รายงานการวิจัย

การพัฒนากระบวนการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

โดย

ดร. สิตานัน ธิติประเสริฐ

รองศาสตราจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล

ศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ (อาจารย์ที่ปรึกษาอาวุโส)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่ ปีที่ 1 กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2559 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทางผู้วิจัยขอขอบพระคุณสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกเครื่องมือและสถานที่ในการทำงานวิจัย และผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาว เพชรรัตน์ ใจเอื้อ ที่ร่วมช่วยเหลือในการเตรียมอุปกรณ์และเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ พร้อมทั้งการวิเคราะห์ผลในงานวิจัยชิ้นนี้

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	4
บทที่ 2 วิธีการศึกษา	4
2.1 เชื้อแบคทีเรีย	4
2.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี	4
2.3 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น	5
2.4 การศึกษาหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์	5
2.5 การศึกษาหาความเข้มข้นของส่วนประกอบของอาหาร GY (Glucose-yeast extract) ที่ช่วยส่งเสริมการสร้างสปอร์	6
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	7
3.1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี	7
3.2 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น	9
3.3 การศึกษาหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์	10
3.4 การศึกษาความสามารถในการสร้างสปอร์ของเชื้อ 3 สายพันธุ์	14

สารบัญ

	หน้า
3.5 การศึกษาความเข้มข้นของส่วนประกอบของอาหาร GY (Glucose-Yeast extract) ที่ช่วยส่งเสริมการสร้างสปอร์	17
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	20
เอกสารอ้างอิง	21

สารบัญรูป/ตาราง

หน้า

รูปที่ 1 วัฏจักรการสร้างสปอร์ของกลุ่มจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่สร้างสปอร์ 2

รูปที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่ออยู่ในอาหารที่ pH ต่ำ และผสมด้วย bile salt 10

รูปที่ 3 แสดงความขุ่นของเซลล์ (cell density; OD600) และ pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างเลี้ยงเซลล์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารชนิด NB 11

รูปที่ 4 แสดงความขุ่นของเซลล์ (cell density; OD_{600}), Glucose, lactic acid และ pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างเลี้ยงเซลล์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารชนิด GY ที่เติม $CaCO_3$ 12

รูปที่ 5 แสดงความขุ่นของเซลล์ (cell density; OD600), Glucose, lactic acid และ pH และ pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างเลี้ยงเซลล์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารชนิด GY ที่ไม่เติม $CaCO_3$ 13

รูปที่ 6 แสดงลักษณะเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์ถูกย้อมด้วยการย้อมสีแบบแกรม 14

รูปที่ 7 แสดงกราฟการเจริญเติบโต, จำนวนสปอร์และ vegetative cell ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 และ SS48-5 ที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่มีปริมาณกลูโคส 10 g/L 16

รูปที่ 8 แสดงกราฟการเจริญเติบโต, จำนวนสปอร์และ vegetative cell ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 และ SS48-5 ที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่มีปริมาณกลูโคส 20 g/L 17

รูปที่ 9 แสดงกราฟการเจริญเติบโต, จำนวนสปอร์และ vegetative cell ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 ที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่มีปริมาณกลูโคส 40, 60 และ 80 g/L 19

รูปที่ 10 แสดงกราฟการเจริญเติบโต, จำนวนสปอร์และ vegetative cell ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 ที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่มีปริมาณ yeast extract 7.5, 3.0 และ 1.5 g/L 20

สารบัญรูป/ตาราง

	หน้า
รูปที่ 11 แสดงกราฟการเจริญเติบโต, จำนวนสปอร์และ vegetative cell ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 ที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่มีปริมาณ NH_4Cl 2.0 และ 6.0 g/L	21
ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ TL7-3, TL9-1 และ SS48-5	7
ตารางที่ 2 แสดงลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ TL7-3, TL9-1 และ SS48-5	8

การพัฒนากระบวนการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

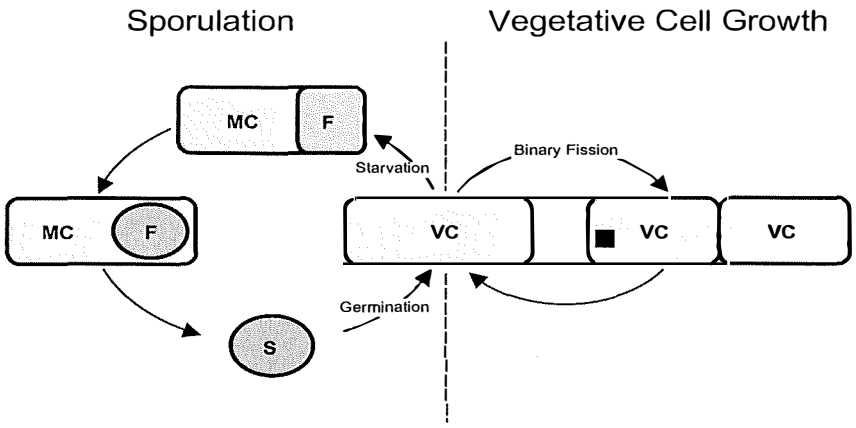
1. บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โพรไบโอติกเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งทางองค์การอนามัยโลก (FAO/WHO) ได้จัดให้โพรไบโอติกเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ต่อสุขอนามัยของมนุษย์และสัตว์รวมไปถึงการเจริญของพืช (Behnsen et al., 2013) ซึ่งโพรไบโอติกนั้นมีทั้งกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์เดี่ยวหรือสายพันธุ์ผสมโดยทำหน้าที่ในการช่วยปรับสมดุลให้กับจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่ในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ และเนื่องจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีคุณสมบัติในการปล่อยสาร bacteriocins ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในลำไส้ (Cotter et al., 2005) รวมไปถึงการผลิตกรดอะซิติกและกรดแลกติก (Servin, 2004) ดังนั้นจุลินทรีย์โพรไบโอติกจึงมีจุดเด่นในด้านของการเป็นสารเสริมปฏิชีวนะเพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงของลำไส้เพื่อลดอาการท้องผูกหรือท้องร่วงของทั้งมนุษย์และสัตว์ รวมไปถึงโพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของเอนไซม์หลากหลายชนิดที่มีผลดีต่อการย่อยสลายสสาร ได้แก่ อะไมเลส โปรติเอส ไคติเนส และไลเปส ดังนั้นจุลินทรีย์โพรไบโอติกจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรม การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการบำบัดน้ำเสีย (Ahmed et al., 2016) โดย โพรไบโอติกนั้นถูกแบ่งออกตามจีนัสและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus Bifidobacterium Escherichia Enterococcus Streptococcus* และ *Saccharomyces* (Sarao and Arora, 2017) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มโพรไบโอติกที่สร้างสปอร์ นั่นคือสายพันธุ์ *Bacillus* ซึ่งได้แก่ *Bacillus subtilis Bacillus cereus Bacillus coagulans* และ *Bacillus licheniformis* ซึ่งจุลินทรีย์โพรไบโอติกในกลุ่มที่สร้างสปอร์นั้นเป็นกลุ่มที่มีความสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความรุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มโพรไบโอติกที่ไม่สร้างสปอร์ เช่น ในสภาวะที่มีอุณภูมิสูงและที่พีเอชต่ำ (Cutting, 2011) จากข้อได้เปรียบในด้านการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่มีความรุนแรงกว่า ดังนั้นกลุ่มจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่สร้างสปอร์จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ เช่น เป็นสารเสริมชีวนะในอาหารสัตว์ เพื่อการคงอยู่ที่นานขึ้นในลำไส้ของสัตว์ รวมไปถึงการคงทนต่อการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ นอกจากนี้โพรไบโอติกที่สร้างสปอร์มีคุณสมบัติเป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต และในด้านอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ โพรไบโอติกที่สร้างสปอร์สามารถนำมาใช้เพื่อการกระตุ้นการเจริญและต้านโรคในกุ้งกุลาดำอีกด้วย (Cutting, 2011 และ Ahmed et al., 2016)

การผลิตสปอร์ของโพรไบโอติกนั้น เกิดขึ้นในสภาวะเครียดในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งได้แก่ สภาวะที่ขาดอาหารที่เหมาะสมในการเจริญ เพื่อเป็นการรักษาให้เซลล์นั้นอยู่รอด โดยกลไกของการผลิตสปอร์นั้นเริ่มจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนรูปจาก vegetative cell (VC) ไปเป็น

forespore (F) ที่อยู่ภายใต้ mother cell (MC) ของ sporangium ซึ่งใช้เวลาโดยเฉลี่ย 8 ชั่วโมง สปอร์ (S) จะถูกปล่อยออกมาสู่ภายนอกเซลล์ และเมื่อเซลล์ที่สร้างสปอร์ได้ถูกนำกลับไปสู่สภาวะที่เหมาะสม เซลล์ที่สร้างสปอร์จะกลับเข้าสู่ vegetative cell ดังเดิม (รูปที่ 1) (Cutting, 2011)



รูปที่ 1 วัฏจักรการสร้างสปอร์ของกลุ่มจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่สร้างสปอร์ (Cutting, 2011)

โดยได้มีงานวิจัยหลากหลายที่ได้ทำการศึกษาการผลิตโพรไบโอติกที่สร้างสปอร์ขึ้น ในปีค.ศ. 2010 Kosin และ Rakshit ได้ทำการคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะที่ทนต่ออุณหภูมิสูง ซึ่งได้แก่กลุ่ม Thermotolerant lactic acid bacteria และ *Bacillus sp.* นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกลุ่มโพรไบโอติกที่ผ่านการคัดแยก โดยพบว่า *Lactobacillus plantarum* ssp1 (ID1L) *Lactobacillus brevis* 860 มีอัตราการรอดชีวิตสูงจากการทำให้กลายพันธุ์ด้วยการทนต่ออุณหภูมิสูง และคัดแยก *Bacillus licheniformis* (ID3B) *Bacillus subtilis* (ID4B) ได้จากกุ้งขาวที่มีสุขภาพดีภายใต้อุณหภูมิสูง ซึ่งกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวได้ถูกทดสอบการทนต่ออุณหภูมิสูงภายใต้เครื่อง spray dryer พบว่าโพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์มีจำนวนเซลล์ลดลงหลังผ่านเครื่อง spray dryerและลดลงเป็น 4 เท่าหลังจากเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง (Kosin and Rakshit, 2010) นอกจากนี้ในปีค.ศ. 2012 Nørgaard และคณะได้ทำการศึกษาผลของโพรไบโอติกที่สร้างสปอร์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมกลุ่ม amino acid ในการเลี้ยงหมูพบว่า สปอร์ของ *B. subtilis* ยังไม่เพียงพอต่อการเสริมการขาด กรดอะมิโน Val ภายในหมู ซึ่งอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสปอร์ที่ไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป (Nørgaard et al., 2012) รวมไปถึงในปีค.ศ. 2016 Mandal และคณะ ได้ทำการคัดแยก *Bacillus subtilis* AMS6 จากนมถั่วเหลืองหมัก โดยเป็นโพรไบโอติกที่ทนต่อพีเอชต่ำและความเข้มข้นของเกลือสูง ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่า AMS6 เป็นโพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติที่ต้านเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ก่อโรคได้ในปริมาณที่สูง อีกทั้งมีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ อีกทั้งมีเอนไซม์ที่ย่อยเส้นใยเซลลูโลสได้อีกด้วย (Mandal et al., 2016)

จากกลุ่มงานวิจัยตัวอย่างดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาการผลิตโพรไบโอติกในกลุ่มที่สร้างสปอร์ในสภาวะที่เหมาะสมในต่างๆกัน รวมไปถึงการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ แต่ยังพบว่าโพรไบโอติกที่สร้างสปอร์ดังกล่าวยังคงพบปัญหาอัตราการรอดหลังจากการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง รวมไปถึงปริมาณในการสร้างสปอร์ไม่เพียงพอต่อการแสดงคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะพัฒนากระบวนการผลิตโพรไบโอติกที่สร้างสปอร์ *Bacillus sp.* ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ โดยทำการเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของโพรไบโอติกที่มีต่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำ และการนำมาเป็นสารเสริมปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ รวมไปถึงศึกษาการทำให้โพรไบโอติกสามารถคงอยู่ได้ในสภาวะที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ/หรือการนำจุลินทรีย์ไปแปรรูปเป็นจุลินทรีย์ผงหรือน้ำเพื่อการนำไปใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ และการนำไปใช้เป็นสารเสริมปฏิชีวนะในอาหารสัตว์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. พัฒนากระบวนการผลิตโพรไบโอติก *Bacillus sp.* 3 สายพันธุ์ เพื่อการทำให้โพรไบโอติกมีความคงทนและมีประสิทธิภาพต่อการนำไปใช้ปรับปรุงคุณภาพน้ำและเป็นสารเสริมปฏิชีวนะในอาหารสัตว์
2. ศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของโพรไบโอติก *Bacillus sp.* 3 สายพันธุ์ ที่มีต่อการนำไปใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำและเป็นสารเสริมปฏิชีวนะในอาหารสัตว์
3. ศึกษาประสิทธิภาพของการเป็นโพรไบโอติก *Bacillus sp.* 3 สายพันธุ์ ต่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำและการเป็นสารเสริมปฏิชีวะในอาหารสัตว์

1.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

1.3.1 ค้นคว้าข้อมูลจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ถูกคัดเลือกและคัดแยกมาจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย

1.3.2 การศึกษาคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกด้วยวิธีเบื้องต้น

1.3.4 ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อและสปอร์ในระดับขวดเขย่า

2. วิธีการศึกษา

2.1 เชื้อแบคทีเรีย

ผู้ทำวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้มอบเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ TL7-3, TL9-1 และ SS48-5 เพื่อใช้ศึกษาการสร้างสปอร์และอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเพื่อกระตุ้นให้เกิดสปอร์ใน ซึ่งเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ได้รับการยืนยันแล้วว่าเป็นเชื้อ *B. subtilis* โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rRNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

2.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

2.2.1 การใช้คาร์โบไฮเดรตของเชื้อ

เชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ จะถูกเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งมีส่วนประกอบของแหล่งคาร์บอนที่แต่งต่างกัน คือ L-arabinose, D-glucose, D-manitol, D-mannose, salicin, xylose, cellobiose, fructose, galactose, glucorate, lactose, maltase, malibiose, raffinose, rhamnose, ribose, sorbitol, sucrose และtrehalose โดยแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดมีความเข้มข้น 0.5% และมี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ที่ช่วยในการวิเคราะห์ผล ต่อมาจะนำไปเลี้ยงที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทุกวัน

2.2.2 การผลิตเอนไซม์ของเชื้อ

โคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 3 สายพันธุ์จะถูกเลี้ยงบนอาหารแข็งซึ่งประกอบด้วย soluble starch, skim milk, gelatin, cellulose และ Tween80 โดยจะถูกเลี้ยงที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นในอาหารแข็งที่ผสม soluble starch ถูกเติมด้วย Gram iodine เพื่อตรวจสอบเอนไซม์อะไมเลส ส่วนอาหารแข็งที่ผสม cellulose จะถูกเติมด้วย congo red เพื่อตรวจสอบเอนไซม์เซลลูเลส

2.2.3 ความสามารถในการทนต่อ กรด-เบส เกลือ และอุณหภูมิ

เชื้อจะถูกเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด TSB (15g/L pancreatic digestion of casein, 5g/L peptic digestion of soybean meal และ 5g/L NaCl) โดยทดสอบระดับความทนต่อกรด-เบส ที่ pH 4.0-9.0 ทดสอบระดับความทนเค็ม โดยใช้ NaCl ความเข้มข้นที่ 0-10% และทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ โดย

ใช้อุณหภูมิ 15-55°C เซลล์ของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์จะถูกเลี้ยงในอาหารดังกล่าว โดยการทดลองที่ทดสอบความทนต่อกรด-เบส และเกลือ จะถูกเลี้ยงที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนการทดลองที่มีการแปรอุณหภูมิในการเลี้ยง การจะเลี้ยงเซลล์ตามอุณหภูมิที่มีการแปรเอาไว้ข้างต้น

2.2.4 การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีชนิดอื่น

การศึกษาทางสรีรวิทยาที่มีการศึกษาเพื่อเติมเช่น การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง หลังจากที่มีการเลี้ยงในสภาพที่มีอากาศที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยจะมีการตรวจสอบลักษณะของโคโลนี รูปร่างของเซลล์หลังจากที่มีการย้อมสี และการสร้างสปอร์ นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบการไฮโดรไลซ์สารชนิด esculin arginine และ nitrate ของเชื้อด้วย (Tanasupawat et al., 1992)

2.3 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น

2.3.1 การเตรียมเชื้อ

เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์จะถูกเลี้ยงในหลอดที่บรรจุอาหารแข็งชนิด GYP และเลี้ยงที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อจะถูกผสมกับน้ำเกลือ (0.85%NaCl) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดสอบความทนต่อ pH และทดสอบความทนต่อน้ำดี เพื่อทดสอบความทนทานของเชื้อต่อน้ำดี ซึ่งมีอยู่ภายในลำไส้

2.3.2 ทดสอบความทนต่อ pH ต่ำและน้ำดี

เชื้อจะถูกเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด NB (Nutrient broth) โดยในการทดสอบความทนต่อ pH ต่ำนั้นจะทดสอบที่ pH 2 ซึ่งเป็น pH ในระดับเดียวกับในกระเพาะอาหาร ส่วนในการทดสอบความทนต่อ น้ำดี ซึ่งมีอยู่ภายในลำไส้ โดยในการทดลองนี้จะใช้ bile salt ที่ความเข้มข้น 0.1% (W/V) และ 0.5% (W/V) เพื่อจำลองสภาวะที่มีน้ำดีอยู่ หัวเชื้อที่ความเข้มข้นเท่ากัน จะถูกเติมลงในอาหารเพื่อทดสอบความทนทานในสภาพดังที่ได้กล่าวไปข้างต้น จากนั้นจะถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C และจะมีการเก็บตัวอย่างทุก 0, 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตัวอย่างที่เก็บได้จะถูกนำไปเจือจางโดยวิธี serial dilution และเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิด NA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมานับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในหน่วย CFU/mL จำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นจะบ่งบอกว่าเชื้อในแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการทดต่อ pH 2.0 และน้ำดีมากเพียงใด

2.4 การศึกษาหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์

เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์จะถูกเลี้ยงเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในหลอดที่บรรจุอาหารแข็งชนิด GYP (10g/L D-glucose monohydrate, 5g/L yeast extract, 5g/L peptone, 0.25g/L KH_2PO_4, 0.25g/L K_2HPO_4 และ 10g/L salt solution (ประกอบด้วย 40g/L $MgSO_4.7H_2O$, 2g/L $MnSO_4.7H_2O$, 2g/L $FeSO_4.7H_2O$, 2g/L NaCl), adjust pH 6.8) เชื้อจะถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกถ่ายลงในฟลาส์ โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อคือ 1% ซึ่งในการศึกษาหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมนี้ ได้ทดลองใช้อาหาร 3 ชนิด คือ NB (Nutrient broth), GY (ที่มี $CaCO_3$) และ GY (ที่ไม่มี $CaCO_3$) โดยสูตรอาหาร GY ประกอบด้วย (10g/L D-glucose monohydrate, 15g/L Yeast extract, 4g/L NH_4Cl, 0.25g/L KH_2PO_4, 0.25g/L

K_2HPO_4, 5g/L $CaCO_3$ และ 10g/L salt solution (ประกอบด้วย 40g/L $MgSO_4.7H_2O$, 2g/L $MnSO_4.7H_2O$, 2g/L $FeSO_4.7H_2O$, 2g/L NaCl) เมื่อถ่ายเชื้อลงในหาหารทั้ง 3 ชนิดแล้ว จะมีการเก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงของการเลี้ยง ตัวอย่างที่เก็บมาจะวัดความหนาแน่นของเซลล์ (cell density; OD600) ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลกลูโคส และมีการตรวจสอบรูปร่างของเซลล์โดยการย้อมสีแบบแกรม

2.5 การศึกษาหาความเข้มข้นของส่วนประกอบของอาหาร GY (Glucose-yeast extract) ที่ช่วยส่งเสริมการสร้างสปอร์

2.5.1 การเลี้ยงเซลล์

เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารวุ้นเอียง GYP ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะเติม 0.85% NaCl ปริมาตร 1ml ในหลอดและผสมเข้ากับเชื้อที่เลี้ยงไว้เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ หัวเชื้อจะถูกวัดความเข้มข้น (Optical density) ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยวัดที่ 600 nm ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้ ได้กำหนดให้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ มีความเข้มข้นของเซลล์อยู่ที่ 25 เมื่อได้หัวเชื้อที่มีความเข้มข้นดังกล่าวแล้ว จะใช้หัวเชื้อปริมาตร 1% เลี้ยงในอาหารเหลวชนิด GY ปริมาตร 50 mL โดยอาหาร GY จะมีการแปรความเข้มข้นของ glucose, yeast extract และ NH_4Cl ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสปอร์ของ *B. subtilis* เชื้อถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm จากนั้นจามีการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดปริมาณ glucose และ lactic acid โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง glucose-lactate analyzer (YSI) ซึ่งจะมีการนับจำนวนของ vegetative cell และ spore โดยวิธี plate count นอกจากนี้จะมีการศึกษารูปร่างของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้วิธีการย้อมสีแบบแกรม

2.5.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตัวอย่างเซลล์จะถูกผสมกับ 1%HCl จากนั้นจะปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 rpm เป็นเวลา 5 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยง ส่วนใสจะถูกแยกออกมาเพื่อวัดปริมาณ glucose และ lactic acid ส่วนที่เป็น pellet จะถูกผสมกับ 1%HCl อีกครั้งเพื่อวัดความเข้มข้นของเซลล์ (OD600) นอกจากนี้จะมีการนับจำนวนของ vegetative cell และ spore โดยวิธี plate count สำหรับการนับจำนวน spore ตัวอย่างเซลล์ที่เก็บมาได้จะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัด vegetative cell ออกไป ก่อนที่จะมีการเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิด NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะมีการนับจำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้น จะเป็นจำนวน spore โดยนับในหน่วยของ CFU/mL

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

จากการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เชื้อสายพันธุ์ TL7-3 สามารถใช้คือ fructose, glucose และ sucrose เชื้อสายพันธุ์ TL9-1 แหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ได้คือ fructose, glucose, manital และ trehalose ส่วนเชื้อสายพันธุ์ SS48-3 แหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ได้คือ fructose, glucose และ sucrose จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า เอนไซม์ที่เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถสร้างได้คือเอนไซม์อะไมเลส ในการทดสอบความทนกรด-เบส พบว่า เชื้อสายพันธุ์ TL7-3 และเชื้อสายพันธุ์ TL9-1 สามารถเจริญได้ใน pH 5.0-9.0 ส่วนเชื้อสายพันธุ์ SS48-5 สามารถเจริญได้ใน pH 5.5-9.0 ส่วนอุณหภูมิที่เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สามารเจริญได้อยู่ระหว่าง 15-55 °C นอกจากนี้ยังมีการทดสอบความทนต่อเกลือ พบว่า เชื้อสายพันธุ์ TL7-3 และ SS48-5 สามารถเจริญได้ในเกลือที่ความเข้มข้น 0-7% (W/V) ส่วนเชื้อ TL9-1 สามารถเจริญได้ในช่วงความเข้มข้นของเกลือที่น้อยกว่าคือระหว่าง 0-6% (W/V) แต่เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ สามารถเติบโตได้ทั้งในสถาพที่มีอากาศและไร้อากาศ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ TL7-3, TL9-1 และ SS48-5

ลักษณะที่ทดสอบ	สายพันธุ์		
	TL7-3	TL9-1	TL7-3
Cell shape	rod	rod	rod
Colony pigment	white	white	white
Spore	+	+	+
Nitrate	-	-	-
Arginine	+	+	+
Urea	+	+	+
Citrate utilization	-	-	-
Esculin	-	-	-
Indole	-	-	-
MR	-	-	-
VP	-	-	-

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ TL7-3, TL9-1 และ SS48-5

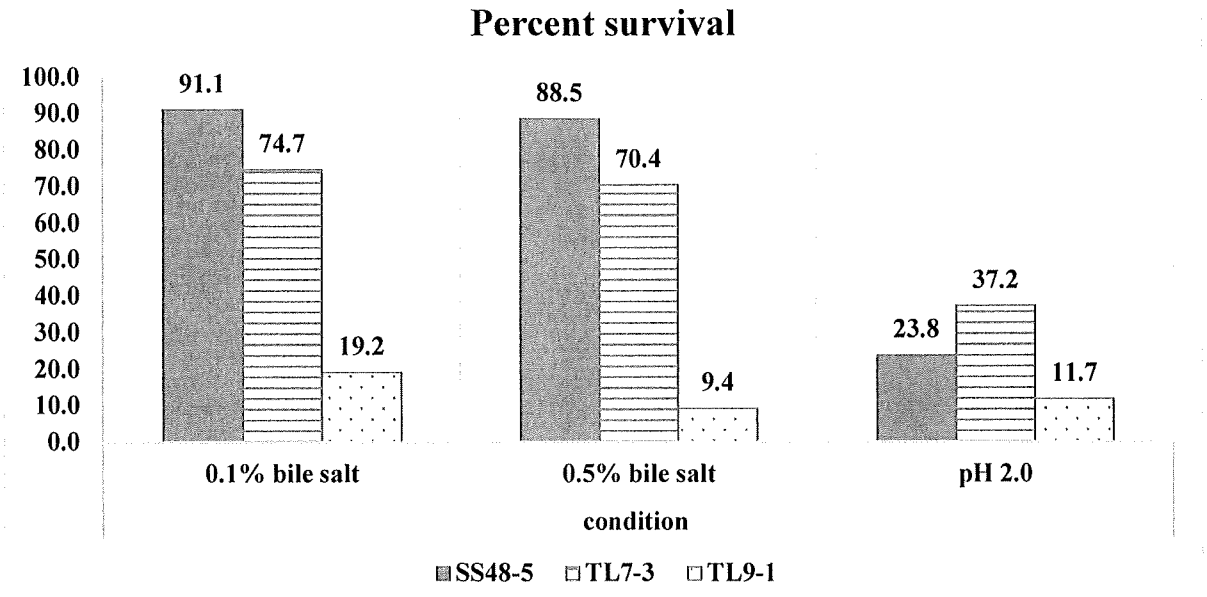
ลักษณะที่ทดสอบ	สายพันธุ์		
	TL7-3	TL9-1	SS48-5
Enzyme			
Lypase	-	-	-
Amylase	+	+	+
Gellatinase	-	-	-
Protease	-	-	-
Cellulase	-	-	-
Assimilation of carbon sources			
Arabinose	-	-	-
Cellulose	-	-	-
Fructose	+	+	+
Galactose	-	-	-
Glucose	+	+	+
Lactose	-	-	-
Mannose	-	-	-
Manital	-	+	-
Melibiose	-	-	-
Raffinose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Salicin	-	-	-
Sarbital	-	-	-
Sucrose	+	-	+
Trehalose	-	+	-
Xylose	-	-	-

ลักษณะที่ทดสอบ	สายพันธุ์		
	TL7-3	TL9-1	SS48-5
pH			
4.5	-	-	-
5.0	+	+	-
5.5	+	+	+
6.0	+	+	+
6.5	+	+	+
7.5	+	+	+
8.0	+	+	+
Growth with NaCl			
0% (w/v) NaCl	+	+	+
3% (w/v) NaCl	+	+	+
5% (w/v) NaCl	+	+	+
7% (w/v) NaCl	+	-	+
9% (w/v) NaCl	-	-	-
10% (w/v) NaCl	-	-	-
Growth at			
15 °C	+	+	+
45 °C	+	+	+
55 °C	+	+	+
Oxygen requirement			
Aerobic	+	+	+
Anaerobic	+	+	+

3.2 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น

ในการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นนี้ ได้ทดสอบคุณสมบัติในการทนต่อ pH ต่ำ ซึ่งจะใช้ pH 2.0 ซึ่งเป็นการจำลองสภาพความเป็นกรดภายในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ยังได้ทดสอบคุณสมบัติในการทนต่อน้ำดี ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ bile salt เพื่อจำลองสภาพให้ให้คล้ายกับในลำไส้ที่จะประกอบด้วยน้ำดี โดยในการทดลองจะใช้ bile salt ที่ความเข้มข้น 2 ระดับคือ 0.1% (W/V) และ 0.5% (W/V) จากการทดลองจะมีการเก็บตัวอย่างของเชื้อที่มีการเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวทุก 0, 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งเพื่อคำนวณหาเปอร์เซนต์ของเซลล์ที่มีสามารถรอดชีวิตเมื่ออยู่ภายใต้

สภาพดังกล่าว จากการทดลองพบว่า เชื้อสายพันธุ์ TL9-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนต่อ pH 2.0 และ ทนต่อ bile salt ได้น้อยที่สุด โดยเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง เชื้อ TL9-1 ที่อยู่ในอาหาร pH 2.0 มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต คือ 11.7% และเชื้อ TL9-1 ที่อยู่ในอาหารที่มี bile salt ความเข้มข้น 0.1% (W/V) และ 0.5% (W/V) มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต คือ 19.2% และ 9.4% ตามลำดับ เชื้อสายพันธุ์ TL7-3 อยู่ในอาหาร pH 2.0 มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต คือ 37.2% และที่อยู่ในอาหารที่มี bile salt ความเข้มข้น 0.1% (W/V) และ 0.5% (W/V) มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต คือ 74.7% และ 70.4% ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์ SS48-5 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนต่อ bile salt ได้ดีที่สุด โดยเชื้อ SS48-5 เมื่ออยู่ในอาหาร pH 2.0 มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต คือ 23.8% และที่อยู่ในอาหารที่มี bile salt ความเข้มข้น 0.1% (W/V) และ 0.5% (W/V) มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต คือ 91.1% และ 88.5% ตามลำดับ (รูปที่ 1)

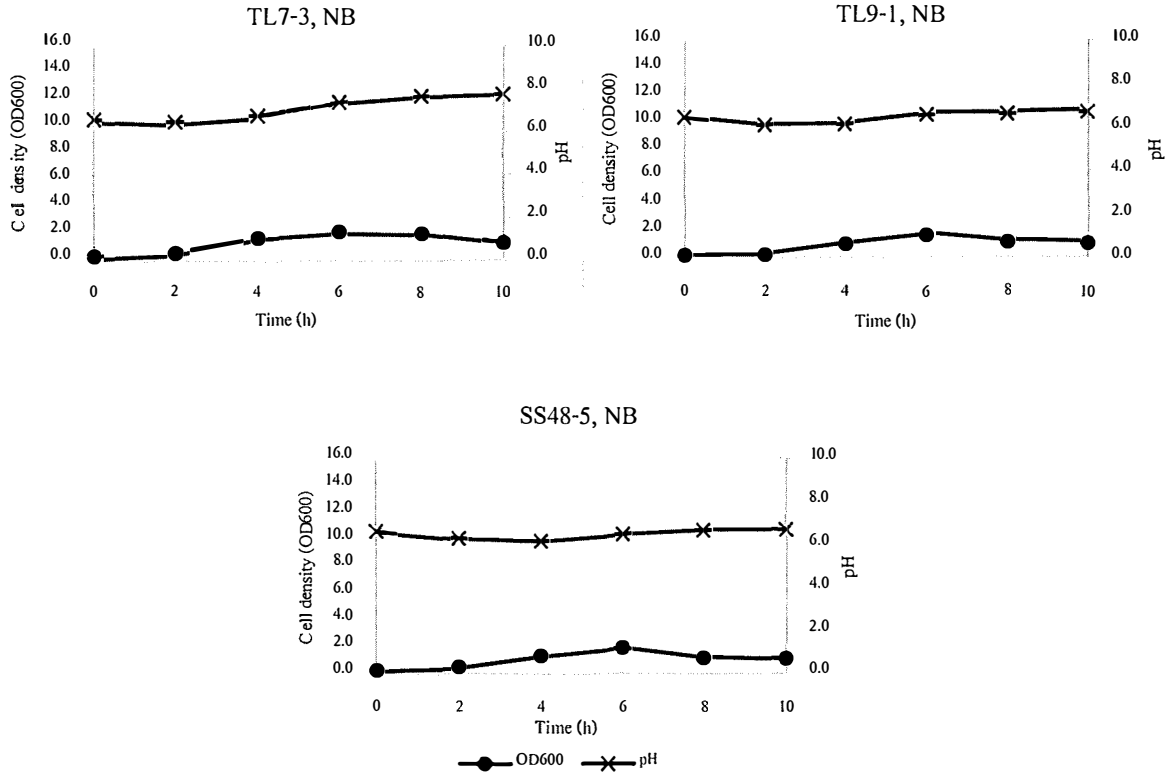


รูปที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่ออยู่ในอาหารที่ pH ต่ำ และผสมด้วย bile salt

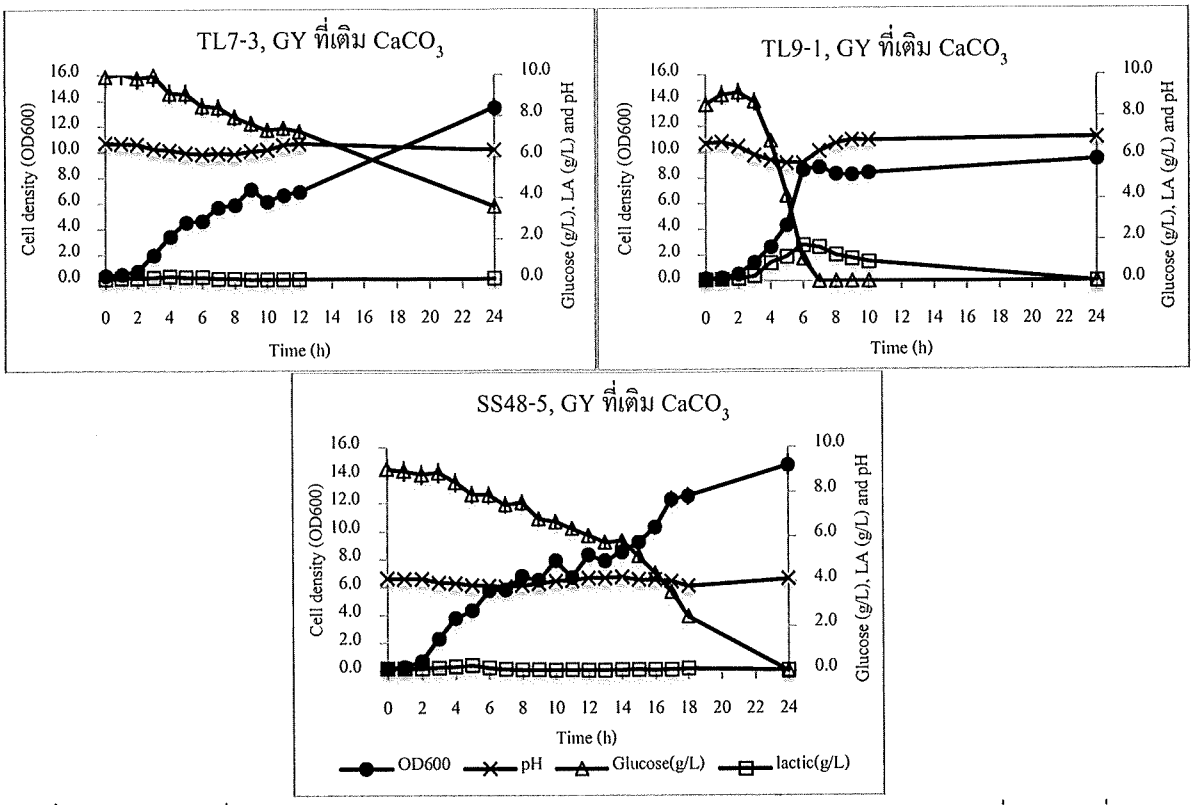
3.3 การศึกษาหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์

เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์จะถูกเลี้ยงในอาหารคือ NB, GY (ที่เติม $CaCO_3$) และ GY (ที่ไม่เติม $CaCO_3$) เพื่อวัดความสามารถในการสร้างสปอร์ของเชื้อและหาอาหารที่เหมาะสมที่จะส่งเสริมในหารเจริญและการสร้างสปอร์ จากการทดลองพบว่า เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารชนิด NB จะมีการเจริญที่น้อยมากเมื่อเทียบกับอาหารชนิด GY ที่เมื่อวัดความหนาแน่นของเซลล์ (OD600) เชื้อที่เลี้ยงในอาหารชนิด NB จะมีความหนาแน่นน้อยกว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารชนิด GY มาก โดยเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารชนิด NB จะมีความหนาแน่นสูงที่สุดเพียง 2 เท่านั้น แต่หากเลี้ยงในอาหารชนิด GY เชื้อจะสามารถโตจนมีความหนาแน่นได้ถึง 12

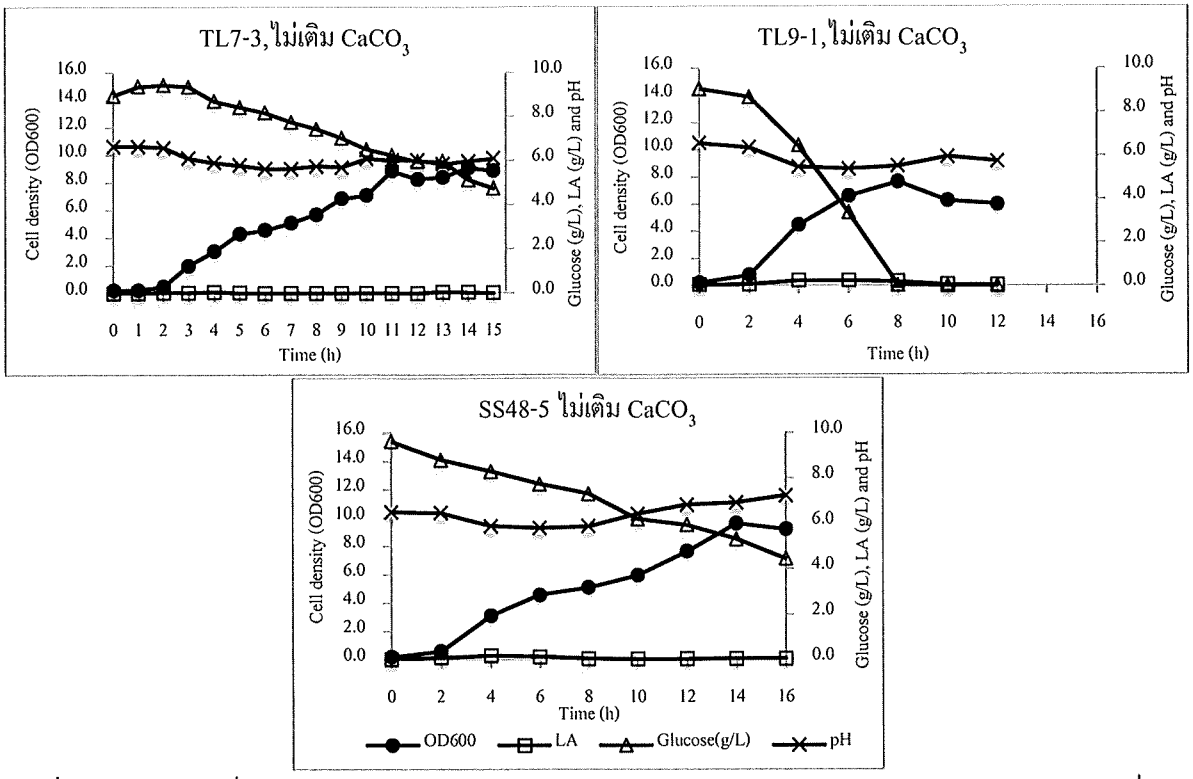
เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารชนิด GY ที่เติม $CaCO_3$ และไม่เติม $CaCO_3$ พบว่า เชื้อที่เลี้ยงในอาหารชนิด GY ที่เติม $CaCO_3$ จะมีความเข้มข้นของเซลล์ที่มากกว่าอาหาร GY ที่ไม่เติม $CaCO_3$ โดยพบว่าเซลล์ในอาหาร GY ที่เติม $CaCO_3$ จะสามารถโตได้จนมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดได้ถึง 12 แต่เซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่ไม่เติม $CaCO_3$ จะมีความหนาแน่นสูงที่สุดเพียงประมาณ 9 เท่านั้น นอกจากนี้เมื่อนำเซลล์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาตรวจสอบลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้วิธีการย้อมสีแบบแกรม พบว่าเชื้อทั้งสามชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหาร GY ที่ไม่เติม $CaCO_3$ เซลล์นั้นจะยังคงเป็น vegetative cell อยู่ แต่เชื้อที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่เติม $CaCO_3$ จะพบว่าเซลล์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ จะมีการเปลี่ยนแปลง โดยจะสังเกตเห็น spore กระจายอยู่ภายใต้กล้อง ดังนั้นอาหารที่เหมาะสมที่จะนำมาเลี้ยง *B. subtilis* ซึ่งสามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์และการเกิดสปอร์ได้คือ อาหาร GY ที่เติม $CaCO_3$



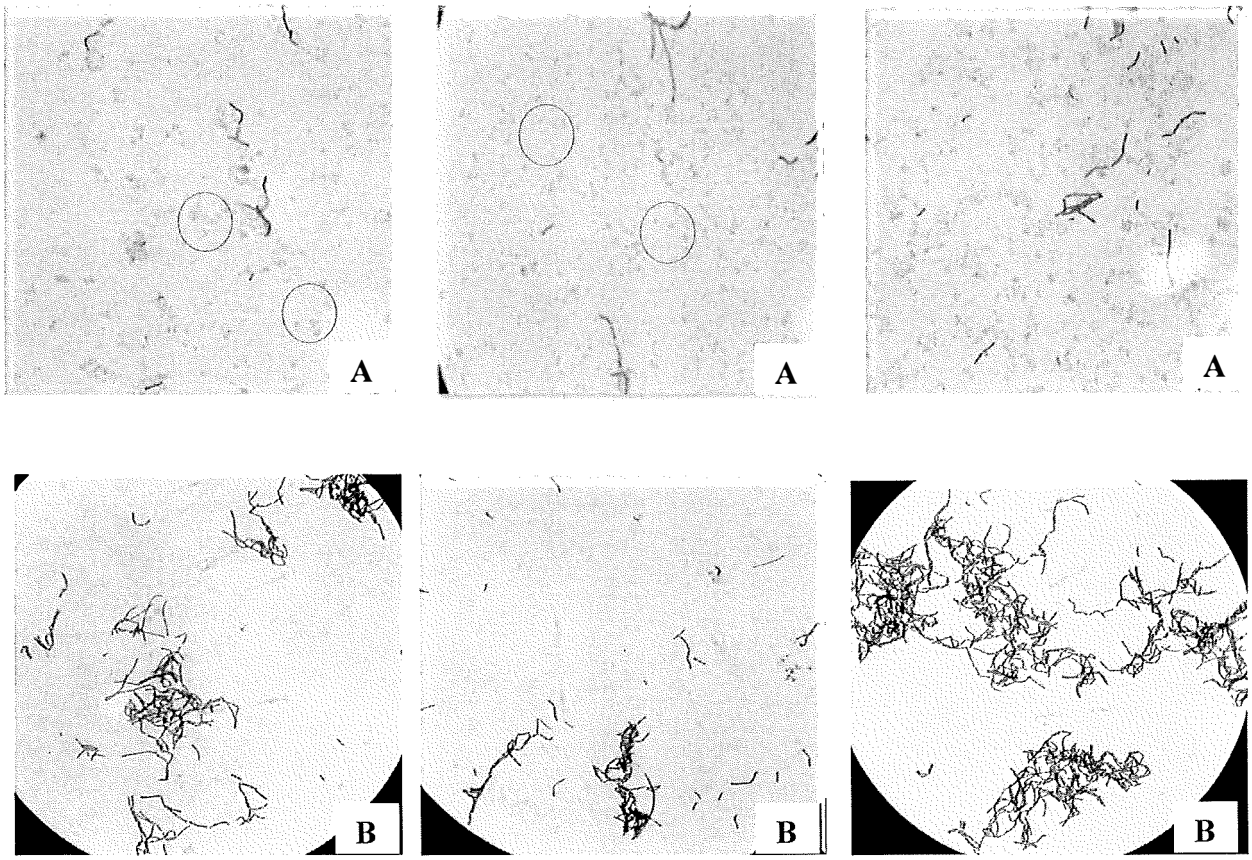
รูปที่ 3 แสดงความขุ่นของเซลล์ (cell density; OD600) และ pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างเลี้ยงเซลล์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารชนิด NB



รูปที่ 4 แสดงความขุ่นของเซลล์ (cell density; OD600), Glucose, lactic acid และ pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างเลี้ยงเซลล์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารชนิด GY ที่เติม $CaCO_3$



รูปที่ 5 แสดงความขุ่นของเซลล์ (cell density; OD600), Glucose, lactic acid และ pH และ pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างเลี้ยงเซลล์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารชนิด GY ที่ไม่เติม $CaCO_3$



รูปที่ 6 แสดงลักษณะเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์ถูกย้อมด้วยการย้อมสีแบบแกรม

A: เชื้อสายพันธุ์ TL7-3 ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร GY ที่เติม $CaCO_3$

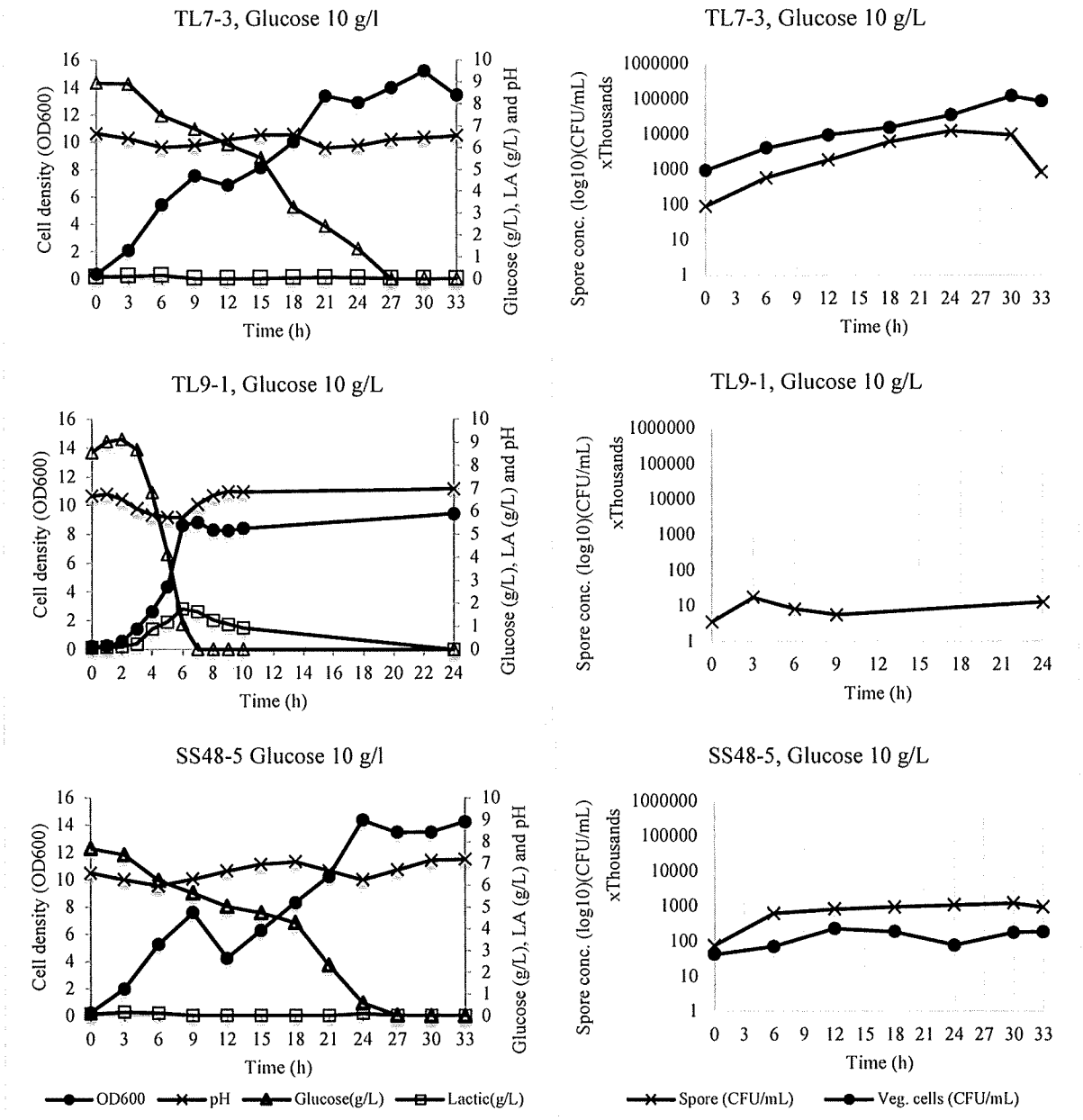
B: เชื้อสายพันธุ์ TL7-3 ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร GY ที่ไม่เติม $CaCO_3$

3.4 **การศึกษาความสามารถในการสร้างสปอร์ของเชื้อ 3 สายพันธุ์**

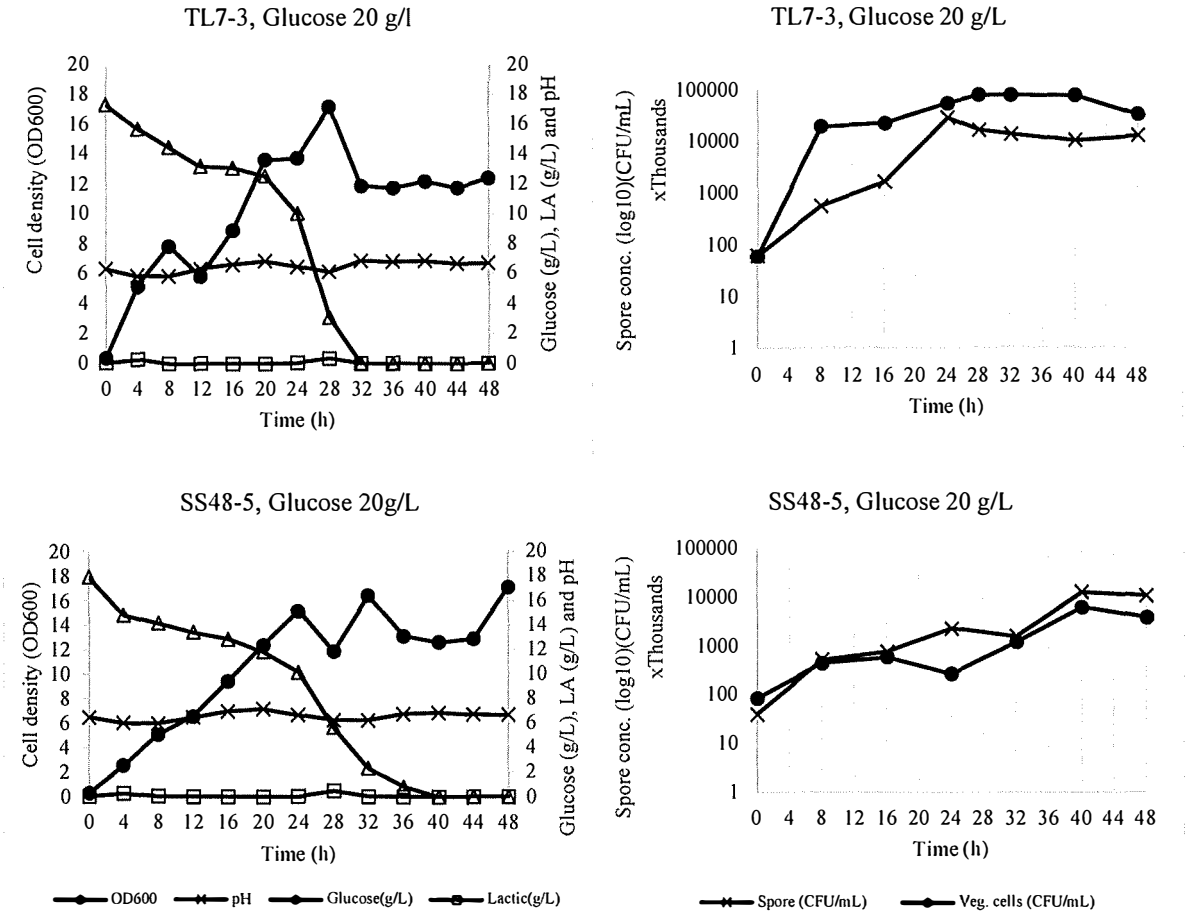
หลังจากที่ได้ศึกษาอาหารที่มีความเหมาะสมที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อส่งเสริมการเจริญและการสร้างสปอร์ ซึ่งคืออาหาร GY ในการทดลองในส่วนนี้ จะเป็นการทดสอบความสามาถในการสร้างสปอร์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยเชื้อจะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด GY และหาจำนวนของ vegetative cell และสปอร์ ที่เชื้อสามารถสร้างขึ้นได้ด้วยวิธี plate count โดยในการหาจำนวนสปอร์ จะนำเซลล์ที่เลี้ยงได้ไปบ่มที่ 80°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัด vegetative cell โดยเมื่อคำนวณออกมาแล้ว จำนวนเซลล์จะมีหน่วยเป็น CFU/mL จากการทดลองเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหาร GY ที่ประกอบด้วยกลูโคส 10 g/L พบว่า เชื้อสายพันธุ์ TL9-1 มีความสามารถในการสร้างสปอร์ได้น้อยที่สุด โดยสามารถสร้างสปอร์ได้จำนวนสูงสุดเพียง 1.7×10^3 CFU/mL ส่วนเชื้อที่สามารถสร้างสปอร์ได้สูงที่สุดคือเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 ที่สร้างสปอร์ได้ 1.195×10^7 CFU/mL (ที่เวลา 24 ชั่วโมง) เชื้อที่สร้างสปอร์ได้รองลงมาคือเชื้อสายพันธุ์ SS48-5 ซึ่งสามารถสร้างสปอร์ได้

จำนวน $1.06x10^6$ CFU/mL (ที่เวลา 24 ชั่วโมง) (รูปที่ 5) จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่า เชื้อที่มีความสามารถที่ดีในการสร้างสปอร์ คือ TL7-3 และ SS48-5 ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ 2 สายพันธุ์นี้มาศึกษาการสร้างสปอร์ต่อไป

เชื้อสายพันธุ์ TL7-3 และ SS48-5 ถูกนำมาเลี้ยงในอาหาร GY โดยทดลองเพิ่มความเข้มของกลูโคสในอาหารเป็น 20 g/L พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถสร้างสปอร์ได้เพิ่มมากขึ้น โดยเชื้อสายพันธุ์ SS48-5 สามารถสร้างสปอร์ได้ $6.10x10^6$ CFU/mL (ที่เวลา 40 ชั่วโมง) ส่วนเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสปอร์ได้สูงที่สุด โดยสามารถสร้างสปอร์ได้ $2.715x10^7$ (ที่เวลา 24 ชั่วโมง) (รูปที่ 6) จะเห็นได้ว่าเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 สามารถสร้างสปอร์ได้สูงที่สุดโดยใช้ระยะเวลาในการสร้างสปอร์น้อยที่สุดคือ 24 ชั่วโมง ดังนั้น เชื้อสายพันธุ์ TL7-3 จึงเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่จะถูกเลือกใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งจะมีการแปรส่วนประกอบของอาหาร GY



รูปที่ 7 แสดงกราฟการเจริญเติบโต, จำนวนสปอร์และ vegetative cell ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 และ SS48-5 ที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่มีปริมาณกลูโคส 10 g/L



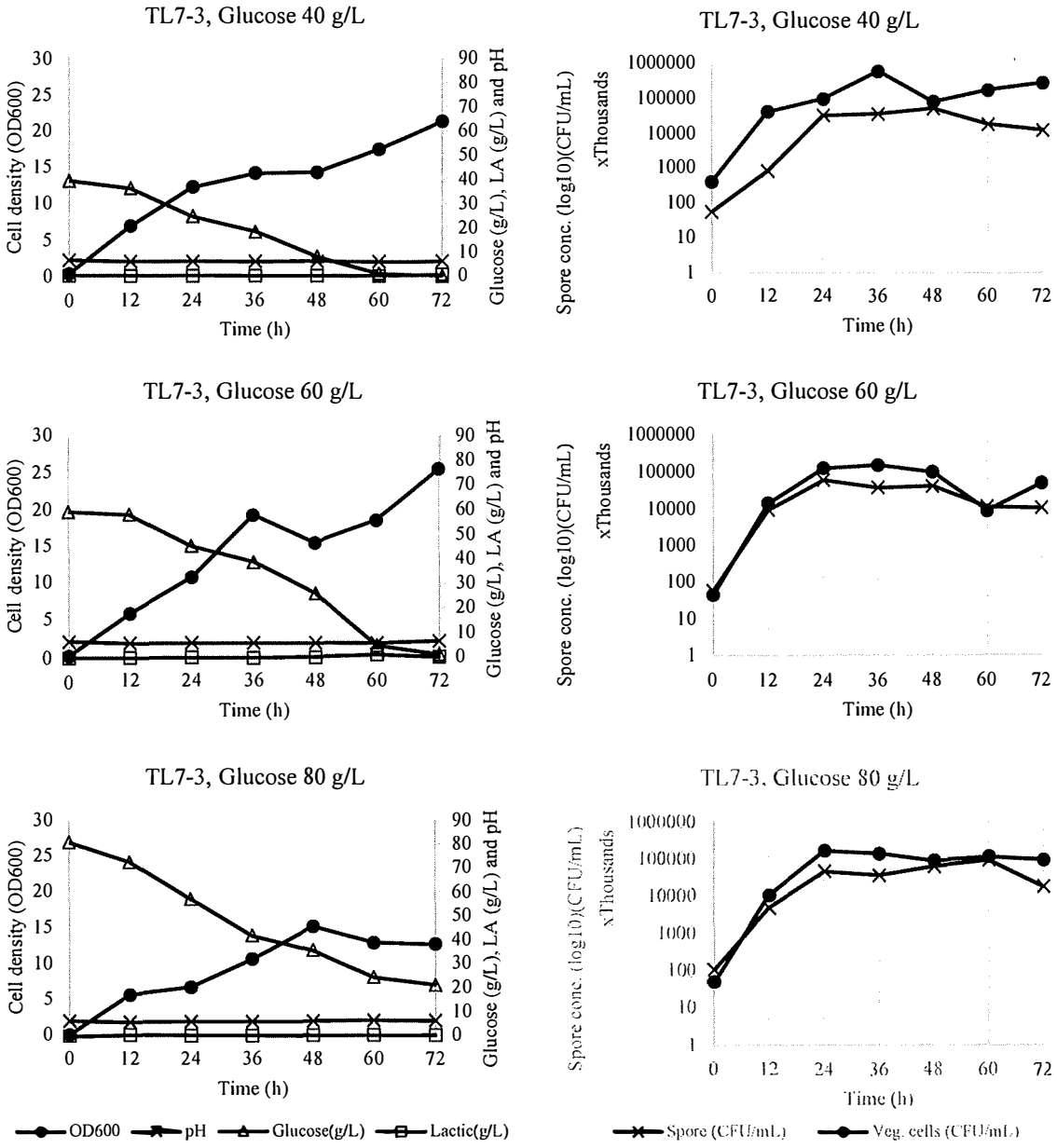
รูปที่ 8 แสดงกราฟการเจริญเติบโต, จำนวนสปอร์และ vegetative cell ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 และ SS48-5 ที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่มีปริมาณกลูโคส 20 g/L

3.5 การศึกษาความเข้มข้นของส่วนประกอบของอาหาร GY (Glucose-Yeast extract) ที่ช่วยส่งเสริมการสร้างสปอร์

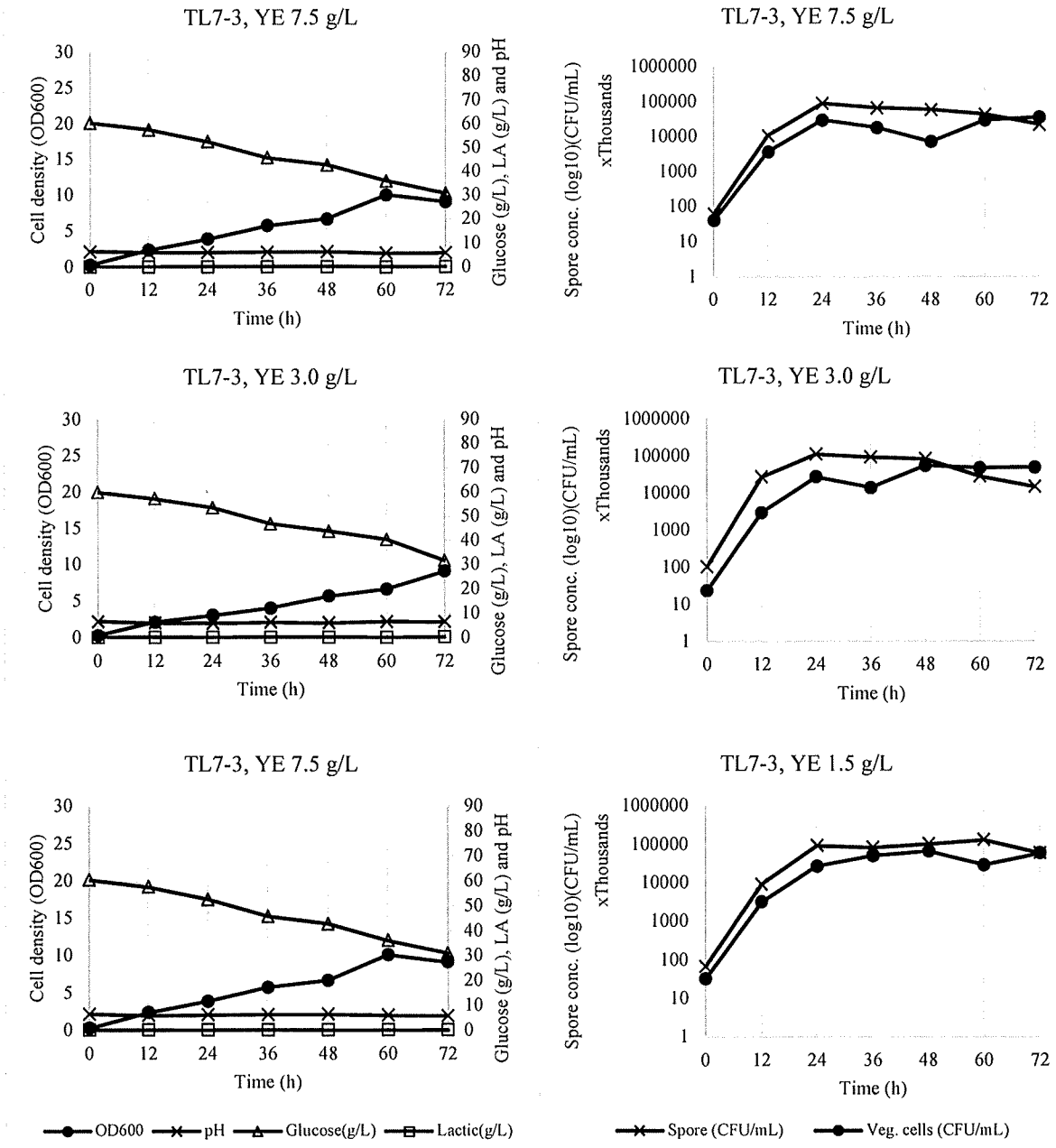
ส่วนประกอบของอาหาร GY ที่สำคัญต่อการสร้างสปอร์ ซึ่งคือ กลูโคส yeast extract และ NH_4Cl จะถูกแปรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นในส่วนประกอบอาหาร GY ต่อการสร้างสปอร์ โดยในเริ่มแรกจะมีการแปรความเข้มข้นของกลูโคสก่อน ที่ระดับความเข้มข้นคือ 40, 60 และ 80 g/L และคงที่ค่าความเข้มข้นของสารชนิดอื่นเอาไว้ จากการทดลองพบว่า ในชั่วโมงที่ 24 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 40 g/L เชื้อจะสามารถสร้างสร้างสปอร์ได้ $3.25x10^7$ CFU/mL ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 60 g/L เชื้อจะสามารถสร้างสปอร์ได้ $5.40x10^7$ CFU/mL ส่วนในความเข้มข้นของกลูโคส 80 g/L เชื้อจะสามารถสร้างสปอร์ได้ $4.25x10^7$ CFU/mL (รูปที่ 7) จะเห็นได้ว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงความเข้มข้นของกลูโคสที่เชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้สูงที่สุดคือ 60 g/L จึงเลือกความเข้มข้นของกลูโคสที่ 60 g/L เพื่อทำการทดลองต่อไป ซึ่งจะมีการแปรความเข้มข้นของ yeast extract และให้ความเข้มข้นของกลูโคสคงที่ไว้ที่ 60 g/L

หลังจากนั้นเซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหาร GY ที่แปรความเข้มข้นของ yeast extract (YE) โดยลดความเข้มข้นของ yeast extract ลงจาก 15 g/L เป็น 7.5, 3.0 และ 1.5 g/L จากการทดลองพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมงเมื่อใช้ yeast extract ความเข้มข้น 7.5 g/L เชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้ $8.60x10^7$ CFU/mL เมื่อใช้ yeast extract ความเข้มข้น 3.0 g/L เชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้ $1.065x10^8$ CFU/mL และเมื่อลดความเข้มข้นของสปอร์เป็น 1.5 g/L เชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้ $8.85x10^7$ CFU/mL (รูปที่ 8) จากการทดลองจะเห็นได้ว่า yeast extract ที่ระดับความเข้มข้น 3 g/L เป็นระดับความเข้มข้นที่ทำให้เชื้อสร้างสปอร์ได้สูงสุด จึงเลือกความเข้มข้นนี้ทำการทดลองต่อไป ซึ่งจะมีการแปรความเข้มข้นของ NH_4Cl และให้ความเข้มข้นของกลูโคส และ yeast extract คงที่ไว้ที่ 60 g/L และ 3 g/L ตามลำดับ

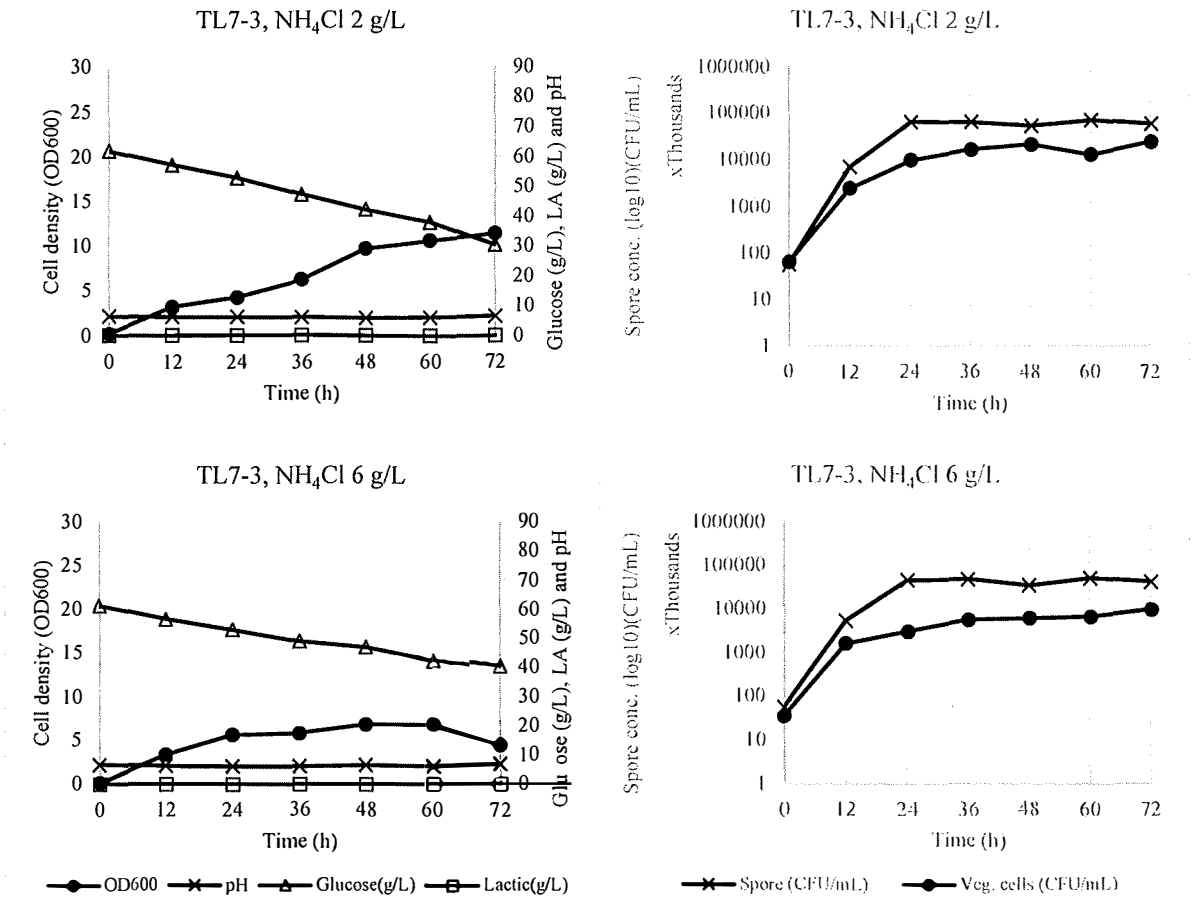
ความเข้มข้นของ NH_4Cl ในอาหาร GY ปกติที่ใช้ในการทดลองนี้ มีความเข้มข้นคือ 4 g/L แต่ในการทดลองเพื่อแปรความเข้มข้นของ NH_4Cl จะทดลองแปรความเข้มข้นของ NH_4Cl ในระดับความเข้มข้นที่ทั้งลดลงและเพิ่มขึ้น คือ 2 g/L และ 6 g/L ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า การทดลองเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของ NH_4Cl ไม่ทำให้จำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้น โดยในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของ NH_4Cl คือ 2 g/L เชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้ $6.20x10^7$ CFU/mL และเมื่อใช้ความเข้มข้นของ NH_4Cl คือ 6 g/L เชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้ $4.45x10^7$ CFU/mL ดังนั้นระดับความเข้มข้นของ NH_4Cl ที่เหมาะสมคือ 4 g/L



รูปที่ 9 แสดงกราฟการเจริญเติบโต, จำนวนสปอร์และ vegetative cell ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 ที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่มีปริมาณกลูโคส 40, 60 และ 80 g/L



รูปที่ 10 แสดงกราฟการเจริญเติบโต, จำนวนสปอร์และ vegetative cell ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 ที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่มีปริมาณ yeast extract 7.5, 3.0 และ 1.5 g/L



รูปที่ 11 แสดงกราฟการเจริญเติบโต, จำนวนสปอร์และ vegetative cell ของเชื้อสายพันธุ์ TL7-3 ที่เลี้ยงในอาหาร GY ที่มีปริมาณ NH_4Cl 2.0 และ 6.0 g/L

4. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ TL9-1 TL7-3 และ SS48-5 ที่ได้จากการคัดเลือกและคัดแยกจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทยนั้น พบว่า *B. subtilis* TL7-3 ถูกนำมาศึกษาต่อถึงความเป็นไปได้ของคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก เนื่องจากในการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อการบำบัดน้ำเสีย จำเป็นจะต้องใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสปอร์ เพื่อเสริมสร้างประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงหรือต้านทานต่อความเป็นกรดและด่าง ซึ่งสายพันธุ์ TL7-3 นี้ให้ผลผลิตสปอร์สูงในสภาวะที่มีการลดอัตราของแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตามในการศึกษาการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดน้ำเสียนั้นจำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพื่อทำการแปรสภาวะในการปรับปรุงคุณสมบัติของสปอร์เพิ่มเติม เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการนำไปใช้งาน

เอกสารอ้างอิง

Ahmed, Z., Haque, M, MD., Sayeed, N., Uddin, M. E., and Akter, T. 2016. Reviewson probiotics – it's usesand applications. World Journal Phamaceutical Research. 5: 24-34.

Behnsen, J.,Deriu, E.,Sassone-Corsi, M., and Raffatellu, M. 2013. Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. White Paper [internet]. [cited 2017 Jan 30]. Avaliable from: https:// www.perspectivesinmedicine.org.

Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology. 3: 777–788.

Cutting, S. M. 2011. *Bacillus* probiotics. Food Microbiology. 28: 214 – 220.

Kosin, B. and Rakshit, S. K. 2010. Induction of heat tolerance in autochthonous and allochthonousthermotolerantprobiotics for application to white shrimp feed. Aquaculture. 306: 302 – 309.

Manhar, A. K., Bashir, Y., Saikia, D., Nath, E., Gupta, D. K., Konwar, B. K., Kumar, R., Namsa, N. D., and Mandal, M. 2016. Cellulolytic potential of probiotic *Bacillus subtilis* AMS6 isolated from traditional fermented soybean (Churpi): An in-vitro study with regards to application as an animal feed additive. Microbiological Research. 186 – 187: 62 – 70.

Nørgaard, J. V., Canibe, N., Nielsen, B., Carlson, D., Knap, I., Cantor, M. D., and Poulsen, H. D. 2012. First studies on a new concept for amino acid provision through *B. subtilis* in situ valine production in young pigs. Livestock Science. 147: 33 – 39.

Sarao, L. K.andArora, M. 2017. Probiotics, prebiotics, and microencapsolution: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 57: 344 – 371.

Servin, A. L. 2004. Antagonistic activities of *lactobacilli* and *bifidobacteria* against microbial pathogens. FEMS Microbiology Reviews. 28: 405–440.

Tanasupawat, S., Ezaki, T., Suzuki, K.I., Okada, S., Komagata, K., and Kozaki, M. Characterization and identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods in Thailand. The Journal of General and Applied Microbiology. 1992; 38(2): 121-134.