งมี

ปริมาณเซลล์ มีชีวิตเท่ากับ $3.570x10^9$ cfu/g และมีความชื้นเท่ากับ 3.79 ± 0 .49 เปอร์เซ็นต์ และการทำแห้งทั้งสองวิธีทำให้ปริมาณเซลล์มีชีวิตในผลิตภัณฑ์ลดลงเพียงเล็กน้อยจากเริ่มต้น $8.550x10^9$ cfu/g



ภาพที่ 4-14 ลักษณะเม็ดเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 หลังทำแห้งด้วยวิธี Tray Drying

ภาพที่ 4-15 ลักษณะผงเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 หลังทำแห้งด้วยวิธี Tray Drying

ตารางที่ 4-9 ปริมาณความชื้น และปริมาณเซลล์มีชีวิต หลังการอบแห้ง *Bacillus subtilis* B04 ในรูปเม็ดและผง

รูปแบบ	ระยะเวลาในการอบแห้ง (นาที)	Moisture (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณเซลล์มีชีวิตหลังการอบแห้ง (cfu/g)
เม็ด	20	4.85±0.96	$3.820x10^9$
	40	3.72±0.88	$3.141x10^9$
	60	3.52±0.62	$2.664x10^9$
ผง	20	5.41±0.70	$4.422x10^9$
	40	3.79±0.49	$3.570x10^9$
	60	3.29±0.11	$2.953x10^9$

ในปัจจุบันการผลิตผลิตภัณฑ์เชื้อแห้งมีหลายรูปแบบ เช่น Freeze Drying, Spray Drying และ Tray Drying การทำแห้งเชื้อด้วยวิธี Freeze Drying และ Spray Drying ต้องใช้ค่าใช่จ่ายสูง สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ (Carvalho, et al. 2004) การทำแห้งเชื้อด้วยวิธี Tray Drying จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจด้วยข้อดีหลายประการโดยเฉพาะเรื่องต้นทุนในการผลิต การทำแห้งเชื้อโดยใช้แป้งเป็นตัวกลาง (Carrier Media) เป็นเทคนิคการทำไมโครแคปซูลเลชันวิธีหนึ่ง เป็นเทคโนโลยีที่มีการใช้กับโปรไบโอติกเพื่อทำแห้งเชื้อ การผสมในอาหารและรักษาความมีชีวิตของเชื้อในระบบทางเดินอาหาร เหมาะสำหรับกระบวนการที่ใช้ความร้อนสูง และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพิ่มความมีชีวิตของโปรไบโอติกในระหว่างการผลิตจาก Pellet ซึ่งสารที่ใช้เป็นไมโครแคปซูล มีการใช้กันอย่างมากมายหลายประเภทได้แก่ สารประเภทคาร์โบไฮเดรต (Maltodextrin, Gum Acacia, Modified Starch Materials, Dehydrated Glucose Syrups), ประเภทโปรตีน (Skim Milk) และประเภทไขมัน (Glycerol) และอื่น ๆ (Kosin and Rakshit, 2006)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการผลิต *Bacillus subtilis* B04 ทั้งในรูปเม็ดและผงแห้งใช้เวลาในการอบแห้งที่เหมาะสมเท่ากันคือ 40 นาที โดยได้ปริมาณเซลล์มีชีวิตและความชื้นใกล้เคียงกัน แต่การผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในรูปเม็ดมีขั้นตอนการผลิตและต้องใช้อุปกรณ์ที่ยุ่งยากกว่าการผลิตในรูปผงเชื้อ ดังนั้นเพื่อให้สะดวกต่อการผลิต *Bacillus subtilis* B04 อบแห้งจำนวนมากจึงเลือกการผลิตในรูปผงแห้งเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4.11 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อ *Bacillus subtilis* B04 ในรูปผงแห้ง

การเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม และผลิตเชื้อในรูปผงแห้ง บรรจุถุง อลูเนียมฟอยด์ และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ปริมาณความชื้น วัดปริมาณเซลล์มีชีวิต และทดสอบกิจกรรมการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ย่อยอาหารได้แก่ โปรติเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไลเปส ผลดังตารางที่ 4-10

Bacillus subtilis B04 ในรูปผงแห้งที่ผลิตได้มีปริมาณเซลล์มีชีวิตเท่ากับ 6.950×10^{9} cfu/g และมีความชื้นเท่ากับ 2.59 ± 0.34 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงเล็กน้อยในช่วงเดือนแรก จาก 6.950×10^{9} cfu/ml เป็น 4.200×10^{9} cfu/ml และมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกันในเดือนที่ 2 และ 3 ของการเก็บรักษา ความชื้นใน *Bacillus subtilis* B04 ผงแห้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงเดือนแรก (จาก 2.59 ± 0.34 เปอร์เซ็นต์ เป็น 3.24 ± 0.39 เปอร์เซ็นต์) และเพิ่มขึ้นมากในเดือนที่ 2 และ 3 (ความชื้นประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์)

Bacillus subtilis B04 ผงแห้งที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงเล็กน้อยในช่วงเดือนแรก จาก 6.950×10^{9} cfu/g เป็น 5.000×10^{9} cfu/g และมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกันในเดือนที่ 2 และ 3 ของการเก็บรักษา ความชื้นใน *Bacillus subtilis* B04

ผงแห้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงเดือนแรก (จาก 2.59 ± 0.34 เปอร์เซ็นต์ เป็น 3.06 ± 0.75 เปอร์เซ็นต์) และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในเดือนที่ 2 และ 3 (ความชื้นประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์)

จากผลการทดลองการเก็บรักษา *Bacillus subtilis* B04 ผงแห้ง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้ผลดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องทั้งปริมาณเซลล์มีชีวิตและความชื้นของผงเชื้อแห้ง แต่เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์รอดชีวิตในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องจะเห็นได้ว่าลดลงกว่าที่เก็บแบบแช่เย็นไม่มากนัก

ตารางที่ 4-10 ความชื้น และปริมาณเซลล์มีชีวิตหลังเก็บรักษาผง *Bacillus subtilis* B04 ที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน

Storage Temperature	Time (Month)	Moisture (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณเซลล์(cfu/g)
	0	2.59±0.34	$6.950x10^9$
Room temperature	1	3.24±0.39	$4.200x10^9$
	2	6.36±0.34	$4.050x10^9$
	3	6.66±0.316	$4.100x10^9$
4°C	1	3.066±0.75	$5.000x10^9$
	2	3.766±0.11	$4.800x10^9$
	3	4.066±0.35	$4.750 x10^9$

4.12 ผลการศึกษาการใช้ *Bacillus subtilis* B04 ผงแห้งเป็นหัวเชื้อ เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน

Bacillus subtilis B04 ผงแห้งที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 3 เดือน สามารถใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 โดยพบว่าได้ปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกันเมื่อใช้ผงเชื้อปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นหัวเชื้อในอาหาร Molasses เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปริมาณเซลล์ที่ได้ใกล้เคียงกับเชื้อผงก่อนการเก็บรักษา

นอกจากนี้เมื่อนำ *Bacillus subtilis* B04 ที่เพาะเลี้ยงได้ไปทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคและการสร้างเอนไซม์ช่วยย่อย พบว่าหัวเชื้อที่ผ่านการเก็บรักษาจากทั้งสองอุณหภูมิมีความสามารถในการสร้างสารยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* และความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปส ใกล้เคียงกัน

จากผลการทดลองข้างต้น ถึงแม้ว่าการเก็บรักษา *Bacillus subtilis* B04 ผงแห้ง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้ผลดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องทั้งปริมาณเซลล์มีชีวิตและความชื้นของผงเชื้อแห้ง แต่เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์รอดชีวิตในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องจะเห็นได้ว่าลดลงกว่าที่เก็บแบบแช่เย็นไม่มากนัก และการใช้ผงเชื้อที่เก็บรักษาในทั้งสองอุณหภูมิเป็นหัวเชื้อให้ปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคและการสร้างเอนไซม์ช่วยย่อยของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้จากผงเชื้อทั้งสองยังมีค่าใกล้เคียงกันอีกด้วย ดังนั้นเก็บรักษาผงเชื้อที่ผลิตได้เป็นเวลา 3 เดือน อาจไม่จำเป็นต้องแช่เย็น เพื่อเป็นการประหยัดพลังงานและสะดวกต่อการเก็บรักษาและการนำไปใช้

ตารางที่ 4-11 ปริมาณเซลล์มีชีวิตเริ่มและหลังการเพาะเลี้ยงใน Molasses ผสม Monosodium Glutamate ในการเป็นหัวเชื้อ กิจกรรมการสร้างเอนไซม์ และสารยับยั้งเชื้อก่อโรค หลังเก็บรักษาผง *Bacillus subtilis* B04 ที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน

Storage Temperature	Time (Month)	ปริมาณเซลล์ (cfu/ml)		Inhibition Zone (cm) ; $\bar{x}$ ±SD		Clear Zone (cm) ; $\bar{x}$ ±SD			
		0 hr	24 hr	*E.coli*	*S. aureus*	Protease	Amylase	Cellulase	Lipase
	0	6.950×10^7	8.933×10^8	1.83±0.05	2.29±0.03	2.51±0.21	1.62±0.04	1.88±0.00	1.10±0.00
Room temperature	1	4.200×10^7	7.100×10^8	1.82±0.06	2.33±0.05	2.33±0.05	1.66±0.05	1.79±0.05	1.01±0.03
	2	4.050×10^7	7.450×10^8	1.79±0.02	2.16±0.11	2.25±0.05	1.59±0.06	1.71±0.05	1.01±0.03
	3	4.100×10^7	7.300×10^8	1.73±0.05	2.24±0.05	2.23±0.04	1.63±0.05	1.72±0.07	1.00±0.00
4°C	1	5.000×10^7	8.550×10^8	1.83±0.05	2.22±0.04	2.36±0.05	1.69±0.04	1.84±0.08	1.03±0.05
	2	4.800×10^7	7.900×10^8	1.79±0.03	2.19±0.07	2.26±0.08	1.62±0.04	1.77±0.06	1.00±0.00
	3	4.750×10^7	7.333×10^8	1.78±0.04	2.20±0.05	2.24±0.06	1.60±0.00	1.72±0.06	1.00±0.00