

สภาวะที่เหมาะสมทางสถิติและแบบจำลองทางคณิตศาสตร์
ของการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Enterococcus faecium*
ในกากถั่วเหลืองด้วยการหมักแบบแห้ง

STATISTICAL OPTIMIZATION AND MATHEMATICAL MODELING
OF PROBIOTIC STRAIN *Enterococcus faecium* CULTIVATION
IN SOYBEAN MEAL BY SOLID-STATE FERMENTATION

อาทิตยาพันธุ์ กันนิกา¹ จันทิมา ทีชะ^{1,2} อภินันท์ วัลภา³ และ อัสฎาวุธ อารีสิริสุข^{1,2,*}

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปทุมธานี ประเทศไทย 12110

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพและนาโน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี ประเทศไทย 12110

³สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปทุมธานี ประเทศไทย 12110

Artitayapan Kannika¹, Jantima Teeka^{1,2} Apinan wanlapa³ and Atsawut Areesirisuk^{1,2,*}

¹Division of Biology, Faculty of Science and Technology Rajamangala University
of Technology Thanyaburi, Pathum Thani, 12110

²Center of Excellence in Nano-Biotechnology, Faculty of Science and Technology Rajamangala University
of Technology Thanyaburi, Pathum Thani, 12110

³Division of Food Engineering, Faculty of Engineering, Rajamangala University of Technology Thanyaburi,
Pathum Thani, 12110

*E-mail: atsawut_a@rmutt.ac.th

Received: 2019-05-01

Revised: 2019-06-29

Accepted: 2019-09-06

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะการเจริญที่เหมาะสมของโปรไบโอติก *Enterococcus faecium* A028 ในกากถั่วเหลือง (Soybean Meal, SBM) ด้วยกระบวนการหมักแบบแห้ง (Solid-State Fermentation, SSF) และเพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โดยคัดเลือกปัจจัยที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (PBD) และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง

(Response Surface Methodology) โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Benken Design (BBD) ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนน้ำต่อ SBM ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง และความเข้มข้นกากน้ำตาล เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total Viable Cell Count, TVC) สามอันดับแรก โดยมีค่า Effect contribution เท่ากับ 56.27% 14.32% และ 10.46% ตามลำดับ ปัจจัยดังกล่าวจึงถูกคัดเลือกไปศึกษาในระดับที่เหมาะสมต่อการเพิ่มค่า TVC ของแบคทีเรียใน SBM ปริมาณ 300 กรัม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ อัตราส่วนน้ำต่อ SBM เท่ากับ 1.5:1 (v/w) และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 15.45 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นกากน้ำตาลไม่มีผลต่อการเพิ่มค่า TVC อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยค่า TVC เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.91 LogCFU/g (24.30% ของ TVC เริ่มต้น) และมีค่า TVC สูงสุดเท่ากับ 9.77 LogCFU/g นอกจากนี้ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงแบบที่เรียบแบบ SSF ใน SBM ปริมาณ 3,000 กรัม ไม่แตกต่างจากระดับเริ่มต้น อย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} < 0.05$) และผลการเลียนแบบการเจริญพบว่าแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz สามารถเลียนแบบการเจริญเติบโตของ *E. faecium* ในการเพาะเลี้ยงแบบ SSF ได้เป็นอย่างดี (ค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.956-0.995) การวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า SBM เป็นวัสดุราคาถูกที่มีประสิทธิภาพที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติก *E. faecium* แบบ SSF ได้

คำสำคัญ: *Enterococcus faecium* กากถั่วเหลือง การหมักแบบแห้ง แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

ABSTRACT

The aims of this study were to optimize the growing condition of a probiotic strain *Enterococcus faecium* A028 in soybean meal (SBM) by solid-state fermentation (SSF) and to study the growth kinetics by the mathematical model. The important cultivation variables were selected according to the Plackett–Burman design (PBD) and were further optimized via response surface methodology. The statistical model was constructed by Box-Benken Design (BBD). The results revealed that the water to SBM ratio, incubation time, and molasses were the first-three important variables affected the increase of total viable cell count (TVC) with the effect contribution of 56.27%, 14.32%, and 10.46%, respectively. These three variables of optimization for growth were determined based on the increased TVC in 300 g of SBM. The optimal condition was 1.5:1 (v/w) of water to SBM ratio and 15.45 h of incubation time while the effect of molasses was not significant at 95% of the confidence interval. The TVC was increased significantly to 1.91 LogCFU/g (24.30% of initial TVC) and the maximum of TVC was 9.77 LogCFU/g. In addition, it was found that cultivation of

bacteria in 3,000 g of SBM by SSF was not significantly different from the initial scale (p-value < 0.05). Finally, the results of growth simulation were denoted that the Logistic model and modified Gompertz model could well simulate the growth of *E. faecium* by SSF (R^2 was in the range of 0.956-0.995). This research suggested that the SBM was an effective low-cost material that could be used for culturing probiotic *E. faecium* by SSF process.

Keywords: *Enterococcus faecium*, soybean meal, solid-state fermentation, mathematical model

บทนำ

ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก (Probiotic) ในการเพาะเลี้ยงสัตว์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากจุลินทรีย์ดังกล่าวความปลอดภัย และมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์ ช่วยรักษาสมดุลและควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารทำให้สัตว์สามารถดูดซึมอาหารได้ดีขึ้น (Gibson, 2004; Wirunpan et al., 2016) สัตว์ที่เพาะเลี้ยงจึงมีคุณภาพดีและจำหน่ายได้ในราคาสูง โดยจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์มีหลายชนิด เช่น *Lactobacillus lactis* *Lactobacillus plantarum* *Bifidobacterium longum* *Bacillus subtilis* และ *Enterococcus faecium* (Stiles and Holzapfel, 1997; Wirunpan et al., 2016; Faksakul et al., 2016) ซึ่งจากงานวิจัยของ Faksakul et al. (2016) รายงานว่า *E. faecium* A028 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารไก่ มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* *Aeromonas sp.* และ *Salmonella typhimurium* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการย่อยโปรตีน ทนต่อเกลือ น้ำดี และทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหารได้ ซึ่งดังกล่าวเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของโปรไบโอติก (Faksakul et al., 2016)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยการหมักแบบแห้ง (Solid-State Fermentation, SSF) เป็นกระบวนการที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยวัตถุดิบแห้งหรือมีความชื้นต่ำ เช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bifidobacterium animalis* *Lactobacillus casei* *Lactobacillus brevis* และ *Aspergillus oryzae* ใน ถั่วเหลือง (Gao et al., 2013; Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2015) การเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* ในข้าวโอ๊ต และการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. bulgaricus* ในรำข้าวสาลี (Zhao et al., 2017) เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน มีต้นทุนต่ำ และเกิดน้ำเสียจากกระบวนการหมักน้อย (Pandey, 2003) นอกจากนี้ความสามารถในการถ่ายเทออกซิเจนของกระบวนการ SSF ยังสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเหลว (Submerged Fermentation, SMF) (Couto and Sanromán, 2006) อีกด้วย และกระบวนการ SSF ยังได้รับความนิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตอาหารสัตว์

โดยมีรายงานว่ากระบวนการ SSF สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกสำหรับผลิตอาหารสุกร ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ SMF กระบวนการ SSF เป็นกระบวนการที่ให้ผลผลิตสูงกว่ากระบวนการ SMF ไม่ต้องกำจัดของเสียจากกระบวนการ และเป็นกระบวนการหมักที่คล้ายกับการเจริญของ จุลินทรีย์ทางธรรมชาติ (Shim et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีการนำวัตถุดิบเหลือทิ้งทางเกษตรและ อุตสาหกรรมเกษตร เช่น กากถั่วเหลือง กากถั่วเขียว รำข้าว และข้าวโอ๊ต มาใช้เป็นวัตถุดิบ ในการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกเพื่อลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงอีกด้วย (Zhang et al., 2014; Chi and Cho, 2016)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โปรไบโอติก *E. faecium* A028 ด้วยกระบวนการ SSF โดยใช้กากถั่วเหลือง (Soybean Meal, SBM) ซึ่งมีราคาถูกเป็นวัตถุดิบในกระบวนการเพาะเลี้ยง และเพื่อประยุกต์ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ในการเลียนแบบการเจริญของแบคทีเรียเพื่อศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการเพาะเลี้ยง แบบ SSF

วิธีการ

1. การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *E. faecium* A028 ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่ (Faksakul et al., 2016) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เก็บไว้ในตู้แช่เยือกแข็งที่ -80 องศาเซลเซียส ลงในอาหารเหลว De Man Rogosa and Sharpe (MRS) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการเจริญ จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 30 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 270 มิลลิลิตรอีกครั้ง เพาะเลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 18 ชั่วโมง และนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

2. การคัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของ *E. faecium* ใน SBM ด้วยกระบวนการ SSF

ถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ลงใน SBM ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการทดลองด้วยการแปรผันปัจจัย ทั้งหมด 7 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนของน้ำต่อกากถั่วเหลือง (X_1) อุณหภูมิ (X_2) ความเข้มข้นกาน้ำตาล (X_3) ปริมาณกล้าเชื้อ (X_4) ความเป็นกรดต่าง (X_5) แคลเซียมคาร์บอเนต (X_6) และเวลาในการ เพาะเลี้ยง (X_7) (ตารางที่ 1) เพื่อศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยต่อการเจริญเติบโตของ *E. faecium* ใน SBM โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett Burman Design (PBD) (Zhou et al., 2011) ดังตารางที่ 2 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total Viable Cell Count, TVC) ที่เพิ่มขึ้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม Design Expert Version 7.0 เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 และนำไปศึกษาระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยต่อไป

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *E. faecium* ใน SBM ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

ถ่ายกล้ำเชื้อ *E. faecium* A028 ลงใน SBM ที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยแปรผันปัจจัยที่มีสัดส่วนอิทธิพล (Effect Contribution) ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมากที่สุดจำนวน 3 ปัจจัย (จากผลการทดลองที่ 2) ได้แก่ อัตราส่วนของน้ำต่อกากถั่วเหลือง (X_1) ความเข้มข้นกากน้ำตาล (X_3) และเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (X_7) (ตารางที่ 3) โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Benken Design (BBD) (Ferreira et al., 2007) ดังตารางที่ 4 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่า TVC ที่เพิ่มขึ้น มาคำนวณค่าทางสถิติโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และสร้างความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษากับการเจริญของ *E. faecium* ด้วยสมการ Second-order Polynomial Quadratic Equation นำสมการที่ได้มาหาสภาวะที่เหมาะสมและทำการทดลองเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ในสภาวะดังกล่าวเพื่อทดสอบ (Validation) ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลต่อการเจริญของ *E. faecium* ด้วยกระบวนการ SSF ใน SBM โดยวางแผนการทดลองแบบ PBD

Variables	Units	Symbol Code	Level of Experimental Values	
			Low (-1)	High (+1)
Water to SBM ratio	v/w	X_1	0.1:1	1:1
Incubation Temperature	°C	X_2	30	40
Molasses	%w/v	X_3	0	5
Starter	%v/w	X_4	5	10
pH	-	X_5	5	6
CaCO ₃	%w/v	X_6	0	0.05
Incubation Time	h	X_7	4	12
Dummy	-	X_8, X_9, X_{10}, X_{11}	-1	1

ตารางที่ 2 แผนการทดลองแบบ PBD

Run	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}
1	1:1	40	0	10	6	0.05	4	-1.00	-1.00	1.00	-1.00
2	0.1:1	40	5	5	6	0.05	12	-1.00	-1.00	-1.00	1.00
3	1:1	30	5	10	5	0.05	12	1.00	-1.00	-1.00	-1.00
4	0.1:1	40	0	10	6	0	12	1.00	1.00	-1.00	-1.00
5	0.1:1	30	5	5	6	0.05	4	1.00	1.00	1.00	-1.00
6	0.1:1	30	0	10	5	0.05	12	-1.00	1.00	1.00	1.00
7	1:1	30	0	5	6	0	12	1.00	-1.00	1.00	1.00
8	1:1	40	0	5	5	0.05	12	1.00	1.00	-1.00	1.00
9	1:1	40	5	5	5	0	4	-1.00	1.00	1.00	-1.00
10	0.1:1	40	5	10	5	0	4	1.00	-1.00	1.00	1.00
11	1:1	30	5	10	6	0	4	-1.00	1.00	-1.00	1.00
12	0.1:1	30	0	5	5	0	4	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00

ตารางที่ 3 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลต่อการเจริญของ E. faecium ด้วยการหมักแบบ SSF ในกากถั่วเหลือง โดยแผนการทดลองแบบ BBD

Variables	Symbol code	Level of Experimental Values		
		Low (-1)	Central (0)	High (+1)
Water to SBM ratio	X_1	0.5	1.25	2
Molasses	X_3	0	2.5	5
Incubation Time	X_7	4	14	24

4. การศึกษาค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของ *E. faecium* ที่เพาะเลี้ยงใน SBM ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง (Experimental Data) ในสภาวะที่เหมาะสมมาคำนวณค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธีการหาเส้นโค้งที่เหมาะสม (Curve Fitting) โดยประยุกต์ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Gompertz (Modified Gompertz Model) (สมการที่ (1)) เพื่อหาค่าอัตราการผลิตชีวมวลสูงสุด (Maximum Biomass Productivity, $r_{\max}$) (Mu et al., 2007) และระยะเวลาพักตัว (Lag time, t) และใช้แบบจำลอง Logistic (สมการที่ (2) และ (3)) เพื่อหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (Maximum Specific Growth Rate, $\mu_{\max}$) (Zajšek and Goršek, 2010) โดยใช้ฟังก์ชัน (Function) Solver ในโปรแกรม Microsoft Excel (Version 2016) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination, R^2) ดังสมการที่ (4)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Gompertz (Modified Gompertz Model) (Mu et al., 2007) ที่ใช้ศึกษาค่า $r_{\max}$ และ t_L ของ *E. faecium* ที่เพาะเลี้ยงแบบ SSF ใน SBM แสดงดังสมการที่ (1)

$$X = X_0 \left[X_{\max} \cdot \exp \left[-\exp \left[\frac{r_{\max} \cdot \exp(1)}{X_{\max}} \right] (t_L - t) + 1 \right] \right] \quad (1)$$

เมื่อ X_0 คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ชั่วโมงเริ่มต้น (LogCFU/g)

$X_{\max}$ คือ จำนวนจุลินทรีย์สูงสุด (LogCFU/g)

$r_{\max}$ คือ อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สูงสุด (CFU/g·h)

t_L คือ ระยะเวลาพักตัว (h)

t คือ ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (h)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Logistic ที่ใช้ในการศึกษาค่า $\mu_{\max}$ ของ *E. faecium* ที่เพาะเลี้ยงแบบ SSF ใน SBM แสดงดังสมการที่ (2) และ (3)

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) X \quad (2)$$

$$X = \frac{X_0 \exp(\mu_{\max} \cdot t)}{1 - \left[\left(\frac{X_0}{X_{\max}} \right) (1 - \exp(\mu_{\max} \cdot t)) \right]} \quad (3)$$

เมื่อ X_0 คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ชั่วโมงเริ่มต้น (LogCFU/g)

$X_{\max}$ คือ จำนวนจุลินทรีย์สูงสุด (LogCFU/g)

$\mu_{\max}$ คือ อัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์สูงสุด (1/h)

t คือ เวลาในการเพาะเลี้ยง (h)

การคำนวณหาค่า R^2 (Borah et al., 2015) แสดงดังสมการที่ (4)

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (X_{\text{exp}} - X_{\text{expmean}})^2 - (X_{\text{pre}} - X_{\text{exp,i}})^2}{\sum_{i=1}^N (X_{\text{exp,i}} - X_{\text{expmean,i}})^2} \quad (4)$$

เมื่อ X_{exp} คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลอง (LogCFU/g)
 X_{expmean} คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลอง (LogCFU/g)
 X_{pre} คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่คำนวณจากแบบจำลอง (LogCFU/g)
 N คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

ตารางที่ 4 การวางแผนทดลองแบบ BBD

Treatment	X_1	X_3	X_7	Increased TVC* (LogCFU/g)
1	0.50 (-1)	0.00 (-1)	14.00 (0)	0.75
2	2.00 (+1)	0.00 (-1)	14.00 (0)	0.33
3	0.50 (-1)	5.00 (0)	14.00 (0)	0.66
4	2.00 (+1)	5.00 (0)	14.00 (0)	0.26
5	0.50 (-1)	2.50 (+1)	4.00 (-1)	0.45
6	2.00 (+1)	2.50 (+1)	4.00 (-1)	0.15
7	0.50 (-1)	2.50 (+1)	24.00 (+1)	0.54
8	2.00 (+1)	2.50 (+1)	24.00 (+1)	0.93
9	1.25 (0)	0.00 (-1)	4.00 (-1)	0.22
10	1.25 (0)	5.00 (0)	4.00 (-1)	0.18
11	1.25 (0)	0.00 (-1)	24.00 (+1)	0.18
12	1.25 (0)	5.00 (0)	24.00 (+1)	0.41

*TVC is total viable cell count

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการคัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของ *E. faecium* ใน SBM ด้วยกระบวนการ SSF

ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *E. faecium* ที่เพาะเลี้ยงแบบ SSF ใน SBM ด้วยการวางแผนการทดลองแบบ PBD ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 โดยพบว่า จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตใน SBM ได้ทุกสภาวะที่ทำการทดลอง และมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันในแต่ละสภาวะ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rodriguez de olmos ในปี 2015 ซึ่งศึกษาอิทธิพลของปัจจัยในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus paracasei* supsp. *paracasei* และ *B. longum* ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF ในถั่วเหลืองที่มีความชื้น 60 % พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโต และมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 9.5 และ 9.0 LogCFU/g ตามลำดับ (Rodríguez de Olmos et al., 2015) เมื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยต่อการเจริญเติบโตของ *E. faecium* โดยการวิเคราะห์การถดถอย (Regression Analysis) (ตารางที่ 5) พบว่าปัจจัยแต่ละชนิดส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ *E. faecium* ต่างกัน โดยระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (X_7) มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสูงที่สุด ซึ่งมีค่า Effect contribution เท่ากับ 56.27 % รองลงมาคือ ปริมาณน้ำต่อกากถั่วเหลือง (X_1) และความเข้มข้นกากน้ำตาล (X_3) โดยมีค่า Effect Contribution เท่ากับ 14.32 % และ 10.46 % ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 อิทธิพลของปัจจัยในการเพาะเลี้ยงแบบ SSF ต่อการเจริญเติบโตของ *E. Faecium*

Variable	Coefficients	Effect	Plot Effect	p-value	Effect Contribution (%)
Water:SBM	0.092	0.18		0.088	14.33
Incubation Temperature	0.062	0.12		0.205	6.48
Molasses	-0.078	0.16		0.127	10.46
Starter	-0.017	-0.03		0.704	0.47
pH	-0.018	-0.04		0.677	0.57
CaCO ₃	0.00003	0.01		0.908	0.043
Incubation Time	-0.18	-0.36		0.011	56.27

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า SBM สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยง *E. faecium* ด้วยกระบวนการ SSF ได้ เนื่องจาก SBM ประกอบด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยเฉพาะโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักใน SBM และยังมีปริมาณกรดอะมิโนไลซีนสูงช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Stefanello et al., 2016) ซึ่งแบคทีเรีย *E. faecium* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส (Protease) (Faksakul et al., 2016) จึงสามารถย่อยโปรตีนใน SBM เพื่อนำมาสร้างโปรตีนภายในเซลล์และการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของแบคทีเรีย (Wang et al., 2014) ดังนั้น SBM ที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองในโรงงานอุตสาหกรรมจึงเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกด้วยกระบวนการ SSF เนื่องจากสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี และมีราคาถูก

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาอิทธิพลของปริมาณน้ำต่อกากถั่วเหลือง อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นของกากน้ำตาล และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าปัจจัยดังกล่าวแสดงอิทธิพลในทางบวกต่อการเพิ่มค่า TVC ของแบคทีเรีย (Positive Effect) ซึ่งเมื่อปัจจัยดังกล่าวเพิ่มขึ้นจะส่งเสริมให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตมากขึ้นด้วย ในขณะที่ปริมาณกล้ำเชื้อ ความเป็นกรดต่าง และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง แสดงอิทธิพลในทางลบ (Negative effect) ต่อการเจริญของ *E. faecium* A028 (ตารางที่ 5)

ในปี 2003 Gervais and Molin รายงานว่าความชื้นมีความสำคัญต่อกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ SSF เนื่องจากน้ำทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายสารอาหารใน SBM ทำให้โปรไบโอติกสามารถดูดซึมสารอาหารและแร่ธาตุใน SBM มาใช้ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ได้ง่ายขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในกระบวนการ SSF จุลินทรีย์จึงมีการเจริญเติบโตได้มากขึ้น (Gervais and Molin, 2003) สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำต่อกากถั่วเหลืองแสดงอิทธิพลในทางบวกต่อการเจริญ *E. faecium* A028 เมื่อพิจารณาอิทธิพลของการเติมน้ำตาลใน SBM พบว่าการเติมน้ำตาลความเข้มข้น 5% ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้สูงขึ้นเล็กน้อยแสดงให้เห็นว่ากากน้ำตาลมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โปรไบโอติกใน SBM (Rigo et al., 2010) แต่มีอิทธิพลน้อยกว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงและปริมาณน้ำต่อกากถั่วเหลือง และผลการทดลองยังพบว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลในทางลบต่อการเจริญเติบโตเนื่องจากในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจะมีการสร้างกรดแลคติกขึ้นมา เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Heimer et al., 2015) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นจึงทำให้การเจริญของ *E. faecium* A028 ลดลงอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาอิทธิพลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ปริมาณกล้ำเชื้อ ความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ในระดับที่ทำการทดลอง พบว่าปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของโปรไบโอติกน้อย โดยมีค่า Contribution Effect เท่ากับ 6.48 0.47 0.57 และ 0.04 % ตามลำดับ

ดังนั้นจึงเลือก ปริมาณน้ำต้อกากั่วเหลือง ปริมาณกากน้ำตาล และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง มาศึกษาระดับที่เหมาะสมในการทดลองถัดไป

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *E. faecium* ใน SBM ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกใน SBM แสดงดังตารางที่ 5 และ 6 และความสัมพันธ์ระหว่างค่า TVC ที่เพิ่มขึ้น (Increased TVC) กับปัจจัยที่ศึกษาแสดงดังสมการที่ (5) ผลการทดลองพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง *E. faecium* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแบบจำลอง (Model) มีค่า P-value และ R^2 เท่ากับ 0.0012 และ 0.9457 ตามลำดับ และมีค่าความเข้ากันได้ของแบบจำลอง (Lack of Fit) เท่ากับ 0.2287 แสดงว่า Model นี้มีความเหมาะสมในการอธิบายการเพิ่มขึ้นของค่า TVC ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % อย่างไรก็ตามพบว่า ปริมาณน้ำต้อกากั่วเหลือง และ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง มีอิทธิพลต่อการเจริญของแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ α เท่ากับ 0.05 (P-value เท่ากับ 0.0229 และ 0.0007 ตามลำดับ) ในขณะที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงที่ทำการทดลอง (P-value เท่ากับ 1.000) (ตารางที่ 6)

รูปที่ 1(A) แสดงพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface) ของอิทธิพลร่วม (Interaction Effect) ระหว่างปริมาณน้ำต้อกากั่วเหลืองและความเข้มข้นของกากน้ำตาลเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 14 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงว่าปริมาณน้ำต้อกากั่วเหลืองส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียมากกว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาล รูปที่ 1(B) แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปริมาณน้ำต้อกากั่วเหลืองและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 2.5% โดยปัจจัยทั้งสองชนิดส่งผลต่อการเจริญของโปรไบโอติก และรูปที่ 1(C) แสดงอิทธิพลร่วมของความเข้มข้นของกากน้ำตาลและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง พบว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการเจริญเติบโตมากกว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาล

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ของผลการทดลอง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-value
Model	0.5875	9	0.0653	13.5369	0.0012
X_1	0.0406	1	0.0406	8.4221	0.0229
X_3	0.0000	1	0.0000	0.0000	1.0000
X_7	0.1596	1	0.1596	33.0999	0.0007
$X_1 X_3$	0.0182	1	0.0182	3.7794	0.0930
$X_1 X_7$	0.0081	1	0.0081	1.6798	0.2361
$X_3 X_7$	0.0110	1	0.0110	2.2863	0.1743
X_1^2	0.2345	1	0.2345	48.6318	0.0002
X_3^2	0.0091	1	0.0091	1.8880	0.2118
X_7^2	0.0960	1	0.0960	19.9090	0.0029
Residual	0.0338	7	0.0048		
Lack of Fit	0.0211	3	0.0070	2.2161	0.2287
Pure Error	0.0127	4	0.0032		
Correlation total	0.6200	16			

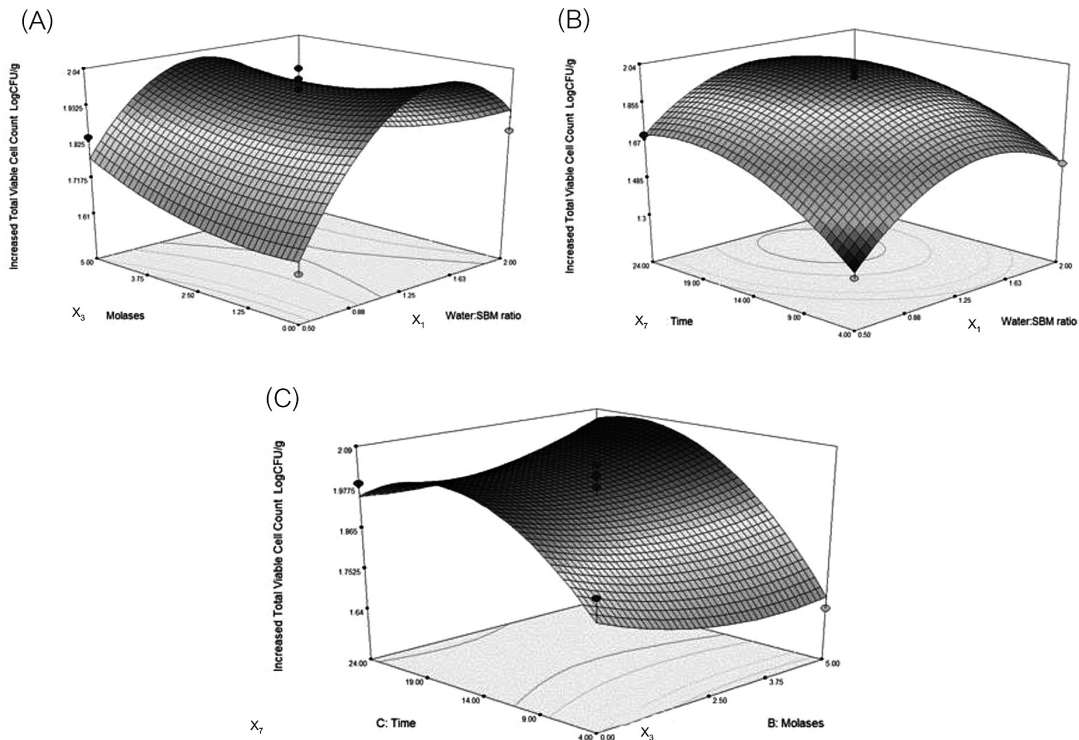
$$R^2 = 0.9457$$

$$\text{Increased TVC (LogCFU/g)} = 0.606 + 1.317X_1 + 0.058X_7 - 0.419X_1^2 - 1.510X_7^2 \quad (5)$$

เมื่อ X_1 คือ ปริมาณน้ำตอกากถั่วเหลือง (% v/w)

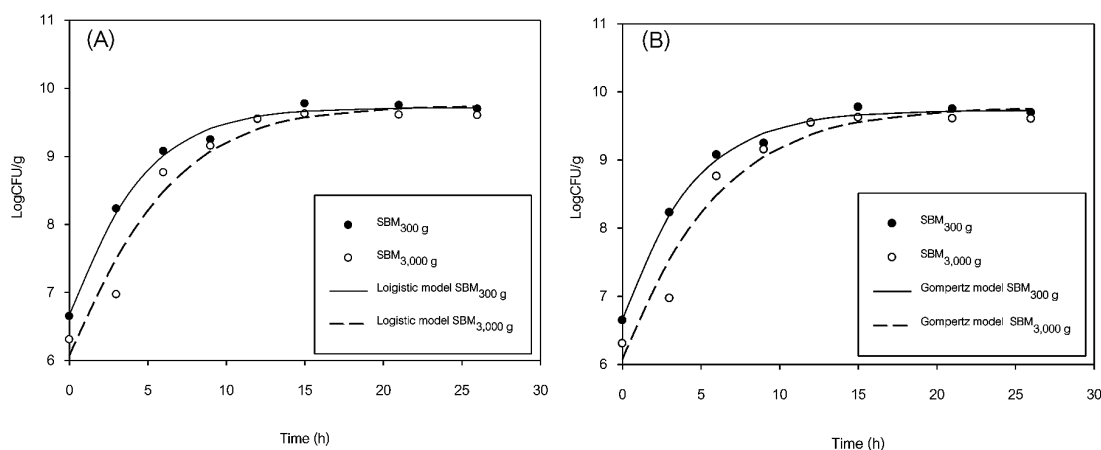
X_3 คือ ความเข้มข้นกากน้ำตาล (%)

X_7 คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (h)



รูปที่ 1 (A) อิทธิพลร่วมของปริมาณน้ำต่อกากถั่วเหลืองและกากน้ำตาล (B) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงและปริมาณน้ำต่อกากถั่วเหลือง และ (C) ความเข้มข้นของกากน้ำตาลและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

จากสมการที่ (5) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มค่า TVC ของโปรไบโอติกคือ ปริมาณน้ำต่อกากถั่วเหลือง เท่ากับ 1.5:1 v/w ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนาน 15.45 ชั่วโมง โดยจะมีค่า TVC เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.91 LogCFU/g (Predicted Result) จากจำนวนจุลินทรีย์ เริ่มต้น เมื่อนำสภาวะดังกล่าวมาทดลองเพาะเลี้ยง *E. faecium* ด้วยการหมักแบบ SSF ใน SBM เพื่อทดสอบผลการทดลอง (Validation) พบว่า มีค่า TVC เพิ่มขึ้นเท่ากับ 9.77 LogCFU/g (Experimented Result) ซึ่งไม่แตกต่างจากผลการทดลองที่ได้จากสมการที่ (5) อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่าสมการที่ (5) มีประสิทธิภาพในการอธิบายอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาได้อย่างเหมาะสมที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 2 (A) การเลียนแบบการเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ด้วยแบบหูน Logistic และ (B) แบบหูนประยุกต์ของ Gompertz ในการเพาะเลี้ยงระดับเริ่มต้นและระดับขยายขนาด

3. การเพาะเลี้ยง *E. faecium* แบบ SSF ในระดับขยายขนาด และการเลียนแบบการเจริญเติบโต

ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *E. faecium* A028 ในระดับขยายขนาดซึ่งใช้ SBM จำนวน 3,000 กรัม (SBM_{3,000g}) แสดงดังรูปที่ 2 พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้โดยมีค่า TVC เท่ากับ 9.66 LogCFU/g ซึ่งใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในระดับเริ่มต้น (SBM_{300g}) ซึ่งมีค่า TVC เท่ากับ 9.77 LogCFU/g และเมื่อทำการเลียนแบบ (Simulation) การเจริญของ *E. faecium* A028 ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบ Logistic และแบบ Gompertz พบว่าแบบจำลองทั้งสองแบบสามารถเลียนแบบการเจริญของโปรไบโอติกได้อย่างเหมาะสม (รูปที่ 2(A) และ 2(B)) โดยให้ค่า R^2 มากกว่า 0.95 (ตารางที่ 6) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของแบคทีเรียจากแบบจำลอง Logistic (ตารางที่ 7) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในระดับเริ่มต้น และระดับขยายขนาด จะมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.295 1/h และ 0.234 1/h ตามลำดับ ในขณะที่ค่า r_{max} ซึ่งได้จากแบบจำลอง Gompertz เมื่อเพาะเลี้ยงในระดับเริ่มต้นและระดับขยายขนาด มีค่าเท่ากับ 0.948 LogCFU/g h และ 0.726 LogCFU/g h ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับขนาดเริ่มต้น อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงในระดับเริ่มต้นและระดับขยายขนาดให้ค่า TVC ใกล้เคียงกัน และงานวิจัยนี้ยังสามารถพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบ SSF โดยไม่ใช้กากน้ำตาล และใช้กากข้าวเพียง 1% v/w เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Sirayaporn et al. (2017) ซึ่งใช้กากน้ำตาล 5%w/v และกากข้าว 5%v/w แต่ได้ค่า TVC ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 8) จากงานวิจัยนี้พบว่า SBM สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกได้ใกล้เคียงกับวัตถุดิบชนิดอื่น ๆ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบ SSF ด้วย SBM ในการศึกษานี้จึงสามารถนำไปพัฒนาระบบการผลิตโปรไบโอติกสำหรับจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ได้

ตารางที่ 7 ค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของ *E. faecium* A028 ที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

Parameters	Logistic model		Gompertz model	
	SBM _{300g}	SBM _{3,000g}	SBM _{300g}	SBM _{3,000g}
X_0 (LogCFU/g)	6.671	6.075	6.661	6.078
X_{max} (LogCFU/g)	9.714	9.744	9.730	9.777
μ_{max} (1/h)	0.295	0.234	NC	NC
r_{max} (LogCFU/g h)	NC	NC	0.948	0.726
t_L (h)	NC	NC	0.000	0.000
R^2	0.994	0.962	0.995	0.956

NC =Not calculated

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกแบบ SSF

Raw materials	Microorganisms	TVC* (LogCFU/g)	References
Oats	<i>L. plantarum</i>	9.45	(Zhang et al., 2015)
	<i>Bifidobacterium animalis</i>	8.50	
Soy	<i>L. paracasei</i> supsp. <i>paracasei</i>	9.50	(Rodríguez de Olmos et al., 2015)
	<i>B. longum</i>	9.00	
Wheat	<i>Lactobacillus reuteri</i>	9.00	(Ayyash et al., 2019)
	<i>L. plantarum</i>	8.50	
Soybean meal	<i>E. faecium</i> (SBM _{300g})	9.82	(Sirayaporn et al., 2017)
	<i>E. faecium</i> (SBM _{3,000g})	9.77	
Soybean meal	<i>E. faecium</i> (SBM _{300g})	9.77	This study
	<i>E. faecium</i> (SBM _{3,000g})	9.66	This study

*TVC is total viable cell count

สรุป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของโปรไบโอติก *E. faecium* ด้วยแผนการทดลองแบบ BBD พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ การใช้ปริมาณน้ำต่อกากถั่วเหลือง เท่ากับ 1.5:1 v/w และเพาะเลี้ยงนาน 15.45 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียมีค่า TVC เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.91 LogCFU/g (24.30% ของ TVC เริ่มต้น) และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเท่ากับ 9.77 LogCFU/g นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระดับขยายขนาดยังมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในระดับเริ่มต้น และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Logistic และ Gompertz สามารถใช้ในการเลียนแบบการเจริญของโปรไบโอติกได้เป็นอย่างดี โดยมีค่า R^2 มากกว่า 0.95 และจากการศึกษาทั้งหมดพบว่าสามารถประยุกต์ใช้ SBM ซึ่งเป็นวัตถุดิบราคาถูกในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. faecium* แบบ SSF เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกองทุนส่งเสริมงานวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ประจำปีงบประมาณ 2560 และขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ตลอดการทำวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Ayyash, M., Johnson, S.K., Liu, S.-Q., Mesmari, N., Dahmani, S., Al Dhaheri, A.S., & Kizhakkayil, J. (2019). In vitro investigation of bioactivities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat using *Lactobacillus* spp. **Food Chemistry**. 275, 50–58.
- Borah, A., Hazarika, K. & Khayer, S.M. (2015). Drying kinetics of whole and sliced turmeric rhizomes (*Curcuma longa* L.) in a solar conduction dryer. **Information Processing in Agriculture**. 2, 85–92.
- Chi, C.-H. & Cho, S.-J. (2016). Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT- Food Science and Technology**. 68, 619–625.
- Couto, S.R. & Sanromán, M.Á. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**. 76, 291–302.

- Faksakul, S., Boonpan, A., Teeka, J. & Areesirisuk, A. (2016). *In vitro* probiotic properties of screened lactic acid bacteria from chicken gastrointestinal tract. in **Proceeding of 8th Science Research Conference. Payao University.**15–21.(in Thai)
- Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., et al. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta.** 597, 179–186.
- Gao, Y., Wang, C., Zhu, Q. & Qian, G. (2013). Optimization of solid-state fermentation with *Lactobacillus brevis* and *Aspergillus oryzae* for trypsin inhibitor degradation in soybean meal. **Journal of Integrative Agriculture.** 12, 869–876.
- Gervais, P. & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** 13, 85–101.
- Gibson, G.R. (2004). Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements.** 1, 25–31.
- Heimer, S.R., Morrison, D. & Gilmore, M.S. (2015). Chapter 39 - **The Enterococci.** In **molecular medical microbiology (second edition)**, Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, and J. Schwartzman, eds. (Boston: Academic Press).
- Mu, Y., Yu, H.Q. & Wang, G. (2007). A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process. **Water Research.** 41, 1152–1160.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** 13, 81–84.
- Rigo, E., Ninow, J.L., Di Luccio, M., Oliveira, J.V., Polloni, A.E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., de Oliveira, D. & Treichel, H. (2010). Lipase production by solid-state fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT- Food Science and Technology.** 43, 1132–1137.
- Rodríguez de Olmos, A., Bru, E. & Garro, M.S. (2015). Optimization of fermentation parameters to study the behavior of selected lactic cultures on soy solid state fermentation. **International Journal of Food Microbiology.** 196, 16–23.
- Shim, Y.H., Shinde, P.L., Choi, J.Y., Kim, J.S., Seo, D.K., Pak, J.I., Chae, B.J. & Kwon, I.K. (2010). Evaluation of multi-microbial probiotics produced by submerged liquid and solid substrate fermentation methods in broilers. **Asian-Australas. Journal of Animal Science.** 23, 521–529.

- Stefanello, C., Vieira, S.L., Rios, H.V., Simões, C.T. & Sorbara, J.O.B. (2016). Energy and nutrient utilisation of broilers fed soybean meal from two different Brazilian production areas with an exogenous protease. **Animal Feed Science and Technology**. 221, 267–273.
- Stiles, M.E. & Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**. 36, 1–29.
- Wang, Y., Liu, X.T., Wang, H.L., Li, D.F., Piao, X.S. & Lu, W.Q. (2014). Optimization of processing conditions for solid-state fermented soybean meal and its effects on growth performance and nutrient digestibility of weanling pigs. **Livestock Science**. 170, 91–99.
- Wirunpan, M., Savedboworn, W. & Wanchaitanawong, P. (2016). Survival and shelf life of *Lactobacillus lactis* 1464 in shrimp feed pellet after fluidized bed drying. **Agriculture and Natural Resources**. 50, 1–7.
- Zajšek, K. & Goršek, A. (2010). Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora. **Food and Bioproducts Processing**. 88, 55–60.
- Zhang, N., Li, D., Zhang, X., Shi, Y. & Wang, H. (2015). Solid-state fermentation of whole oats to yield a synbiotic food rich in lactic acid bacteria and prebiotics. **Food Function**. 6, 2620–2625.
- Zhang, S., Shi, Y., Zhang, S., Shang, W., Gao, X. & Wang, H. (2014). Whole soybean as probiotic lactic acid bacteria carrier food in solid-state fermentation. **Food Control**. 41, 1–6.
- Zhao, H.M., Guo, X.N. & Zhu, K.X. (2017). Impact of solid state fermentation on nutritional, physical and flavor properties of wheat bran. **Food Chemistry**. 217, 28–36.
- Zhou, J., Yu, X., Ding, C., Wang, Z., Zhou, Q., Pao, H. & Cai, W. (2011). Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology. **Journal of Environmental Sciences**. 23, 22–30.

.....