การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis* เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์

ไวรุจน์ เดชมหิทกุล[1] จันทร์จีรา อยู่คง[2] กนกวรรณ พุ่มพุทรา[3] แสงชัย เอกประทุมชัย[4] และ เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง[5]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารสัตว์มีแนวโน้มสูงขึ้นเนื่องจากช่วยทำให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรง ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตดี และ ช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะ *Bacillus subtillis* (BS) เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ผลิต เนื่องจากเจริญรวดเร็ว และ มีการสร้างสปอร์ ทำให้ง่ายต่อการผลิตเชิงการค้า การศึกษานี้เป็นการพัฒนาสูตรอาหาร และสภาวะการหมักที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นของสปอร์สูง รวมทั้งตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด

การทดลองทำในสูตรอาหารสองแบบในขวดเขย่า คือ แบบที่มีกากน้ำตาลเป็นหลัก และ แบบที่มีกากถั่วเหลืองเป็นหลัก ผลการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นหลักสูตรที่เหมาะสมคือ กากน้ำตาล 19.85 กรัม/ลิตร (คิดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.35 กรัม/ลิตร และ $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.15 กรัม/ลิตร ได้ความเข้มข้นสปอร์ 5.5×10^9 CFU/มล. สูตรที่มีถั่วเหลืองเป็นหลักที่เหมาะสม คือกากถั่วเหลือง 20 กรัม/ลิตร กากน้ำตาล 3 กรัม/ลิตร และ K_2HPO_4 0.5 กรัม/ลิตร ได้ความเข้มข้นสปอร์ 1.3×10^9 CFU/มล. เนื่องจากอาหารสูตรที่มีกากน้ำตาลเป็นหลักทำให้เกิดฟองมากซึ่งเกิดปัญหายุ่งยากในการเพาะเลี้ยงในถังหมัก ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหารที่มีกากถั่วเหลืองเป็นหลักเพื่อใช้ทดลองเมื่อใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร ความเข้มข้นของสปอร์เมื่อเวลา 48 ชั่วโมงคือ 1.78×10^9 และ 4.03×10^8 CFU/มล. สำหรับการเลี้ยงแบบกะและกึ่งกะตามลำดับ การเติมกากน้ำตาลในระหว่างเพาะเลี้ยงมีผลต่อเพิ่มการเจริญของเซลล์ แต่ขัดขวางการสร้างสปอร์ ดังนั้น ในการทดลองในถังขนาด 75 ลิตร จึงไม่มีการเติมกากน้ำตาล เมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วงอัตราการเจริญคงที่แล้ว และพบว่าทำให้ได้ความเข้มข้นสปอร์ที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 5.73×10^9 CFU/มล. จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคหลายชนิดโดยวิธี well diffusion และ paper disc พบว่า จุลินทรีย์โปรไบโอติกดังกล่าว ไม่ได้สร้างสารต่อต้านเชื้อก่อโรคที่ทดสอบ

คำสำคัญ : *Bacillus subtilis* / โปรไบโอติก / การเพาะเลี้ยงแบบกะ / การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ / สูตรอาหาร

---

[1] *ผู้ช่วยวิจัย หน่วยปฏิบัติการวิจัย พัฒนาวิศวกรรมชีวเคมี และโรงงานต้นแบบ, ศช.*

[2] *นักศึกษาบัณฑิตศึกษา คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[3, 4] *อาจารย์ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[5] *นักวิจัย สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ*

Study on Media Formulation and Production Process of *Bacillus subtilis* Spores for Animal Probiotics

Wairuj Dechmahitkul[1] Chungeera Youkong[2] Kanokwan Poomputra[3] Saengchai Akeprathumchai[4] and Phenjun Mekvijitsaeng[5]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thakham, Bangkuntien, Bangkok 10150

Abstract

The utilization of probiotic microorganism in animal feed has gained considerable attention because it helps improving animal health, increasing animal production and reducing antibiotic *utilization. Bacillus subtillis* (BS) is microorganism used in this study because it is a spore-forming bacteria and it can grow rapidly. The aims of this study were to achieve high spore concentration by using media formulation and mode of cultivation. In addition, the antagonistic activity of BS against some pathogens was investigated.

Two sets of media formulations were studied in shake flask culture, i.e., molasses based formula and defatted soy bean meal based formula. The molasses based media contained 19.85 g/L molasses (as reducing sugar), 0.35 g/L $CaCI_2 \cdot 2H_2O$ and 0.15 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ gave the highest spore concentration of 5.5 x 10^9 CFU/ml whereas the soy bean meal based media contained 20 g/L soy bean meal, 3 g/L molasses and 0.5 g/L K_2HPO_4 gave the highest spore concentration of 1.3 x 10^9 CFU/ml. However, molasses based media led to foaming problem in a fermentation process. Soy bean meal based media was therefore used for fermentor cultivation. In 2 L-fermentor, spore concentrations at 48 h were 1.78 x 10^9 and 4.03 x 10^8 CFU/ml for batch and fed-batch process respectively. Molasses added during cultivation could enhance cell growth but it could impede spore formation. Therefore, in 75-L fed-batch cultivation, no molasses was fed after the stationary phase of growth, resulting in the spore concentration of 5.73 x 10^9 CFU/ml at 48 h. The results of well diffusion assay and paper disc method show that this probiotic does not have an antagonistic activity against several pathogens tested.

Keywords : *Bacillus subtillis* / Probiotics / Batch Cultivation / Fed-batch Cultivation / Media Formulation

---

[1] *Research Assistant, Biochemical Engineering Research and Pilot Plant Development Unit, BIOTECH.*

[2] *Graduate Student, Bioresource and Technology Department.*

[3, 4] *Lecturer, Bioresource and Technology Department.*

[5] *Researcher, Pilot Plant Development and Training Institute.*

1. บทนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมปศุสัตว์มีการตื่นตัวเรื่องการใช้โปรไบโอติก (Probiotic) ในอาหารสัตว์ เพราะจะช่วยให้สัตว์มีสุขภาพดีทำให้ได้ผลผลิตสูง และลดอัตราการตายเนื่องจากการติดเชื้อ การใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) มีข้อเสียคือ ปัญหาเรื่องเชื้อดื้อยาและเกิดสารตกค้างในเนื้อสัตว์ ปัจจุบันกรมปศุสัตว์จึงมีคำสั่งห้ามใช้ โดยทั่วไปกลไกของจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีผลต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค คือ การแย่งอาหาร การแย่งพื้นที่เกาะยึด และการสร้างสารต่อต้าน เป็นต้น [1] จุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติคที่ดีคือแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เพราะนอกจากจะไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ ยังสร้างกรดทำให้เกิดสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ อย่างไรก็ดี การผลิตจุลินทรีย์ประเภทนี้เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าค่อนข้างจะยุ่งยาก โดยเฉพาะขั้นตอนการเก็บรักษาในสภาพที่มีชีวิต

Bacillus subtilis เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย และมีการสร้างสปอร์ที่ทนทานกว่าเซลล์สภาวะปกติ (Vegetative cell) มีรายงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้ช่วยเพิ่มผลผลิตปศุสัตว์ เช่นทำให้ไก่เจริญเติบโตดีขึ้น [2] ช่วยเพิ่มน้ำหนักผลผลิตสัตว์ปีกภายใน 20 สัปดาห์ [3] ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งใน 15 วัน โดยเพิ่มจากร้อยละ 27 เป็นร้อยละ 42 [4] เป็นต้น โดยทั่วไป จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเชิงซ้อนที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย และกากน้ำตาลได้ ส่วนเกลือแร่ต่างๆ มักมีความต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย การเติมเกลือแร่บางชนิด เช่น แคลเซียมและแมงกานีส จะเพิ่มอัตราการสร้างสปอร์ได้ [5] ฟอสเฟตจะไม่ค่อยมีผล เพราะจุลินทรีย์มีกลไกในการลดความต้องการการใช้ โดยเพิ่มอัตราการดูดซึมหรือการปล่อยเอ็นไซม์ออกมาย่อยสารอินทรีย์เพื่อใช้ฟอสเฟต [6] โดยทั่วไปการใช้ระบบแบบกึ่งกะจะให้ผลที่ดีกว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบกะ เนื่องจากจุลินทรีย์จะไม่ได้รับน้ำตาลมากในคราวเดียวซึ่งเป็นผลทำให้เกิดภาวะ Catabolite repression [7] การให้น้ำตาลที่มากเกินไปอาจไม่เป็นผลดีต่อการสร้างสปอร์ โดยมีรายงานว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคส มากถึง 200 กรัมต่อลิตร *Bacillus thuringiensis* จะไม่สามารถสร้างสปอร์ได้เลย [8]

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ ศึกษาสูตร และกระบวนการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อผลิตสปอร์ให้ได้อย่างน้อย 10^9 CFU/มล. โดยเลือกวัตถุดิบที่เป็นผลพลอยได้ทางการเกษตรที่มีราคาต่ำ ได้แก่ กากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง นอกจากนี้ ยังทดสอบการสร้างสารต้านเชื้อก่อโรคบางชนิด

2. อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 แหล่งของจุลินทรีย์

Bacillus subtillis TISTR001 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้รับการเอื้อเฟื้อจากภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร

2.2 การเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า

เพาะเลี้ยงเชื้อ BS โดยใช้ปริมาตรอาหาร 50 มล. ในขวดขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 3 (ใช้เชื้อในช่วง log phase ที่มีความเข้มข้นในช่วง 10^8 CFU/มล.)

2.2.1 สูตรกากน้ำตาล (Molasses based formula)

ออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยแปร 3 องค์ประกอบคือ กากน้ำตาล $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ และ $MnSO_4 \cdot H_2O$ ซึ่งมีค่ากลางคือ 20+15, 0.35+0.30 และ 0.08+0.07 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) [9] ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยกำหนดองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหารเพาะเชื้อให้คงที่ คือ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร, KH_2PO_4 0.5 กรัม/ลิตร และยูเรีย 1 กรัม/ลิตร

2.2.2 สูตรกากถั่วเหลือง (Defatted soy bean meal based formula)

ออกแบบการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแปรสูตร 5 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่มีกากถั่วเหลืองเป็นหลักทั้ง 5 สูตรที่ศึกษา

สูตร	ปริมาณองค์ประกอบหลัก (กรัม/ลิตร)			
	กากถั่วเหลือง	$(NH_4)_2SO_4$	ยูเรีย	กากน้ำตาล
1	20	-	-	-
2	20	-	-	3
3	20	-	1	-
4	20	1	-	-
5	30	1	-	-

2.3 การเพาะเลี้ยงในถังหมัก

ใช้อาหารสูตรกากถั่วเหลืองดังแสดงในตารางที่ 1 และควบคุมสภาวะการเลี้ยง ดังนี้คือ อุณหภูมิ 37 °ซ pH 7.0 และออกซิเจนที่ละลายมากกว่าร้อยละ 20 ของสภาวะอิ่มตัว สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ควบคุมปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ให้อยู่ในช่วง 2-4 กรัม/ลิตร โดยการเติมกากน้ำตาล

1) ถังหมักขนาด 2 ลิตร (BioFlo 110, New Brunswick Scientific, USA) ปริมาตรทำงานในช่วง 0.8 - 1.5 ลิตร ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 5

2) ถังหมักขนาด 75 ลิตร (Biostat UD50, B.Braun, Germany) ปริมาตรที่ใช้เลี้ยงประมาณ 50 ลิตร ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 10 ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร

2.4 การตรวจวิเคราะห์

1) การวัดความเข้มข้นของจุลินทรีย์ใช้วิธี dilution plate count [10] สำหรับการวัดความเข้มข้นของสปอร์ใช้วิธีให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °ซ นาน 20 นาที เพื่อฆ่าเซลล์สภาวะปกติ และเหนี่ยวนำให้สปอร์งอกก่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งในจานเลี้ยงเชื้อ

2) การวัดน้ำตาลรีดิวซ์ ใช้วิธี Somogyi-Nelson [11]

3) การตรวจการสร้างสารต้านเชื้อ ใช้วิธี well diffusion assay [12] และ paper disc method [13]

3. ผลการทดลอง และวิจารณ์

3.1 การศึกษาสูตรอาหาร

3.1.1 สูตรกากน้ำตาล

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในขวดเขย่าการใช้ CCD และ RSM ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลของหลายปัจจัยได้พร้อมกัน โดยไม่ต้องใช้การทดลองซ้ำจำนวนมากดังเช่น การใช้ Factorial Design ผลของแต่ละปัจจัยและปฏิสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยต่อผลตอบสนอง สามารถแสดงในรูปสมการข้างล่างนี้ ค่าจากการคำนวณโดยสมการมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทดลอง

$$Y = - (2.81 \times 10^9) + (6.57 \times 10^8 \times A) + (5.75 \times 10^9 \times B) + (7.92 \times 10^9 \times C) - (1.65 \times 10^7 \times A^2) - (7.99 \times 10^9 \times B^2) - (9.98 \times 10^9 \times C^2) - (1.47 \times 10^6 \times A \times B) - (1.27 \times 10^7 \times A \times C) - (3.15 \times 10^8 \times B \times C)$$

Y (ผลตอบสนอง) คือ ความเข้มข้นของสปอร์ (CFU/มล.)

A คือ ความเข้มข้นของโมลาส (กรัม/ลิตร)

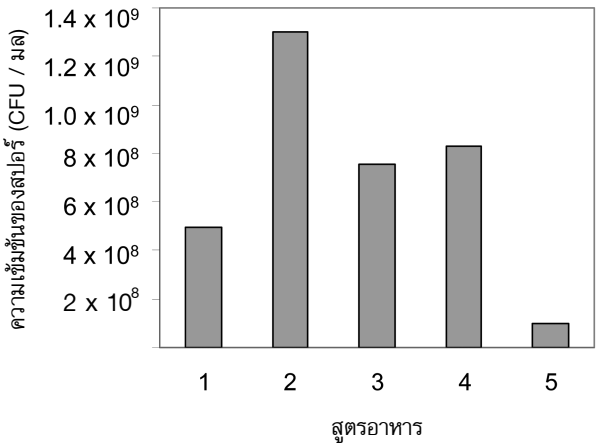
B คือ ความเข้มข้นของ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (กรัม/ลิตร)

C คือ ความเข้มข้นของ $MnSO_4 \cdot H_2O$ (กรัม/ลิตร)

จากการหาอนุพันธ์ของสมการเพื่อหาจุดสูงสุด พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมคือ กากน้ำตาล 19.85 กรัม/ลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.35 กรัม/ลิตร และ $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.15 กรัม/ลิตร ทำให้ได้สปอร์สูงถึง 5.5 x 10^9 CFU/มล.

3.1.2 สูตรกากถั่วเหลือง

จากผลการทดลองรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่า สูตรที่ 2 ซึ่งมีการใช้กากน้ำตาลร่วมด้วยให้ความเข้มข้นของสปอร์สูงสุด และพบว่า แม้มีการเติมการกากน้ำตาลเพียงจำนวนเล็กน้อยก็ทำให้ได้ผลผลิตสปอร์มากกว่าสูตรที่ 1 ที่มีการใช้กากถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียว การเพิ่มแหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรีย ดังสูตรที่ 3 และ 4 ตามลำดับ พบว่าให้สปอร์สูงกว่าการใช้กากถั่วเหลืองเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน การเพิ่มเฉพาะปริมาณกากถั่วเหลืองดังสูตรที่ 5 ให้ผลไม่ดี อาจเป็นเพราะมีความเข้มข้นไนโตรเจนมากเกินไป การเพิ่มกากน้ำตาลเพียงเล็กน้อยมีผลต่อการเพิ่มแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่าสูตรที่ 5 นี้ให้ความเข้มข้นสปอร์ที่ 1.3 x 10^9 CFU/มล.

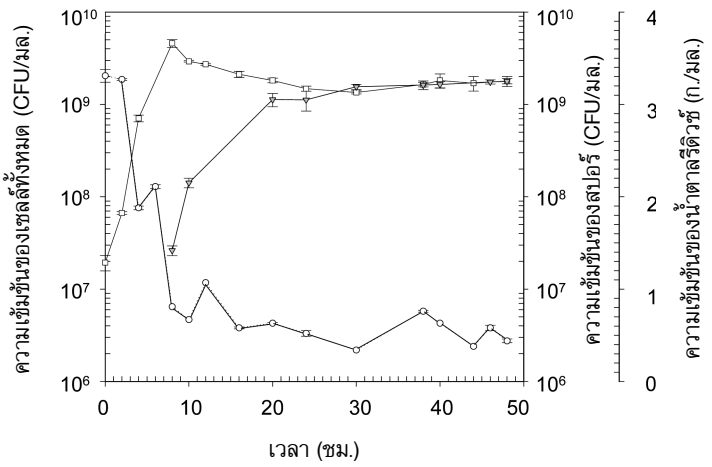


รูปที่ 1 ความเข้มข้นของสปอร์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารแต่ละสูตรในขวดเขย่า (ส่วนประกอบของสูตรอาหารดังตารางที่ 1)

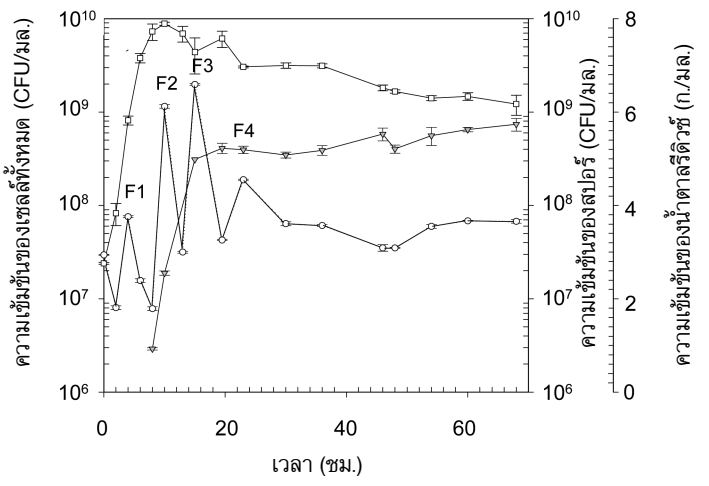
3.2 การศึกษาการผลิตสปอร์ในถังหมัก

3.2.1 การเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ขั้นตอนนี้ใช้สูตรอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบหลักสูตรที่ 2 คือถั่วเหลือง 20 กรัม/ลิตร กากน้ำตาล 3 กรัม/ลิตร และ K_2HPO_4 0.5 กรัม/ลิตร เนื่องจากสูตรนี้ทำให้เกิดฟองเพียงเล็กน้อยในระหว่างการเพาะเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่มีกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลักในข้อ 3.1.1 รูปที่ 2 แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และสปอร์ระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่ารูปแบบของการเจริญของเซลล์ และสปอร์ในการเลี้ยงทั้งแบบกะและกึ่งกะไม่แตกต่างกัน การเติมกากน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะมีผลทำให้ปริมาณเซลล์สภาวะปกติเพิ่มขึ้น และมีผลทำให้ปริมาณสปอร์ลดลง โดยทั่วไปการเกิดสปอร์ เกิดจากการที่สภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น การขาดแคลนอาหาร [14] การเติมน้ำตาลระหว่างการเพาะเลี้ยงจะช่วยทำให้เซลล์เพิ่มขึ้น แต่ไม่สนับสนุนการสร้างสปอร์ เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของเซลล์มากกว่า



(ก)



(ข)

รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ สปอร์ และน้ำตาลรีดิวซ์ ระหว่างการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร

(ก) เพาะเลี้ยงแบบกะ (batch)

(ข) เพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed-batch)

—□— ความเข้มข้นของเซลล์ (CFU/มล.)

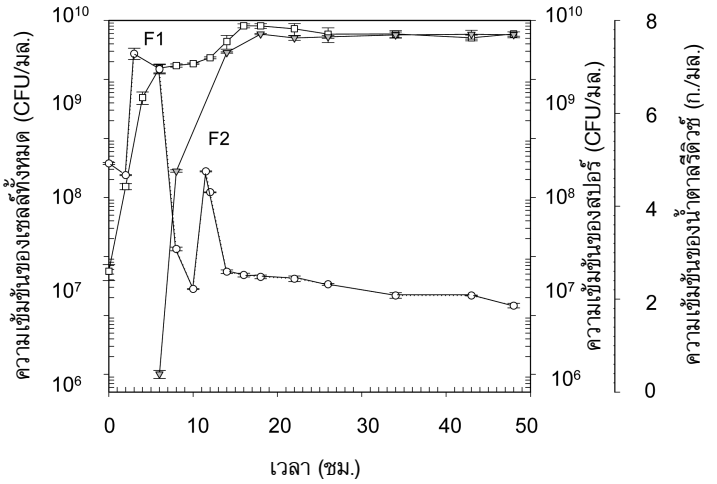
—▽— ความเข้มข้นของสปอร์ (CFU/มล.)

—○— ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/มล.)

(F1 - F4 คือจุดที่มีการเติมกากน้ำตาล)

3.2.2 การเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 75 ลิตร

จากผลการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าการเติมกากน้ำตาลในระยะการเจริญของเซลล์เข้าสู่สภาวะคงตัว (stationary phase) ไม่ได้สนับสนุนการสร้างสปอร์ ในการเพาะเลี้ยงในถังหมักในขนาดขยายกำลังผลิตไม่มีการเติมกากน้ำตาลเมื่อถึงสภาวะการเจริญของเซลล์คงตัว รูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าการเติมกากน้ำตาลในช่วงแรกช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ก่อนเข้าสู่สภาวะคงที่ ซึ่งเป็นข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ เมื่อหยุดการเติมน้ำตาลหลังจากเซลล์เข้าสู่สภาวะคงตัวแล้ว ทำให้การผลิตสปอร์เกิดขึ้นได้อย่างเต็มที่ ที่เวลา 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง สามารถได้ความเข้มข้นสปอร์มากถึง 5.73 x 10^9 CFU/มล.



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ สปอร์ และน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะในถังหมักขนาด 75 ลิตร

—□— ความเข้มข้นของเซลล์ (CFU/มล.)

—▽— ความเข้มข้นของสปอร์ (CFU/มล.)

—○— ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/มล.)

(F1 - F2 คือจุดที่มีการเติมกากน้ำตาล)

3.3 การตรวจสอบการสร้างสารต้านเชื้อก่อโรค

การต้านเชื้อโรคของแบคทีเรียโปรไบโอติกมีกลไกหลายประการ เช่น การแข่งขันจับพื้นที่บนผนังลำไส้ การช่วยให้สภาวะในลำไส้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และการสร้างสารปฏิชีวนะ เป็นต้น มีผู้ค้นพบว่าเชื้อที่ใช้เป็นโปรไบโอติกบางสายพันธุ์มีการสร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งไม่ทราบแน่ชัดว่ามีผลต่อร่างกายสัตว์อย่างไร [15] ดังนั้นสายพันธุ์ของ *Bacillus subtilis* ที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกจึงไม่ควรมีการสร้างสารต้านเชื้อ ข้อมูลจากตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบการสร้างสารต้านเชื้อก่อโรคบางชนิดซึ่งไม่พบ clear zone ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด และในทั้งสองวิธีที่ทดสอบ ดังนั้นกลไกการต้านเชื้อจึงน่าจะมาจากสาเหตุอื่น

ตารางที่ 2 การตรวจสอบการสร้างสารต้านเชื้อของ *Bacillus subtilis* TISTR 001 ต่อเชื้อก่อโรคบางชนิด เมื่อเพาะเลี้ยงใน Nutrient broth และ Tryptic soy broth โดยวิธี well diffusion และ paper-disc assay

The pathogenic bacteria	Clear zone			
	Nutrient broth		Tryptic soy broth	
	Well diffusion assay	Paper-disc assay	Well diffusion assay	Paper-disc assay
Staphylococcus aureus LTH	no clear zone	no clear zone	no clear zone	no clear zone
Staphylococcus aureus	no clear zone	no clear zone	no clear zone	no clear zone
Salmonella typhi	no clear zone	no clear zone	no clear zone	no clear zone
Salmonella anatum SO86105	no clear zone	no clear zone	no clear zone	no clear zone

4. สรุปผลการทดลอง

ในการผลิตสปอร์ของ *Bacillus subtilis* นั้น สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตได้ดี แต่ในการผลิตระดับขนาดใหญ่อาจจะเกิดปัญหาเรื่องฟองมาก กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบหลักที่เหมาะสม เมื่อใช้กากน้ำตาลร่วมด้วยจะช่วยให้ได้ผลผลิตดียิ่งขึ้น กระบวนการผลิตที่เหมาะสมคือการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะที่มีการป้อนกากน้ำตาลเพิ่มเติมระหว่างการเจริญ ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้น แต่ควรหยุดการป้อนเมื่อเซลล์เจริญเข้าสู่สภาวะคงตัวแล้ว เพราะจะทำให้การเกิดสปอร์ลดลง

5. เอกสารอ้างอิง

1. Fuller, R., 1989, “Probiotics in Man and Animals”, *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 66, pp. 365-378.

2. Samanya, M. and Yamauchi, K., 2002, “Histological Alterations of Intestinal Villi in Chickens Fed Dried *Bacillus subtilis var. natto”, Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Vol. 133, pp. 95-104.

3. Jiraphocakul, S. and Sullivan, T.W., 1990, “Influence of a Dried *Bacillus subtilis* Culture and Antibiotics on Performance and Intestinal Microflora in Turkeys”, *Poultry Science,* Vol. 69, pp. 1966-1973.

4. นิภา เตโชดำรงสิน, 2540, *การใช้ Bacillus spp. เพื่อเสริมผลผลิตกุ้งกุลาดำ* (*Penaeus monodon*), วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

5. Cote, R. and Gherna, R.L., 1999, “Medium Formulation and Design, *E.coli* and *Bacillus* spp.”, In *Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation,* Flickinger, M.C. and Drew, S.W. (Eds.), John Wiley & Sons, New York, pp. 1676-1683.

6. Harwood, C.R., 1999, “Bacillus”, In *Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation,* Flickinger, M.C. and Drew, S.W. (Eds.), John Wiley & Sons, New York, pp. 234-260.

7. Yamane, T. and Shimizu, S., 1984, “Fed-batch Technique in Microbial Process”, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology,* Vol. 30, pp. 147-197.

8. Kang, B., Lee, S., and Chang, H., 1992, “Enhanced Spore Production of *Bacillus thuringiensis* by Fed-batch Culture”, *Biotechnology*

Letters, Vol. 14, No. 8, pp. 721-726.

9. Khuri, A.I. and Cornell, J.A., 1996, *Response Surfaces Designs and Analysis,* Marcel Dekker, Inc., New York.

10. FDA, *Bacteriological Analytical Manual Online,* 1998, 8th Edition, US.

11. Nelson, N., 1944, "A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose", *Journal of Biological Chemistry,* Vol. 153, No. 2, pp. 375-380.

12. Sable, S., Pons, A.M., Gaillard, S.G., and Cottenceau, G., 2000, *Applied and Environmental Microbiology,* Vol. 66, No. 10, pp. 4595-4597.

13. สุชาดา คูชัยสิทธิ์, 2535, *การผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อ Bacillus subtilis,* วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

14. Nicholson, W.L. and Setlow, P., 1990, *"Sporulation, Germination and Outgrowth",* In *Molecular Biological Methods for Bacillus,* Harwood, C.R. and Cutting, S.M. (Eds), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom. pp. 391-450

15. คณึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์, 2540, *"การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและศักยภาพการผลิตการใช้และความต้องการ Probiotics ของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์",* เอกสารวิชาการ *Biotec 3/2540,* กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์, กรมปศุสัตว์.