Science and Engineering Connect, ISSN 3027-7914 (Online)
Vol. 49 No. 2 pp. 108-122 (2026)

Research Article

# การหมักแบบอาหารแข็งของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มโดยใช้บาซิลลัส 2 สายพันธุ์ร่วมกันเพื่อผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์

# Solid-state Fermentation of Palm Kernel Cake Using Two *Bacillus* Strains in Co-culture for Probiotics Production

**อภิชญา แซ่เต๋ง*, ผัสพร ผ่องมาลัย, สายสุนีย์ รัตนกรุณา, ธนนนท์ ยืนยัง, อรรณพ นพรัตน์**
**Apichaya Sae-Teng*, Patsaporn Pongmalai, Saisunee Rattanakaruna, Thananon Yuenyang, Annop Nopharatana**
สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ ประเทศไทย
Pilot Plant Development and Training Institute,
King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand
** Corresponding author E-mail: Apichaya.sae@kmutt.ac.th*

Received 15 December 2025; Revised 17 April 2026; Accepted 28 April 2026

**บทคัดย่อ**

**ความเป็นมาและวัตถุประสงค์ :** *Bacillus velezensis* และ *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียที่ใช้เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ในส่วนผสมอาหารสัตว์ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการควบคุมและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี นอกจากนี้ ยังสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประโยชน์ต่อการย่อยอาหารของสัตว์ เช่น เอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส กระบวนการหมักแบบอาหารแข็งเป็นกระบวนการที่นิยมใช้ในการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ และยังช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนะของอาหารสัตว์ได้ อย่างไรก็ตาม การใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวในการหมักแบบอาหารแข็งส่งผลให้มีสารอาหารจากวัตถุดิบหลงเหลืออยู่เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. velezensis* และ *B. subtilis* เพื่อให้ใช้สารอาหารจากวัตถุดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังคาดว่าจะสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิตโพรไบโอติกส์จากวัสดุเหลือทิ้ง ได้แก่ กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันปาล์ม ได้อีกด้วย

**วิธีดำเนินการวิจัย :** การศึกษานี้ใช้วิธีการหมักแบบอาหารแข็งด้วยจุลินทรีย์ *B. velezensis* และ *B. subtilis* ที่อัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 โดยใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นวัตถุดิบ ระยะเวลาการหมัก 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ในวันที่ 0 1 3 5 และ 7 วัดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่าง ๆ ในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด ปริมาณโปรตีน กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส และกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ความชื้น และค่าพีเอช เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์

**ผลการวิจัย :** จากการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของการใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่หมักด้วยจุลินทรีย์ *B. velezensis* และ *B. subtilis* ที่อัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดของทุกอัตราส่วนมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและกิจกรรมเอนไซม์ อะไมเลสมีค่าเพิ่มสูงสุดในวันที่ 3 เช่นเดียวกับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด ตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 ให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:2 ในส่วนของกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสพบว่า ตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:1 ให้ค่าสูงกว่าตัวอย่างอื่น

**สรุป :** การใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันในกระบวนหมักแบบอาหารแข็งเพื่อผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์และเพิ่มคุณค่าทางโภชนะต่าง ๆ โดยใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. velezensis* และ *B. subtilis* ที่อัตราส่วน 1:1 เป็นภาวะที่เหมาะสมในระดับห้องปฏิบัติการ

**การนำไปใช้ประโยชน์เชิงปฏิบัติ :** ภาวะที่เหมาะสมในการหมักกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันเพื่อผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์และเพิ่มคุณค่าทางโภชนะต่าง ๆ ที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางการขยายขนาดการผลิตในระดับโรงงานต้นแบบและต่อยอดสู่การขยายผลเชิงการพาณิชย์ต่อไป

**คำสำคัญ :** กระบวนการหมักอาหารแข็ง, กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน, โพรไบโอติกส์, เอนไซม์โปรติเอส, เอนไซม์อะไมเลส

## Abstract

**Background and Objectives:** *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis* are bacteria commonly used as probiotic microorganisms in animal feed formulations due to their effectiveness in controlling and inhibiting pathogenic microbes. Additionally, they can produce beneficial enzymes that aid animal digestion, including proteases and amylases. Solid-state fermentation (SSF) is a widely adopted process for probiotics production and is also known to enhance the nutritional value of animal feed. However, previous studies have shown that using a single microbial strain in SSF often results in incomplete utilization of nutrients from raw materials at the end of the fermentation process. Therefore, two probiotic strains, *B. velezensis* and *B. subtilis*, were selected to enhance the efficiency of nutrient utilization from a raw material. This dual-strain approach is expected to improve probiotics production efficiency from agro-industrial by-products, specifically palm kernel cake, which is a residue from the palm oil production industry.

**Methodology:** This study employed SSF with *B. velezensis* and *B. subtilis* at the ratios of 1:1, 1:2, and 2:1 with palm kernel cake as the fermentation substrate. Fermentation was carried out over a period of 7 days at 37°C. Samples were collected on days 0, 1, 3, 5, and 7 for

the analysis. Changes of various parameters were monitored throughout the fermentation period, including total viable count, soluble protein content, protease activity, amylase activity, reducing sugar content, moisture content and pH. The objective was to determine the optimal condition for probiotics production.

**Main Results:** The results of the study on the optimal ratio for fermenting palm kernel cake with *B. velezensis* and *B. subtilis* at ratios of 1:1, 1:2 and 2:1 reveal that the total viable microbial count reached its peak on day 3 for all tested ratios. Similarly, the protease and amylase enzyme activities in the fermented palm kernel cake reached their highest levels on day 3, corresponding with the peak in total viable microbial count. The samples with the ratios of 1:1 and 2:1 exhibited higher protease activity compared to the one with the ratio of 1:2; the 1:1 ratio showed the highest amylase activity among all the treatments.

**Conclusions:** Utilization of palm kernel cake as a substrate for SSF to produce probiotic microorganisms and to enhance nutritional value was investigated using two probiotic strains, *B. velezensis* and *B. subtilis*. A ratio of 1:1 was identified as the optimal condition at the laboratory scale.

**Practical Application:** The present findings can serve as a basis for scaling up the process to pilot-scale production and can be further developed into a commercial application.

**Keywords:** Solid-state Fermentation, Palm Kernel Cake, Probiotics, Protease Enzyme, Amylase Enzyme

## Introduction

จุลินทรีย์ *Bacillus* spp. หลายชนิดนิยมนำมาใช้ในส่วนผสมโพรไบโอติกส์และปรับปรุงคุณค่าทางโภชนะของอาหารสัตว์ [1-2] เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสปอร์ที่ทนทานต่อความร้อน การอบแห้ง การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และภาวะกรดในกระเพาะอาหาร รวมถึงมีความสามารถในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ และผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ช่วยเพิ่มการย่อยอาหารของสัตว์ เช่น เอนไซม์ โปรติเอสและอะไมเลส [3-5] จุลินทรีย์ที่น่าสนใจในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus velezensis* เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย และได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่าปลอดภัย (Generally Recognized As Safe, GRAS) [5] การผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ในปัจจุบันนั้นมีหลายหลายวิธี โดยหนึ่งในวิธีที่นิยม คือ การใช้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (Solid-state fermentation) เพราะเป็นกระบวนการที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำและให้ผลผลิตสูง [6] วัตถุดิบส่วนใหญ่ที่นำมาใช้การผลิตส่วนผสมในอาหารสัตว์ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งมักเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรม เช่น กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม

(palm kernel cake; PKC) เป็นต้น

กากเนื้อในเมล็ดปาล์มเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันปาล์ม ใน พ.ศ. 2566 พบว่าประเทศไทยมีการผลิตน้ำมันปาล์มสูงถึง 18.27 ล้านตัน/ปี [7] กากเนื้อในเมล็ดปาล์มได้มาจากการนำเมล็ดปาล์มไปกะเทาะกะลาออกแล้วนำเฉพาะส่วนของเนื้อในไปสกัดน้ำมัน หลังจากสกัดน้ำมันออกจากเนื้อในเมล็ดปาล์มทำให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งในกระบวนการ โดยประกอบด้วยกากเนื้อในเมล็ดปาล์มประมาณร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก [8] โดยกากเนื้อในเมล็ดปาล์มเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก และอุดมไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ ที่สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ได้แก่ โปรตีน และพลังงาน ดังนั้น ในปัจจุบัน จึงนิยมนำกากเนื้อในเมล็ดปาล์มมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบทดแทนอาหารสัตว์เพื่อลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์กันอย่างแพร่หลาย ทั้งในสัตว์ปีก สัตว์เคี้ยวเอื้องและสัตว์กระเพาะเดี่ยว อย่างไรก็ตาม การใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มเพียงอย่างเดียวอาจมีสารอาหารบางอย่างไม่เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์ จึงมีการนำกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งที่กล่าวไปข้างต้นมาปรับปรุงคุณภาพของกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม Minawati และคณะ [9] รายงานว่า การนำกากเมล็ดในปาล์มมาหมักด้วย *B. subtilis* เพื่อเพิ่มคุณภาพของปริมาณสารอาหารของกากเมล็ดในปาล์มหมัก สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนหยาบ (Crude protein content) อยู่ในระดับประมาณร้อยละ 25 แต่ทว่าในงานวิจัยที่ผ่านมาของผู้วิจัยในการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดเดียว พบว่า สารอาหารจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เพียงชนิดเดียวยังหลงเหลืออยู่เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. velezensis* และ *B. subtilis* มาใช้ในการหมักกากเนื้อในเมล็ดปาล์มร่วมกัน เพื่อทำให้มีสารสำคัญได้สูงขึ้นและยังเป็นการใช้สารอาหารจากวัตถุดิบให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของการใช้บาซิลลัส 2 สายพันธุ์ร่วมกันในการหมักกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม เพื่อผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันหมักและเพิ่มคุณค่าทางโภชนะต่าง ๆ โดยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อนำไปพัฒนากระบวนการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันต่อไปในระดับโรงงานต้นแบบ

## Materials and methods

### วัตถุดิบ

1. จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus velezensis* (มาจากการ reidentified จุลินทรีย์ *Bacillus licheniformis* TISTR 013 ใหม่) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR, Thailand Institute of Scientific and Technological Research) เลขที่ 35 หมู่ที่ 3 เทคโนธานี ตำบลคลองห้า อำเภอคลองห้า อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120 และจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* (carry) จากสถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ (สรบ.) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มจธ.) (บางขุนเทียน) เลขที่ 49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร 10150

2. กากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่มีความชื้นประมาณร้อยละ 4 จากบริษัท กิ้มกี่ กิจเจริญ จำกัด ตั้งอยู่ที่ 41 ม.3 ต.บ้านเกาะ อ.เมือง จ.สมุทรสาคร 74000

**การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์**

การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ *B. velezensis* และ *B. subtilis* โดยเตรียมแยกกันในอาหารเพาะเชื้อแบบเหลว Yeast extract peptone dextrose (YPD) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย สารยีสต์สกัด 0.5 กรัม เปปโตน 1 กรัม และกลูโคส 1 กรัม นำอาหารไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้อุณหภูมิของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับอุณหภูมิห้อง ลงหัวเชื้อจุลินทรีย์ โดยนำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในเครื่องเขย่าตู้เพาะเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยของกล้าเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) ให้มีค่า 1.0±0.010 แล้วนำสารแขวนลอยเชื้อ *B. velezensis* และ *B. subtilis* มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) เท่ากับ 1.0±0.010 หรือ $10^7$ Colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของการใช้บาซิลลัส 2 สายพันธุ์ในการหมัก

**การเตรียมตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มและกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง**

การเตรียมตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม โดยชั่งกากเนื้อในเมล็ดปาล์มปริมาณ 30 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับความชื้นด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟสความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้มีความชื้นอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 50-60 และค่า pH อยู่ในช่วง 6.0-7.0 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอให้ตัวอย่างเย็นลงแล้วจึงนำมาใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ *B. velezensis* และ *B. subtilis* ที่เตรียมไว้ ซึ่งมีอัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ปิดฝาขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลีและคลุมด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และหมักแบบตั้งทิ้งไว้ (static) เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 0 1 3 5 และ 7 เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ในช่วงเวลาในการหมักในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่าง

**การวิเคราะห์องค์ประกอบโดยประมาณ (Proximate analysis)**

การวิเคราะห์องค์ประกอบโดยประมาณ [10] ของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ความชื้น เถ้า ไขมัน กากหยาบ และคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้

**การนับปริมาณจุลินทรีย์ (Total viable count)**

นำตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มหมัก ปริมาณ 1 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร

9 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายและดูดสารละลายเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้น YPD ทำการกระจายในจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีในจานอาหารเพาะเชื้อที่มีโคโลนี 25-250 โคโลนี แล้วนำมาคำนวณหาค่า CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง (CFU/g sample)

**การหาปริมาณโปรตีน (Soluble protein)**

หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford [11] โดยชั่งกากเนื้อในเมล็ดปาล์มหมักปริมาณ 5 กรัมผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสาร Bradford assay solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

โดยการหาปริมาณโปรตีนคำนวณจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นสารมาตรฐานเท่ากับ 0 ถึง 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยค่าปริมาณโปรตีนแสดงอยู่ในหน่วย มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (mg/g sample)

**การหากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (Protease activity)**

หากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส [12] โดยชั่งตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มหมักปริมาณ 5 กรัม ผสมกับสารบัฟเฟอร์ฟอสเฟส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (pH 7.2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 0.6 (โดยละลายในสารละลายทริส ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 8.0)) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มสารละลายในที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมกรดไตรคลอโรอะเซติกความเข้มข้น 0.11 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสาร Folin reagent (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 เท่า (ปริมาตรต่อปริมาตร)) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

โดยกำหนดให้ 1 Unit ของเอนไซม์ เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนได้สาร Tyrosine อยู่ในอัตรา เท่ากับ 1 ไมโครกรัมของสารมาตรฐานไทโรซีน ต่อนาที โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสแสดงอยู่ในหน่วย Unit ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (Unit/g sample)

**การหาปริมาณเอนไซม์อะไมเลส (Amylase activity)**

หากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส [13] โดยชั่งตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มหมักปริมาณ 5 กรัม ผสมกับสารบัฟเฟอร์ฟอสเฟส ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (pH 7.0) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 3,5 - Dinitrosalicylic acid (DNS) (เตรียมโดยชั่งสาร DNS ปริมาณ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ปริมาณ 30 กรัม ลงไป จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์แมลิตี ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำสารละลายตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที ทำตัวอย่างให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

โดยกำหนดให้ 1 Unit ของเอนไซม์ เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งได้สารกลูโคสอยู่ในอัตราเท่ากับ 1 ไมโครกรัมของสารมาตรฐานกลูโคส ต่อนาที โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสแสดงอยู่ในหน่วย Unit ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (Unit/g sample)

**การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar content)**

หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS [14] โดยชั่งตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มหมักปริมาณ 5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที ทำตัวอย่างให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

โดยการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คำนวณจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นสารมาตรฐานเท่ากับ 0 ถึง 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงอยู่ในหน่วย กรัมของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (g RS/g sample)

**การหาร้อยละความชื้น (Percentage of moisture content)**

หาร้อยละความชื้นของตัวอย่างด้วยวิธี AOAC [10] โดยชั่งตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มหมักปริมาณ 5 กรัม ลงในถ้วยอะลูมิเนียม และนำไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

**การวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH)**

หาค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยชั่งกากเนื้อในเมล็ดปาล์มหมักปริมาณ 1 กรัม ผสมน้ำกลั่นลงไปในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) เป็นเวลา 30 วินาที วัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter

**การวิเคราะห์ผลทางสถิติ**

ข้อมูลการทดลองนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance; ANOVA) และทดสอบความแตกต่างขอค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS® เวอร์ชัน 17 (SPSS Inc.; USA)

## Results and Discussion

**ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบโดยประมาณ**

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบ ของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นวัตถุดิบ พบว่า กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันประกอบด้วยโปรตีนปริมาณร้อยละ 16.24±0.39 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ความชื้นร้อยละ 4.48±0.06 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เถ้าปริมาณร้อยละ 4.61±0.02 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ไขมันปริมาณร้อยละ 6.11±0.03 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) กากหยาบปริมาณร้อยละ 25.51±0.33 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ปริมาณร้อยละ 47.39±0.27 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

**ผลการหมักแบบอาหารแข็งของกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม**

รูปที่ 1A แสดงจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในการหมักกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันด้วย *B. velezensis* และ *B. subtilis* ในอัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดรวมกันมีค่าเริ่มต้น เท่ากับ 6.15±0.06 6.17±0.09 และ 6.18±0.15 log CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง ($(1.42±0.19)\times10^6$ $(1.50±0.33)\times10^6$ และ $(1.51±0.48)\times10^6$ CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง) ตามลำดับ จากนั้นจุลินทรีย์มีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก ซึ่งมีค่า 9.06±0.10 9.19±0.13 และ 8.48±0.64 log CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง ($(1.17±0.26)\times10^9$ $(1.60±0.52)\times10^9$ และ $(5.66±6.64)\times10^8$ CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จำนวนจุลินทรีย์ทั้งสามอัตราส่วนมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก หลังจากวันที่ 3 พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ของตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ในขณะที่ตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:2 กลับมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลง เนื่องจาก *B. subtilis* เป็นจุลินทรีย์ที่มีการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์อื่น ๆ ได้ [15] ทั้งนี้ไม่พบจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้หมักด้วยจุลินทรีย์ (กลุ่มควบคุมลบ) ตลอดระยะเวลาในการหมัก

จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากการหมักกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันนั้นมีจำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์

สูงสุด เป็น $1\times10^9$ CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง ซึ่งเป็นปริมาณที่อยู่ในกำหนดจากข้อมูลประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้าหรือขายอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559 กำหนดให้ชีวผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะจุลินทรีย์ที่เติมในอาหารสัตว์ โดยมีปริมาณที่ใช้ผสมในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปแล้วจะต้องมีอัตราส่วนหรือปริมาณของสารเสริมชีวนะชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันไม่น้อยกว่า $1\times10^5$ CFU ต่ออาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม [16]

ปริมาณโปรตีนของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้หมักด้วยจุลินทรีย์ (กลุ่มควบคุมลบ) และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่หมักด้วยจุลินทรีย์ที่อัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 ในวันที่ 0 พบว่ามีปริมาณโปรตีนเริ่มต้น เท่ากับ7.08±0.35 6.89±0.19 6.44±0.12 และ 6.94±0.07 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่างตามลำดับ ในรูปที่ 1B โดยในระหว่างกระบวนการหมักพบว่าตัวอย่างกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่หมักด้วยจุลินทรีย์ที่อัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 7 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 31.02±0.65 31.79±2.41 และ 28.78±0.61 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปริมาณโปรตีนทั้งสามอัตราส่วนมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ทั้งนี้ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างกลุ่มควบคุมลบมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะของการหมัก

ตัวอย่างในวันที่ 0 ทุกตัวอย่าง ไม่พบกิจกรรรมของเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส ดังแสดงในรูปที่ 1C และ 1D โดยกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่หมักด้วย *B. velezensis* และ *B. subtilis* ที่อัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 มีการเพิ่มสูงสุดในทุกตัวอย่างในวันที่ 3 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 24.43±2.23 19.68±2.38 และ 27.70±0.31 Unit ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่างและกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เท่ากับ 323.45±57.35 238.91±37.96 และ 189.74±9.38 Unit ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่มีค่ามากกว่าตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:2 ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:1 มีค่ามากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น แต่ทั้งนี้หลังกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงสุดวันที่ 3 ซึ่งสอดคล้องกับผลของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีการเพิ่มขึ้นอย่างมากในวันที่ 3 เช่นกัน อย่างไรก็ตามหลังจากวันที่ 3 ของการหมัก กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสของทุกตัวอย่างมีค่าลดลงเรื่อย ๆ จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งอาจเกิดจากการหมดลงของสารอาหารหรือการเสียสภาพของเอนไซม์ (enzyme denaturation) ที่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่น [17] รวมถึงการปล่อยเอนไซม์ออกนอกเซลล์ (extracellular enzymes) นั้นเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโต และจะลดลงเมื่อจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) [18] ทั้งนี้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้หมักด้วยจุลินทรีย์ (กลุ่มควบคุมลบ) ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสตลอดระยะเวลาในการหมัก

จากงานศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัย พบว่าการใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันหมักด้วยจุลินทรีย์ *B. subtilis* เพียงสายพันธุ์เดียว เป็นเวลา 3 วัน ได้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส เท่ากับ 5.42±2.11 และ 2.70±0.08 Unit ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ จุลินทรีย์ *B. velezensis* และ *B. subtilis* ร่วมกัน 2 สายพันธุ์ในงานนี้ จะมีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส มากกว่า ถึง 4.5 เท่า

และ 119.8 เท่า

จากผลของกิจกรรรมของเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่หมักด้วย *B. velezensis* และ *B. subtilis* นั้นจะเห็นได้ว่า มีปริมาณที่อยู่ในกำหนดจากข้อมูลประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้าหรือขายอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559 กำหนดให้ชีวผลิตภัณฑ์ประเภทเอนไซม์ (Enzyme) เป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ โดยมีปริมาณที่ใช้ผสมในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปแล้วจะต้องมีอัตราส่วนหรือ ปริมาณของเอนไซม์ชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันไม่น้อยกว่า 100 ยูนิต (Units) ต่อ อาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม [16]

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันของทุกตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 1E ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันหมักของทุกตัวอย่างในวันที่ 0 มีค่าอยู่ในช่วง 15.42-16.31 กรัมของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง โดยในระหว่างการหมักจนสิ้นสุดกระบวนการ พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในทุกอย่าง

รูปที่ 1F แสดงร้อยละความชื้นของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันหมักของทุกอย่าง โดยร้อยละความชื้นของทุกอย่างในวันที่ 0 มีค่าเริ่มต้นอยู่ในช่วง 55.28-59.79 ซึ่งค่าความชื้นที่เหมาะสมในการหมัก *B. velezensis* และ *B. subtilis* แบบอาหารแข็งจากการศึกษาที่ผ่านมาอยู่ในช่วงร้อยละ 50 [18] และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของร้อยละความชื้นของทุกตัวอย่างมากนักตลอดระยะเวลาการหมัก 7 วัน

ค่า pH ของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้หมักด้วยจุลินทรีย์ (กลุ่มควบคุมลบ) และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่หมักด้วย *B. velezensis* และ *B. subtilis* ที่อัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 แสดงในรูปที่ 1G มีค่า pH เริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ 7.35±0.01 7.30±0.03 7.24±0.01 และ 7.27±0.03 ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างที่มีการหมักด้วยจุลินทรีย์ทั้งหมดมีค่า pH เพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 0 และสูงสุดในวันที่ 3 โดยทั้งสามตัวอย่างมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วง 9.07-9.12 โดยการเพิ่มขึ้นของค่า pH อาจเป็นเพราะโปรตีนที่อยู่ในกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันถูกย่อยสลายในระหว่างกระบวนการหมักเป็นกรดอะมิโนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนของจุลินทรีย์ จึงเกิดการปลดปล่อยของแอมโมเนียในระหว่างการหมัก ส่งผลให้ pH ของตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้น [19] ทั้งนี้ กลุ่มควบคุมลบที่ไม่มีการหมักด้วยจุลินทรีย์ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ตลอดระยะเวลาในการหมัก

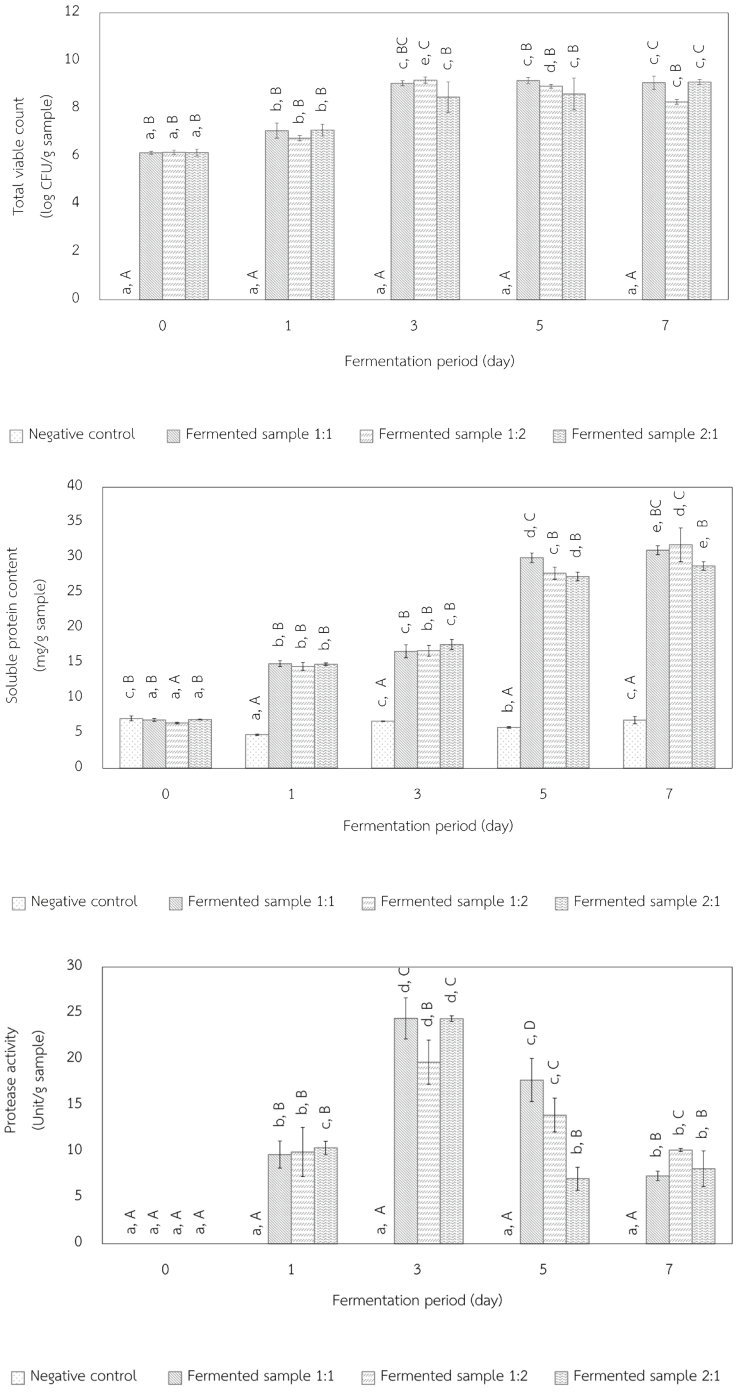


**Figure 1** Change in total viable count (A); soluble protein content (B); protease activity (C); amylase activity (D); reducing sugar content (E); percentage moisture (F) and pH (G) in palm kernel cake that was not subject to microbial fermentation (negative control) and with palm kernel cake fermented with *B. velezensis* and *B. subtilis* at ratios of 1:1, 1:2, and 2:1 at 37 °C for 7 days

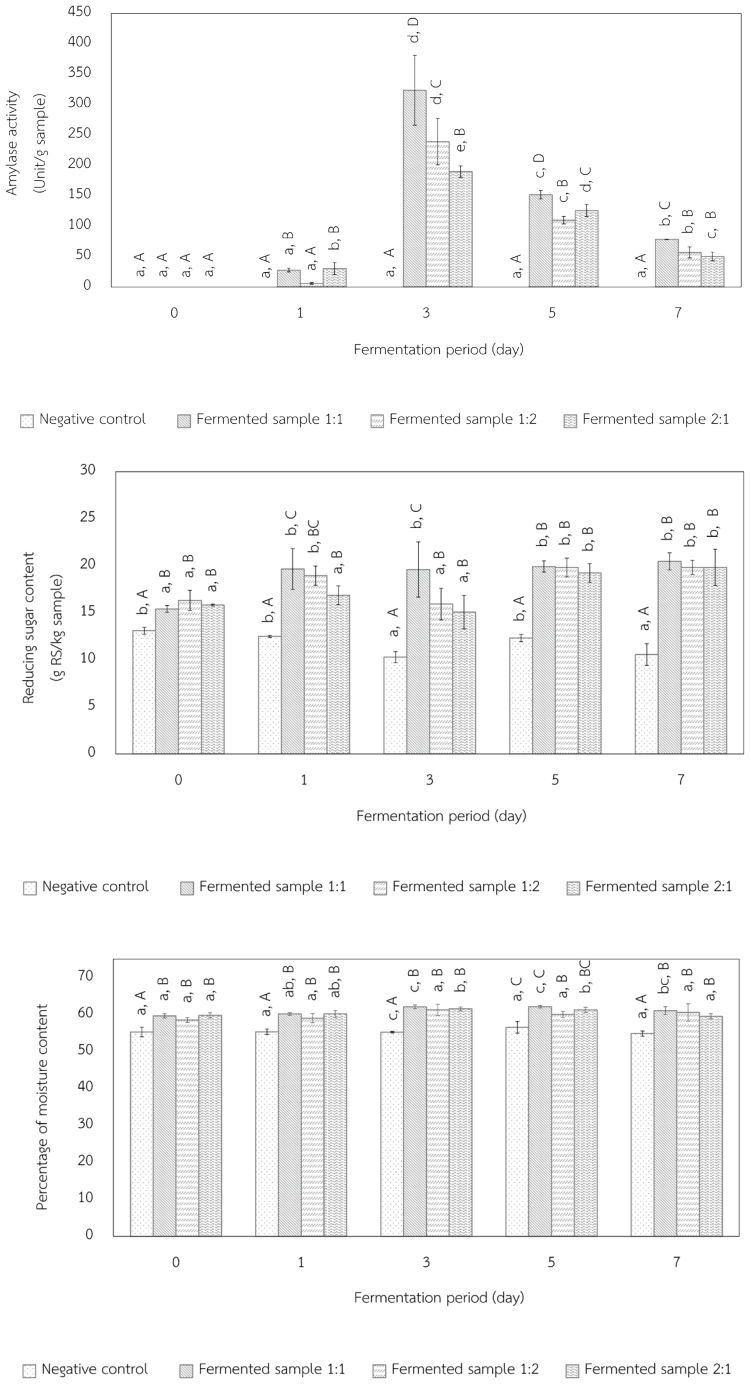


**Figure 1** Change in total viable count (A); soluble protein content (B); protease activity (C); amylase activity (D); reducing sugar content (E); percentage moisture (F) and pH (G) in palm kernel cake that was not subject to microbial fermentation (negative control) and with palm kernel cake fermented with *B. velezensis* and *B. subtilis* at ratios of 1:1, 1:2, and 2:1 at 37 °C for 7 days (continued)

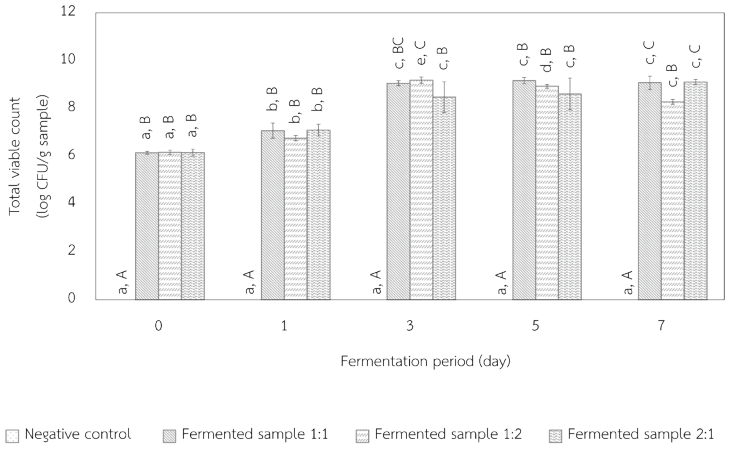


**Figure 1** Change in total viable count (A); soluble protein content (B); protease activity (C); amylase activity (D); reducing sugar content (E); percentage moisture (F) and pH (G) in palm kernel cake that was not subject to microbial fermentation (negative control) and with palm kernel cake fermented with *B. velezensis* and *B. subtilis* at ratios of 1:1, 1:2, and 2:1 at 37 °C for 7 days (continued)

Note: Bars with the same lowercase letters within the same sample and bars with the same uppercase letters within the same fermentation time are not significantly different ($p > 0.05$).

## Conclusions

จากผลการทดลองศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของการใช้บาซิลลัส 2 สายพันธุ์ร่วมกันในการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากกากเนื้อในเมล็ดปาล์มหมักโดยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้จุลินทรีย์ *B. velezensis* และ *B. subtilis* ที่อัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดของทุกอัตราส่วนมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่หมักด้วยจุลินทรีย์มีค่าเพิ่มสูงสุดในวันที่ 3 เช่นเดียวกับผลของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด โดยตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสมากกว่าตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:2 แต่กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสพบว่าตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:1 มีค่ามากกว่าตัวอย่างอื่น ดังนั้นจึงเลือกกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันที่หมักด้วยจุลินทรีย์ *B. velezensis* และ *B. subtilis* ที่อัตราส่วน 1:1 เป็นภาวะเหมาะสมของการใช้บาซิลลัส 2 สายพันธุ์ร่วมกันในการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากกากเนื้อในเมล็ดปาล์มหมักโดยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งในระดับห้องปฏิบัติการ

## Acknowledgements

ทีมงานวิจัยขอขอบคุณห้องปฏิบัติการ Solid State Fermentation and Bioprocess Engineering สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ และทุนวิจัยพระจอมเกล้าธนบุรี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสนับสนุนการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จและลุล่วงไปด้วยดี

## References

1. Mingmongkolchai, S. and Panbangred, W. 2018. *Bacillus* probiotics: An alternative to antibiotics for livestock production, *Journal of Applied Microbiology*, 124, 1334-1346.
2. Tanpong, S., Khochamit, N., Pootthachaya, P., Siripornadulsil, W., Unnawong, N., Cherdthong, A., Tengjaroenkul, B. and Wongtangtintharn, S. 2024. Citric acid by-product fermentation by *Bacillus subtilis* I9: A promising path to sustainable animal feed. *Veterinary Sciences*, 11, 484.
3. Lee, J., Park, I., Choi, Y. and Cho, J. 2012. *Bacillus* strains as feed additives: In vitro evaluation of its potential probiotic properties. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25, 577-585.
4. Bromfield, J.I., Niknafs, S., Chen, X., von Hellens, J., Horyanto, D., Sun, B., Yu, L., Tran, V.H., Navarro, M. and Roura, E. 2024. The evaluation of next-generation Probiotics on broiler growth performance, gut morphology, gut microbiome, nutrient digestibility, in addition to enzyme production of *Bacillus* spp. in vitro. *Animal Nutrition*, 18, 133-144.
5. Sousa, E.G., Campos, G.M., Quaresma, L.S., Mota, T.F.M., de Castilhos Ghisi, N., Gomes, G.C., Santos, R.C.V., de Souza, B.G.R., Guédon, E., de Castro Soares, S., Dutra, J.C.F. and de Carvalho Azevedo, V.A. 2025. Exploring *Bacillus velezensis* in a biomedical context: A systematic review. *Academia Molecular Biology and Genomics*, 2, 1-21.
6. Kapilan, R. 2015. Solid-state fermentation for microbial products: A review. *Archives of Applied Science Research*, 7, 21-25.
7. Trade Policy and Strategy Office, Guidelines for enhancing the trade potential of the palm oil industry [Online], Available: https://www.tpso.go.th/document/2409-0000000001. [8 September 2025]
8. Husin, A.H., Hamzani, S.H., Amirnordin, S.H., Batcha, M.F.M., Wahidon, R. and Wae-hayee, M. 2022. Drying studies of oil palm decanter cake for production of green fertilizer. *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*, 97, 66-79.
9. Mirnawati, M., Ciptaan, G. and Ferawati, F. 2019. Improving the quality and nutrient content of palm kernel cake through fermentation with *Bacillus subtilis. Livestock Research for Rural Development*, 31, 98.

10. Association of Official Analytical Chemists, 2012, Official Methods of Analysis, AOAC International, Gaithersburg.
11. Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
12. Boratyñski, F., Szczepañska, E., Grudniewska, A., Gniĺka, R. and Olejniczak, T. 2018. Improving of hydrolases biosythesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. *Scientific Reports*, 8, 10157.
13. Afrisham, S., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A. and Karami, Z., 2016, Characterization of a thermostable, $CaCl_2$-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid-state fermentation by utilizing agricultural wastes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32, 98-106.
14. Saqib, A.A.N. and Whitney, P.J. 2011. Differential behaviour of the Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*, 35, 4748-4750.
15. Zhang, Q., Kobras, C.M., Gebhard, S., Mascher, T. and Wolf, D. 2022. Regulation of heterologous subtilin production in *Bacillus subtilis* W168. *Microbial Cell Factories*, 21, 57.
16. Ministry of Agriculture and Cooperatives. 2016. Notification of the Ministry of Agriculture and Cooperatives on the specification of substances permitted in animal feed, their usage levels, and conditions prohibiting the production, import, or sale of animal feed, B.E. 2559 (2016), Government Gazette, Vol. 133, Special Issue 306 Ng.
17. Karataş, H., Uyar, F., Tolan, V. and Baysal, Z., 2013, Optimization and enhanced production of **α**-amylase and protease by a newly isolated *Bacillus licheniformis* ZB-05 under solid-state fermentation. *Annals of Microbiology*, 63, 45-52.
18. Sun, B., Zou, K., Zhao, Y., Tang, Y., Zhang, F., Chen, W., Tang, W., Chang, C. and Zheng, Y. 2023. The fermentation optimization for alkaline protease production by *Bacillus subtilis* BS-QR-052, *Frontiers in Microbiology*, 14, 1301065.
19. Zhu, X., Deng, Z., Wang, Q., Hao, S., Liu, P., He, S. and Li, X. 2024. Improvement in palm kernel meal quality by solid-sate fermentation with *Bacillus velezensis, Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus paracasei*. Fermentation, 10, 655.
20. Wang, J. and Fung, D.Y.C. 1996. Alkaline-fermented foods: A review with emphasis on pidan fermentation. *Critical Reviews in Microbiology*, 22, 101-138.