

Received: November 14, 2024; Revised: November 15, 2024; Accepted: December 6, 2024

การปรับปรุงคุณภาพทางโภชนาการของกากถั่วเหลืองจากการหมักแบบแห้ง (Solid-state fermentation) ด้วยแบคทีเรียชนิด *Bacillus coagulans* และเอนไซม์โบรมิเลนจาก
สับปะรดเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารปลานิล

Improvement of nutritional quality of soybean meal by microbial solid-state fermentation with *Bacillus coagulans* and bromelain extract from pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) as feed ingredient for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ทรงทรัพย์ อรุณกมล¹ สุธี วงศ์มณีประทีป¹ ปิ่นสุรางค์ ดิวงษ์² และบัณฑิต ยวงสร้อย^{1*}
Songsut Arungamol¹, Sutee Wongmaneeprateep¹, Pinsurang Deevong²
and Bundit Yuangsoi^{1*}

¹คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

¹Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen Province

²คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

²Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok

*Corresponding Author E-mail Address : bundyu@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การปรับปรุงคุณภาพทางโภชนาการของกากถั่วเหลืองในการศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีของกากถั่วเหลือง 2 วิธี คือการปรับปรุงคุณภาพโดยใช้ *Bacillus coagulans* หมักแบบแห้งบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation) ที่ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเชื้อ 10^7 cfu/ml อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ 48 ชั่วโมง และการปรับปรุงคุณภาพโดยการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (Pre-digestion) จากน้ำคั้นสับปะรดที่มีกิจกรรมเอนไซม์ที่ $4,925.30 \pm 445.26$ CDU/ml ที่ 90 นาที จากการศึกษา พบว่า ปริมาณโปรตีนจากกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. coagulans* มีโปรตีนเพิ่มสูงสุด คือมีปริมาณโปรตีน 51.67 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินลดลง โดยมีปริมาณน้อยที่สุด 1.39 ± 1.12 mg/g โดยมีความแตกต่างในทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกากถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ ส่วนคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยโบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรดมีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 157.75 ± 1.13 mg GAE/100g และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH 34.1 ± 2.69 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนด้วยเทคนิค In vitro protein digestibility พบว่า กากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. coagulans* มีประสิทธิภาพการย่อยของโปรตีนสูงสุดโดยมีค่า 3.48 ± 1.85 μ mol DL-Alanine/100 μ g และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดการทดลองอื่น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การปรับปรุงคุณภาพกากถั่วเหลืองด้วยวิธีการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. coagulans* ส่งผลให้สารต้านโภชนะที่พบในกากถั่วเหลืองลดลง และประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนดีขึ้น ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตอาหารปลานิลได้

คำสำคัญ: กากถั่วเหลือง *Bacillus coagulans* โบรมิเลน การหมัก

Abstract

This study investigated the enhancement of soybean meal nutritional quality through a comparative analysis of chemical properties utilizing two distinct methods. The first method involved solid-state fermentation of soybean meal using *Bacillus coagulans* at 50% moisture content, 10^7 cfu/ml inoculum concentration, and 40°C for 48 hours. The second method focused on the quality improvement using bromelain decomposition where soybean meal was pre-digested for 90 minutes using pineapple juice containing the enzyme activity of $4,925.30 \pm 445.26$ CDU/ml. The results showed that fermented soybean meal with *B. coagulans* obtained the highest protein content at 51.67%. Trypsin inhibitor level in the fermented soybean meal was significantly reduced to 1.39 ± 1.12 mg/g ($p < 0.05$) compared to the control group. Antioxidant properties were also evaluated, with bromelain-digested soybean meal exhibited the highest antioxidant capacity. Phenolic compound content was at 157.75 ± 1.13 mg GAE/100 g, while antioxidant activity assessed by the DPPH method was $34.1 \pm 2.69\%$. In vitro protein digestibility revealed that fermented soybean meal with *B. coagulans* had the highest protein digestibility at 3.48 ± 1.85 mol DL-Alanine/100 μ g, suggested significant difference ($p < 0.05$) from other experimental groups. This study demonstrates that *B. coagulans* solid-state fermentation improves soybean meal quality while reducing antinutritional factors, potentially enhancing its suitability for tilapia feed formulation.

Keywords: Soybean meal, *Bacillus coagulans*, Bromelain, Fermentation

บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบันเป็นอุตสาหกรรมที่มีการเติบโตอย่างก้าวกระโดดจากความต้องการบริโภคของประชากรโลก เมื่อพิจารณาจากแนวโน้มปริมาณการผลิตสัตว์น้ำทั้งหมดของโลกในปี 2020 ที่มีปริมาณเท่ากับ 87.5 ล้านตัน ที่มีปริมาณการผลิตเพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า จากค่าเฉลี่ยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990-1999 ที่มีปริมาณการผลิตเท่ากับ 21.8 ล้านตัน (FAO, 2022) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาที่มีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายซึ่งมีปริมาณการผลิตสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีปริมาณการผลิตทั้งหมดประมาณ 4.5 ล้านตันจากการเพาะเลี้ยงในปี 2020 (FAO, 2021) อย่างไรก็ตามปัญหาที่สำคัญในด้านการผลิตสัตว์น้ำในปัจจุบันและอนาคต คือปัญหาด้านต้นทุนค่าอาหารสัตว์น้ำ โดยมีต้นทุนด้านค่าอาหารไม่ต่ำกว่าร้อยละ 60-70 ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด (สิทธิชัย และคณะ, 2563; ณัฏฐ์ธินัน และช่อพกา, 2564; Sirikasemsuk et al., 2023) ซึ่งแหล่งโปรตีนหลักที่อยู่ในอาหารสัตว์น้ำคือปลาป่นที่พบว่า มีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานการผลิตที่พบว่า มีการผลิตลดลงอย่างต่อเนื่องจากรายงานของ Murthy et al. (2023) พบว่า แนวโน้มจากการใช้ปลาป่นในการผลิตสัตว์เพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์ทั่วโลกมีแนวโน้มการผลิตลดลงอย่างต่อเนื่องโดยในช่วงปี 2001-2010 ปริมาณการผลิตปลาป่นอยู่ที่ปีละ 5.5 ล้านตัน และในช่วงปี 2011-2020 มีปริมาณการผลิตลดลงเหลือปีละประมาณ 5.0 ล้านตัน ซึ่งสวนทางกับราคาของปลาป่นที่มีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง

ดังนั้นการหาวัตถุดิบอาหารสัตว์เพื่อลดปริมาณการใช้ปลาป่นในสูตรอาหารเป็นสิ่งสำคัญในการลดต้นทุนด้านการผลิตสัตว์น้ำ และแก้ไขปัญหาลดลงของปลาป่นในอนาคต ซึ่งปัจจุบันนักวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นการศึกษาการใช้โปรตีนจากกากถั่วเหลืองเพื่อทดแทนปลาป่นในอาหารสัตว์น้ำ แต่อย่างไรก็ตามกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพสูงซึ่งมีข้อจำกัดในปริมาณการใช้เนื่องจากกากถั่วเหลืองมีสารต้านโภชนาการที่ลดการดูดซึม และการใช้ประโยชน์จากอาหารที่กิน เช่น สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin inhibitor) เลคติน (Lectin) และกรดไฟติก (Phytic acid) เป็นต้น การปรับปรุงคุณภาพกากถั่วเหลืองก่อนนำไปเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งของการใช้กากถั่วเหลืองเป็นอาหารสัตว์น้ำ การนำกากถั่วเหลืองย่อยด้วย

เอนไซม์จากผลไม้หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรบางชนิด เช่น เอนไซม์โบรมิเลนที่ได้จากสับปะรด หรือกากสับปะรด และเอนไซม์ปาเปนจากมะละกอ โดยเอนไซม์โบรมิเลนและเอนไซม์ปาเปน เป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสจึงมีความสามารถในการตัดพันธะเพปไทด์ ซึ่งเป็นพันธะเคมีที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนในโปรตีน เมื่อพันธะเพปไทด์ถูกตัด โปรตีนจะถูกแยกออกเป็นโพลีเปปไทด์ หรือกรดอะมิโนสายสั้น ๆ (ทรงทรัพย์ และคณะ, 2561; Hamid et al., 2022) การปรับปรุงคุณภาพกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์จากธรรมชาติเหล่านี้เป็นวิธีการปรับปรุงคุณภาพที่สามารถทำได้ง่าย และประหยัดต้นทุนการผลิต นอกจากการใช้เอนไซม์จากผลไม้ การนำกากถั่วเหลืองหมักด้วยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ก็สามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพกากถั่วเหลืองได้เช่นเดียวกัน จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในกระบวนการดังกล่าว เช่น แบคทีเรียชนิด *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Pediococcus acidilactic* หรือยีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida utilis* รวมถึงการหมักด้วยเชื้อราชนิด *Aspergillus oryzae* (Kim et al., 2009; Zhou et al., 2011; Ding et al., 2015; Shiu et al., 2015; Lee et al., 2016; Sharawy et al., 2016; Wang et al., 2016) ซึ่งจากรายงานการวิจัย พบว่า การหมักสามารถย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็ก และสามารถลดปริมาณสารต้านโภชนาที่มีอยู่ในกากถั่วเหลืองได้ดี จากข้อมูลเบื้องต้นในการปรับปรุงคุณภาพกากถั่วเหลืองก่อนนำไปใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์เป็นอีกวิธีการในการใช้ประโยชน์จากโปรตีนที่ได้จากพืช และเป็นแนวทางในการลดการใช้ปลาป่นในอาหารสัตว์ (วราพันธุ์ และคณะ, 2547; ทรงทรัพย์ และคณะ, 2561)

ดังนั้นในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการปรับปรุงคุณภาพกากถั่วเหลือง 2 วิธี คือการหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *B. coagulans* และการใช้เอนไซม์โบรมิเลนจากสับปะรด โดยพิจารณาจากคุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกากถั่วเหลืองที่ได้จากการหมักทั้ง 2 วิธี การหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *B. coagulans* ใช้วิธีการหมักแบบแห้งบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation) โดยเชื้อ *B. coagulans* เป็นแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงตั้งแต่ 30 ถึง 55 องศาเซลเซียส และทนความเค็มได้ดี (Yadav and Yadav, 2003) และสามารถผลิตสารที่มีชื่อว่า Coagulin ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่นได้ (Sharifi et al., 2021) นอกจากนั้นแล้วยังสามารถสร้างกรดแลคติกและสร้างเอนไซม์ Protease ที่สามารถย่อยโปรตีนที่เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ รวมถึงสามารถใช้เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกได้อีกด้วย (Mukherjee et al., 2016; Zhang et al., 2021) การปรับปรุงคุณภาพกากถั่วเหลืองดังกล่าวมีจุดประสงค์เพื่อนำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงแล้วมาใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักในอาหารปลานิล ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบถึงความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบทางเลือกอื่น ๆ มาทดแทนปลาป่นในอาหารสัตว์น้ำ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การปรับปรุงคุณภาพกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบอาหารปลานิล

ศึกษาวิธีการและรูปแบบการหมักกากถั่วเหลือง 2 วิธีดังนี้

1.1 การหมักกากถั่วเหลืองด้วยวิธีการหมักแบบแห้งบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation) โดยใช้เชื้อ *B. coagulans* โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Kim et al. (2009); Ding et al. (2015); Shiu et al. (2015) และ Wang et al. (2016) โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นสายพันธุ์แยกได้จากถั่วเน่า โดยได้รับเชื้อจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จังหวัดปทุมธานี ที่เชื้อความเข้มข้นประมาณ 1×10^7 cfu/ml ทำการหมักกากถั่วเหลือง อัตราส่วนเชื้อแบคทีเรีย 1 ส่วน และกากถั่วเหลืองบดที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว 2 ส่วน ความชื้นในการหมัก 50 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย และค่า pH ทุก 12 ชั่วโมง เพื่อเป็นการยืนยันการคงอยู่ของแบคทีเรียที่ใช้ในการหมัก หลังจากครบเวลาที่กำหนดแล้ว นำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องอบลมร้อนให้ความชื้นต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และเก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

1.2 การย่อยกากถั่วเหลือง โดยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด (Pre-digestion) ดัดแปลงวิธีการจาก ทรงทรัพย์ และคณะ (2561) และ วราพันธุ์ และคณะ (2547) โดยใช้สับปะรดสายพันธุ์ภูเก็ต ซึ่งจากการศึกษาขั้นต้นพบว่า มีปริมาณ Bromelain activity ประมาณ $4,925.30 \pm 445.26$ Casein Digestion Unit/ml โดยนำน้ำคั้นสับปะรดมาผสมโดยคลุกเคล้ากับกากถั่วเหลือง ให้ทั่วภายในภาชนะ ในสภาพที่ปลอดเชื้อ โดยใช้อัตราส่วนกากถั่วเหลือง 1 ส่วนต่อน้ำคั้นสับปะรด 2 ส่วน เป็นเวลา 90 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วนำกากถั่วเหลืองดังกล่าวไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้ความชื้นต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และเก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และปริมาณกรดอะมิโนของกากถั่วเหลืองหมัก

นำกากถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพทั้ง 2 วิธีข้างต้น เปรียบเทียบกับกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และความชื้น ตามวิธีของ AOAC (1990) และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน โดย Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) ตามวิธีการของ GB/T 18246-2000 โดยบริษัท National Feed Product Quality Supervision and Inspection Center กรุงปักกิ่ง ประเทศจีน

3. ศึกษาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin inhibitor)

ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินของกากถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านการหมัก และถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักทั้ง 2 วิธีข้างต้น วิเคราะห์ปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน โดยการดัดแปลงวิธีการจาก Kumar et al. (2019) ซึ่งใช้ BAPNA (Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide Hydrochloride) เป็นซับสเตรท วัดโดยการให้ Trypsin inhibitor ในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับทริปซิน หลังจากนั้นใช้ BAPNA เป็นซับสเตรทเพื่อใช้ในการวัดทริปซินที่เหลือจากปฏิกิริยาโดยใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

4. วิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant properties)

วิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีการของสุริยา และประสพอร (2559) โดยเตรียมตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก และกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพทั้ง 2 วิธีข้างต้นปริมาณ 10 กรัม เติมน้ำเมทานอลปริมาตร 300 มิลลิลิตร และสกัดสารออกฤทธิ์แบบไหลย้อนกลับ (Reflux) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที นำของเหลวที่ได้นำไปประเหยแห้งด้วย Water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำไป Freeze dryer จนได้สารสกัดแห้งและนำไปวิเคราะห์ต่อไป

4.1 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content)

ทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric เทียบกับสารมาตรฐานของกรดแกลลิก โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg of Gallic acid equivalent/g extract)

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay)

ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีวิธีการคือ นำสารสกัดกากถั่วเหลืองหมักจากการเตรียมข้างต้นละลายใน DPPH และบ่มในที่มืด 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็น blank และใช้วิตามินซีเป็นสารละลายมาตรฐาน

5. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในหลอดทดลอง (In vitro protein digestibility) ของปลานิล

การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนจากกากถั่วเหลืองหมักของปลานิลในหลอดทดลอง โดยใช้ปลานิลขนาดประมาณ 35 กรัม เก็บตัวอย่างลำไส้ทั้งหมดของปลานิลใส่ ในหลอดทดลอง จำนวน 3 กรัม เติมน้ำ Tris HCl pH 8.2 อัตราส่วน 1:3 w/v บดด้วยเครื่อง Homogenizer จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และเก็บเอนไซม์สกัด (Crude enzyme extract) ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองประสิทธิภาพการย่อยของโปรตีนในหลอดทดลองต่อไป

ศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน ตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen et al. (2006) จากเอนไซม์สกัดโดยใช้ N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) เป็นซับสเตรท ที่ละลายใน 0.2 M Tris-HCl buffer pH 8.4 ในสารละลายของ 5% dimethylformamide และใช้เอนไซม์สกัด 10 ไมโครลิตร ที่ 50 องศาเซลเซียส วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Double-Beam Spectrophotometer, Hitachi UH5300 ที่ 410 นาโนเมตร และอ่านค่าการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสง (Absorbance) ทุก 10 วินาที เป็นเวลา 90 วินาที หลังจากนั้นสร้างกราฟค่าการดูดกลืนแสง

หาความชัน (Slope) นำค่าความชันที่ได้มาเทียบกราฟมาตรฐานของ p-nitroaniline โดยค่าเอนไซม์ที่พบในชิ้นที่ได้แสดงหน่วยเป็น μmol p-nitroaniline ที่เกิดขึ้นต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีน

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเอนไซม์สกัดจากข้างต้น ด้วยวิธี Bradford protein assay โดยชุดทดสอบ Bio-Rad protein assay เริ่มจากการเจือจาง Coomassie Blue G-250 1 ส่วนในน้ำที่ปราศจากไอออน (Deionized water) 4 ส่วน เทียบกับมาตรฐานของโปรตีนโดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นกราฟมาตรฐานแปลค่า Protein content โดยใช้หน่วย mg/ml

ทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยของโปรตีนในหลอดทดลอง โดยดัดแปลงวิธีการจาก Rungruangsak-Torrissen et al. (2006) โดยซึ่งวัตถุดิบคือกากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ *B. coagulans* กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน จากนั้นคั้นสับปะรด และกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพที่ทราบระดับโปรตีน โดยซึ่งตามระดับโปรตีนที่ปลาต้องการ คือ ระดับโปรตีนที่ปลานิขนาด 35 กรัม ซึ่งวัตถุดิบแต่ละชนิดตามปริมาณโปรตีนที่กำหนดผสมกับ 10 mM phosphate buffer (pH8) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะชนิด Chloramphenicol 100 ไมโครลิตรใน 96% Ethanol เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์สกัด 500 ไมโครลิตร นำไปเขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์สกัดย่อยกากถั่วเหลืองหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที วัดค่า Free amino group จากการย่อยด้วย Trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DL-Alanine และค่าที่ได้แสดงเป็น μmol DL-Alanine equivalent feed per trypsin activity

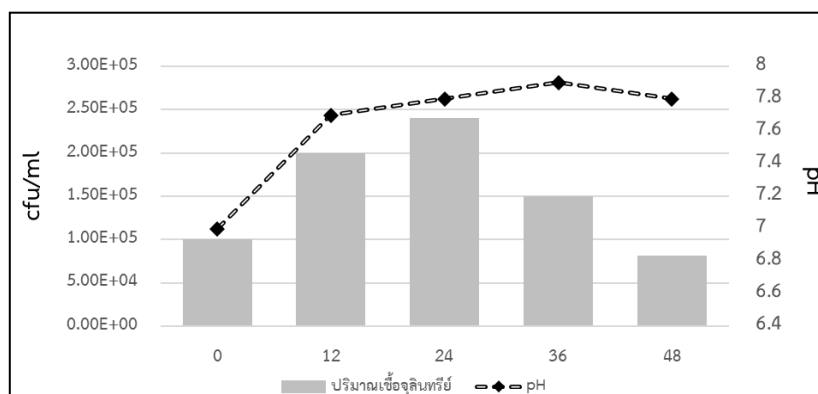
6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบข้อมูลทุกการวิเคราะห์ในแต่ละชุดทดลอง และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variances) เปรียบเทียบความต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SAS

ผลการวิจัย

1. องค์ประกอบทางเคมีในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ

จากการปรับปรุงคุณภาพกากถั่วเหลืองด้วยวิธีต่าง ๆ ด้วยการหมักกากถั่วเหลืองด้วยแบคทีเรีย *B. coagulans* แบบแห้งบนอาหารแข็ง โดยมีปริมาณเชื้อ 1.3×10^7 cfu/ml ในสารละลาย โดยใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อนำสารละลายเชื้อดังกล่าวมาหมักกากถั่วเหลือง พบว่า เชื้อที่เจริญเริ่มต้นในกากถั่วเหลืองมีปริมาณ 1.04×10^5 cfu/ml พบว่าเมื่อผ่านไป 12 ชั่วโมง พบปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 2.01×10^5 cfu/ml เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่า มีปริมาณเชื้อ *B. coagulans* สูงสุดคือมีปริมาณ 2.44×10^5 cfu/ml และปริมาณเชื้อแบคทีเรียจะลดปริมาณลงเหลือ 1.52×10^5 และ 8.08×10^4 cfu/ml ที่ชั่วโมงที่ 36 และ 48 ตามลำดับ ส่วนค่า pH ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อย พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 7.03-7.91 โดย พบว่า จะมีค่า pH สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 คือมีค่า 7.91 ซึ่งในระหว่างการหมักไม่พบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นปลอมปนในกากถั่วเหลือง (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *B. coagulans* และค่า pH จากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมัก

เมื่อนำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพทั้ง 2 วิธี และกากถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และปริมาณกรดอะมิโน (ตารางที่ 1) พบว่า การหมักกากถั่วเหลืองด้วย *B. coagulans* มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นหลังผ่านการหมักโดยมีค่าเท่ากับ 51.67 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยโบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด และกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 47.92 ± 0.11 เปอร์เซ็นต์ และ 47.82 ± 0.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์เยื่อใยของกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพทั้ง 2 วิธี คือการหมักกากถั่วเหลืองด้วย *B. coagulans* และกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด และกากถั่วเหลืองปกติ มีค่าเท่ากับ 4.77 ± 0.44 เปอร์เซ็นต์, 4.95 ± 0.45 เปอร์เซ็นต์ และ 4.48 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณเถ้า พบว่า กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยโบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด พบว่า มีค่ามากที่สุด คือเท่ากับ 6.45 ± 0.09 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. coagulans* และกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ มีค่าเท่ากับ 5.69 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ 5.45 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และส่วนปริมาณไขมันพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 1)

ในส่วนของกรดอะมิโน พบว่า กากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพมีปริมาณกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้นทั้งกรดอะมิโนที่จำเป็นและกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น เมื่อพิจารณาจากปริมาณกรดอะมิโนที่วัดได้ โดยกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพ พบว่า มีกรดอะมิโนรวมเท่ากับ 39.99 กรัม/100 กรัม ส่วนกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรดมีค่าเท่ากับ 42.43 กรัม/100 กรัม และกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. Coagulans* มีค่าเท่ากับ 43.57 กรัม/100 กรัม เมื่อพิจารณากรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำคือ Lysine และ Methionine พบว่า หลังจากผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพทั้ง 2 รูปแบบมีแนวโน้มปริมาณกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้น โดยกรดอะมิโนชนิด Lysine เพิ่มขึ้นร้อยละ 9.25 ส่วนกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด และเพิ่มขึ้นร้อยละ 6.61 ในชุดกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. Coagulans* และกรดอะมิโนชนิด Methionine เพิ่มขึ้นร้อยละ 6.56 ในกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด และเพิ่มขึ้นร้อยละ 9.84 ในกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. Coagulans* (ตารางที่ 1)

การศึกษาปริมาณสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพทั้ง 2 วิธี เปรียบเทียบกับกากถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ พบว่า ปริมาณสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในกากถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ พบว่า มีปริมาณ Trypsin inhibitor สูงที่สุด คือ 4.44 ± 2.11 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยโบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด ที่มีค่าเท่ากับ 4.12 ± 3.95 มิลลิกรัมต่อกรัม และกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. coagulans* ที่มีค่า Trypsin inhibitor ต่ำที่สุด คือมีค่า 1.39 ± 1.12 มิลลิกรัมต่อกรัม และมีความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดทดลอง ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมี และกรดอะมิโนของกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพในรูปแบบต่าง ๆ

องค์ประกอบทางเคมี	กากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ	กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด	กากถั่วเหลืองที่หมักด้วย <i>B. coagulans</i>	p-value
โปรตีน	47.82 ± 0.24^b	47.92 ± 0.11^b	51.67 ± 0.13^a	< 0.001
ไขมัน	4.12 ± 0.14	4.11 ± 0.11	4.01 ± 0.13	0.150
เยื่อใย	4.77 ± 0.044^b	4.95 ± 0.45^a	4.48 ± 0.26^c	0.020
เถ้า	5.45 ± 0.08^c	6.45 ± 0.09^a	5.69 ± 0.05^b	< 0.001
ความชื้น	10.71 ± 0.56	10.82 ± 0.89	11.01 ± 0.94	0.083
Trypsin Inhibitor	4.44 ± 2.11^a	4.12 ± 3.95^b	1.39 ± 1.12^c	< 0.001

องค์ประกอบทางเคมี	กากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ	กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด	กากถั่วเหลืองที่หมักด้วย <i>B. coagulans</i>	p-value
(mg/g dry basis)				
ปริมาณกรดอะมิโน				
กรดอะมิโนที่จำเป็น (กรัม/100 กรัม)				
Histidine	1.17	1.25	1.27	-
Isoleucine	1.99	2.11	2.22	-
Leucine	3.41	3.59	3.73	-
Lysine	2.27	2.48	2.42	-
Methionine	0.61	0.65	0.67	-
Phenylalanine	2.31	2.45	2.55	-
Threonine	1.86	1.95	2.05	-
Valine	1.90	2.00	2.08	-
Sum EAA	15.52	16.48	16.99	-
กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น (กรัม/100 กรัม)				
Alanine	2.03	2.09	2.18	-
Aspartic acid	5.09	5.44	5.64	-
Cystine	0.68	0.70	0.74	-
Glutamic Acid	7.18	7.67	7.66	-
Glycine	2.02	2.10	2.19	-
Proline	2.25	2.39	2.48	-
Serine	2.44	2.59	2.67	-
Tyrosine	1.49	1.62	1.61	-
Methionine + Cystine	1.29	1.35	1.41	-
Sum NEAA	23.18	24.6	25.17	-
Total amino acid	39.99	42.43	43.57	-

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ

การวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. coagulans* และกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด และกากถั่วเหลืองยังไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ โดยวิเคราะห์ Total phenolic content และ DPPH Assay ซึ่งมีผลการทดสอบดังนี้ การวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic content พบว่ากากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์จากน้ำคั้นสับปะรด มีปริมาณ Total phenolic content สูงสุด คือ 157.75 ± 1.13 μg GAE/100g ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. coagulans* โดยมีค่า 104.16 ± 0.99 μg GAE /100g และในกากถั่วเหลืองไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ มีค่าต่ำสุดคือมีค่า 73.50 ± 2.63 μg GAE /100g (ตารางที่ 2)

ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับค่า Total phenolic content ที่พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Inhibitory Concentration: IC50) ด้วยวิธี DPPH Assay มีค่าสูงที่สุดในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์จากน้ำคั้นสับปะรด คือมีค่าเท่ากับ 34.1 ± 2.69 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดทดลองอื่น ($p < 0.05$) รองลงมาคือกากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักด้วย *B. coagulans* ด้วยวิธีหมักแบบแห้งบนอาหารแข็งโดยมีค่าการยับยั้งที่ 28.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพมีค่าการยับยั้งที่ 17.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

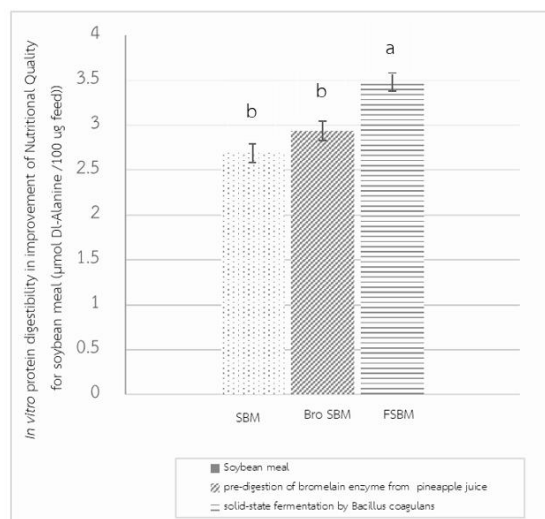
ตารางที่ 2 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกากถั่วเหลืองที่ปรับปรุงคุณภาพในรูปแบบต่าง ๆ

คุณสมบัติในการเป็น สารต้านอนุมูลอิสระ	กากถั่วเหลืองที่ไม่ ผ่านการปรับปรุง คุณภาพ	กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วย โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด	กากถั่วเหลืองที่หมัก ด้วย <i>B. coagulans</i>	P-value
Total phenolic content (μg GAE/100g)	73.50 ± 2.63^a	157.75 ± 1.13^c	104.16 ± 0.99^b	<0.001
DPPH Assay (%)	17.75 ± 0.23^a	34.11 ± 2.69^c	28.90 ± 2.98^b	<0.001

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของกากถั่วเหลืองผ่านการปรับปรุงคุณภาพทั้ง 2 วิธี พบว่า กากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักด้วย *B. coagulans* มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระจากกระบวนการย่อยสูงสุดมีค่า 3.48 ± 1.85 μmol DL-Alanine equivalent feed per Trypsin activity และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดทดลองอื่น ($p < 0.05$) รองลงมาคือ กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนน้ำคั้นจากสับปะรดมีค่า 2.94 ± 1.85 μmol DL-Alanine equivalent feed per Trypsin activity ซึ่งมีค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพที่มีค่าเท่ากับ 2.69 ± 1.83 μmol DL-Alanine equivalent feed per Trypsin activity (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพด้วยรูปแบบต่าง ๆ

การอภิปรายผล

กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ได้มาจากการสกัดเอาน้ำมันออกจากเมล็ด ซึ่งปัจจุบันเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่สำคัญ เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนที่สูง และมีกำลังผลิตที่สามารถผลิตได้ทั้งปี มีผลผลิตเฉลี่ยที่ประมาณ 350 ล้านตันต่อปี ในปี ค.ศ. 2019-2021 และคาดการณ์ว่าจะมีผลผลิตสูงถึง 411 ล้านตันในปี ค.ศ. 2031 โดยประเทศที่มีศักยภาพการผลิตอย่างต่อเนื่องและสูงสุดคือประเทศสหรัฐอเมริกา (OECD/FAO, 2021) ปัจจุบันการนำกากถั่วเหลืองมาปรับปรุงคุณภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มีคุณภาพมากขึ้น เช่น การนำจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มาเพื่อย่อยหรือหมักด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น ใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* (Kim et al., 2009) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Shiu et al., 2015) และ *Lactobacillus plantarum* (Wang et al., 2016) ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Sharawy et al., 2016) หรือการย่อยด้วยเอนไซม์จากผลไม้ เช่น เอนไซม์โบรมิเลนจากสับปะรด (ทรงทรัพย์ และคณะ, 2561) และเอนไซม์ปาเปนจากมะละกอ (Hamid et al., 2022) เพื่อการปรับปรุงคุณภาพของกากถั่วเหลืองเพื่อให้ใช้ประโยชน์และมีประสิทธิภาพสูงสุด จากผลการทดลองด้วยวิธีการปรับปรุงคุณภาพกากถั่วเหลืองด้วย 2 วิธี คือการปรับปรุงคุณภาพโดยใช้แบคทีเรียชนิด *Bacillus coagulans* และการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (Pre-digestion) จากน้ำคั้นสับปะรด พบว่า การหมักกากถั่วเหลืองด้วย *B. coagulans* ส่งผลทำให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นสูงสุดจากเดิมเท่ากับ 47.82 เปอร์เซ็นต์ เป็น 51.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์น้ำคั้นสับปะรด โดยมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นคือ 47.92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chi and Cho (2016) ซึ่งได้ทดลองการหมักกากถั่วเหลืองด้วยจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *L. acidophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *L. plantarum* และ *S. cerevisiae* ด้วยวิธีหมักบนอาหารแห้งที่ความชื้นที่ 45 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ใน Humidity test chamber ซึ่งผลการทดลอง พบว่า กากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักด้วยจุลินทรีย์มีปริมาณโปรตีนที่สูงขึ้นทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยการหมักกากถั่วเหลืองด้วย *B. amyloliquefaciens* มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 11.80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งเพิ่มขึ้น 10.31 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรีย *L. plantarum* และ *L. acidophilus* มีโปรตีนเพิ่มขึ้น 3.51 และ 1.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีผลการทดลองที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Cheng et al. (2017) ที่ได้ศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพของกากถั่วเหลืองโดยการหมักด้วย *B. subtilis* ที่แยกได้จากถั่วเน่าญี่ปุ่น (Natto) ที่เป็นอาหารประจำชาติญี่ปุ่น โดยใช้การหมักด้วยวิธีหมักบนอาหารแห้ง ใช้ความชื้นในการหมักที่ 50 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลอง พบว่า กากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักดังกล่าวมีระดับโปรตีนเพิ่มขึ้น 19 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น 374.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลการทดลองที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการรายงานของ Chen et al. (2013), Li et al. (2020) และ Mukherjee et al. (2016) ที่ได้ศึกษาข้อมูลการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของกากถั่วเหลืองด้วยวิธีต่าง ๆ ซึ่งได้รายงานว่าสาเหตุที่ปริมาณโปรตีนจากกากถั่วเหลืองหลังการหมักมีโปรตีนสูงขึ้น มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกิจกรรมการหมักของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Alkaline protease จากจุลินทรีย์ที่ปล่อยออกมาซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวเคมีในระบบการย่อยภายนอกเซลล์ (Extracellular digestion) และจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ จากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารหมัก

ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพทั้ง 2 วิธี พบว่า กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์จากน้ำคั้นสับปะรด มีปริมาณกรดอะมิโนรวมเพิ่มมากขึ้น 6.85 เปอร์เซ็นต์ และกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. coagulans* มีปริมาณกรดอะมิโนรวมเพิ่มมากถึง 9.11 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด และเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. coagulans* จะทำหน้าที่ย่อยโดยตัดพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนทำให้เกิดเปปไทด์สายสั้นและอะมิโนอิสระเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองของนักวิจัยหลายท่าน ได้แก่ การศึกษาของ วราพันธุ์ และคณะ (2547) ที่ทำการทดสอบการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยน้ำคั้นจากสับปะรดแล้วพบว่า ขนาดของโปรตีนของกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยน้ำคั้นจากสับปะรด มีขนาดที่เล็กลงจากการทดสอบแบบ SDS-PAGE ที่พบว่า ปริมาณโปรตีน

ขนาด 30 kDa มีปริมาณลดลงหลังผ่านกระบวนการย่อย และในทางกลับกันปริมาณโปรตีนขนาด 15 kDa มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการรายงานของ Mukherjee et al. (2016) และ Dai et al. (2017) พบว่า การหมักกากถั่วเหลืองด้วย *B. subtilis* พบว่า ปริมาณกรดอะมิโนรวมมีค่าสูงขึ้นเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณากรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของปลา พบว่า มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการทดลองครั้งนี้ โดยกรดอะมิโนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นคือ Leucine, Methionine, Threonine และ Phenylalanine ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนดังกล่าวเกิดจากกระบวนการย่อยและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยการหลั่งเอนไซม์ Alkaline protease ที่เป็นเอนไซม์ในกิจกรรมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp.

นอกจากนั้นแล้วการหมักกากถั่วเหลืองด้วย *B. coagulans* ส่งผลทำให้สารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin inhibitor) ที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ทริปซินซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบการย่อยอาหารโดยตรงจากวิธีการปรับปรุงคุณภาพ ในการศึกษานี้ พบว่า กากถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพมีปริมาณ Trypsin inhibitor สูงสุด คือ 4.44 ± 2.11 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อกากถั่วเหลืองผ่านการปรับปรุงคุณภาพด้วยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรดแล้ว พบว่า มีปริมาณ Trypsin inhibitor ลดลงโดยมีค่าเท่ากับ 4.12 ± 3.95 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วนการหมักกากถั่วเหลืองด้วย *B. coagulans* พบว่า มีปริมาณ Trypsin inhibitor ลดลงสูงที่สุดคือเท่ากับ 1.39 ± 1.12 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยเมื่อเทียบเป็นร้อยละแล้ว พบว่า วิธีการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรดสามารถลด Trypsin inhibitor ได้ 7.21 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการหมักกากถั่วเหลืองด้วย *B. coagulans* สามารถลด Trypsin inhibitor ได้ถึง 68.69 เปอร์เซ็นต์ โดยสาเหตุที่ปริมาณ Trypsin inhibitor ลดลง เนื่องจากเป็นกระบวนการเกี่ยวเนื่องกับกระบวนการย่อยทั้งจากเอนไซม์โบรมิเลน และเอนไซม์โปรตีเอสจากการหมักด้วย *B. coagulans* เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งสามารถตัดโครงสร้างของ Trypsin inhibitor ที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีนทำให้เสียสภาพและไม่สามารถทำงานได้ (Phengnuam and Suntornsuk, 2013)

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่า ปริมาณ Total phenolic content ในกากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. coagulans* มีค่า 104.16 ± 0.99 mg GAE/100g โดยมีค่าสูงกว่ากากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพ ซึ่งมีค่า Total phenolic content 73.50 ± 2.63 µg GAE/100g โดยสาเหตุที่ทำให้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักมี Total phenolic content ค่าสูงขึ้นมาจากกระบวนการย่อยของแบคทีเรียทำให้โครงสร้างต่าง ๆ ในวัตถุดิบที่ย่อยเล็กลง และทำลายโครงสร้างที่เป็นผนังเซลล์พืช ส่งผลให้มีการปลดปล่อย Bioactive compound ที่ถูกห่อหุ้มโดยผนังเซลล์พืชได้ปลดปล่อยออกมา (Gao et al., 2013; Balli et al., 2021) และกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด มีค่า Total phenolic content สูงที่สุดคือ 157.75 ± 1.13 mg GAE/100g โดยสาเหตุที่มีค่าสูงนั้นอาจมาจากปริมาณ Total phenolic content ที่อยู่ในน้ำคั้นสับปะรดปะปนมาระหว่างการย่อย ทำให้มีค่าสูง ส่วนคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ DPPH Assay เป็นวิธีที่นิยมใช้เบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ วิธีการ DPPH เป็นวิธีที่มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์ร่างกายมนุษย์ จากผลการทดสอบ พบว่า กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรดมีการยับยั้งสูงสุดคือ 34.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. coagulans* มีค่า 28.9 เปอร์เซ็นต์ และกากถั่วเหลืองปกติมีค่า 17.7 เปอร์เซ็นต์ และค่า ABTS assay พบว่า กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรดมีค่า IC50 เท่ากับ 0.36 ± 0.009 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. coagulans* มีค่า IC50 เท่ากับ 0.39 ± 0.009 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกากถั่วเหลืองปกติมีค่า IC50 เท่ากับ 0.48 ± 0.010 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผลการทดลองให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับนักวิจัยหลายท่าน เช่น Gao et al. (2013) ที่ได้ศึกษาการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกากถั่วเหลือง โดยการหมักด้วยแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus brevis* และเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ด้วยวิธีหมักบนอาหารแห้ง และ Li et al. (2020) ที่ได้ศึกษาผลของการหมักแบบของแข็งโดยใช้ *Lactobacillus casei* ต่อคุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณไอโซฟลาโวน ปริมาณกรดฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ของแป้งหัวเหลือง ซึ่งพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวน ปริมาณกรดฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นจากกระบวนการหมัก

ในส่วนของคุณภาพการย่อยได้โปรตีน (In vitro protein digestibility) ของกากหัวเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพทั้ง 2 วิธี โดยทำการย่อยกากหัวเหลืองและจำลองการย่อยจากเอนไซม์สกัดหยาบจากปลาน้ำหนักเฉลี่ย 35 กรัม/ตัว และทำการวัดกรดอะมิโนอิสระ โดยเทียบกับ DL-alanine จากผลการทดลอง พบว่า กากหัวเหลืองที่หมักด้วย *B. coagulans* มีค่าประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนสูงสุดโดยมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระ $3.48 \pm 1.85 \mu\text{mol DL-alanine}/100 \mu\text{g feed}$ ส่วนกากหัวเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรดมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระ $2.94 \pm 1.85 \mu\text{mol DL-alanine} /100 \mu\text{g feed}$ และกากหัวเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพ ค่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระ $2.69 \pm 1.83 \mu\text{mol DL-alanine} /100 \mu\text{g feed}$ โดยเมื่อพิจารณาแล้ว พบว่า กากหัวเหลืองที่หมักด้วย *B. coagulans* มีประสิทธิภาพการย่อยได้โปรตีนเพิ่มขึ้น 26.39 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการปรับปรุงคุณภาพโดยการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด มีประสิทธิภาพการย่อยได้โปรตีนเพิ่มขึ้น 9.29 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการปรับปรุงคุณภาพทั้ง 2 วิธี เป็นการปรับปรุงคุณภาพทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปจากโปรตีนเป็นเปปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโนอิสระ นอกจากนี้ยังเกิดการสลายพันธะที่ยึดโครงสร้างโปรตีนระดับต่าง ๆ ทั้งโครงสร้างปฐมภูมิ ทติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิ ส่งผลให้โครงสร้างที่ซับซ้อนถูกทำลาย (Denaturation) โปรตีนแตกตัวเป็นหน่วยย่อยขนาดเล็กลง และเกิดการคลายตัวของโครงสร้าง ทำให้เอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของปลาสามารถเข้าถึงและย่อยโปรตีนได้ดียิ่งขึ้น (Mukherjee et al., 2016; Wang et al., 2016) ซึ่งให้ผลการศึกษาคล้ายคลึงกับ Shiu et al. (2015) ที่รายงานว่า การใช้กากหัวเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* E20 เพื่อทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารเลี้ยงปลากะพงแดง หลังจากผ่านการปรับปรุงคุณภาพโดยการหมักพบว่า มีกรดอะมิโนอิสระมากขึ้น 21.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะส่งผลต่อการดูดซึมของปลา โดยวิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่สามารถประเมินและคาดการณ์การเจริญเติบโตล่วงหน้าได้จากความสามารถในการย่อยอาหารและการใช้ประโยชน์ได้จากสารอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ (บัณฑิต และศิริภาวี, 2554; Rungruangsak-Torrissen et al., 2006)

บทสรุป

จากการศึกษาการปรับปรุงคุณภาพกากหัวเหลืองด้วยวิธีหมักแบบแห้งบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation) โดยใช้เชื้อ *B. coagulans* และวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นสับปะรด สามารถสรุปได้ว่าคุณภาพของกากหัวเหลืองจากการหมักด้วยเชื้อ *B. coagulans* มีคุณภาพที่ดี โดยพิจารณาจากปริมาณโปรตีน และปริมาณกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้น ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารยังยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีน (In vitro digestibility) ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นกากหัวเหลืองที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ *B. coagulans* สามารถใช้แทนกากหัวเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการปรับปรุงคุณภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในด้านการใช้ประโยชน์จากสารอาหารและการเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชในวัตถุดิบอาหารปลานิล ซึ่งมีศักยภาพในการลดการใช้ปลาป่นในสูตรอาหารปลาได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ณัฐธินัน เอื้อศิลป์ และช่อพกา ดวงมณี. (2564). ต้นทุนและผลตอบแทนของการเพาะเลี้ยงปลานิลในกระชังในแม่น้ำโขง (จังหวัดหนองคาย) ระหว่างปีการผลิต 2562. วารสารบริหารธุรกิจเศรษฐศาสตร์และการสื่อสาร. 16(3): 144-162.

- ทรงทรัพย์ อรุณกมล, นราวุธ ระพันธ์คำ และนพรัตน์ พัทธินัย. (2561). ผลของการใช้กากถั่วเหลืองที่หย่อยด้วยน้ำคั้นจากสับปะรดในสูตรอาหารปลานิลต่อการเจริญเติบโต ความทนทานต่อสภาพเครียดและเชื้อก่อโรค. วารสารแก่นเกษตร. 42 (ฉบับพิเศษ): 1011-1018.
- บัณฑิต ยวงสร้อย และศิริภาวี เจริญวัฒนศักดิ์. (2554). การใช้ประโยชน์จากใบมะรุมต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของปลานิล. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49: สาขาประมง. 1-4 กุมภาพันธ์ 2554. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. 317-326.
- วรพันธุ์ จินตณวิชัย, อุทัย คันโธ, สุกัญญา จิตตพรพงษ์ และปณทริกา หะรินสุต. (2547). การศึกษาปริมาณเอนไซม์โบรมิเลน องค์ประกอบทางเคมีจากน้ำคั้นสับปะรดและการนำไปใช้ประโยชน์ย่อยโปรตีนในกากถั่วเหลือง. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาสัตว สาขาสัตวแพทยศาสตร์. 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. 26-32.
- สิทธิชัย สะทะโชติ, เกตุณัฐ ศรีโพธิ์โรจน์, อรพินท์ จินตสถาพร และศรีน้อย ชุ่มคำ. (2563). ต้นทุนผลตอบแทนการเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในจังหวัดสกลนคร. วารสารแก่นเกษตร. 48(4): 727-732.
- สุธิรา มณีฉาย และประสพอร รินทอง. (2559). ปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อย. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 44(1): 142-152.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1990). Official methods of analysis. Washington D.C.
- Balli D., Cecchi L., Innocenti M., Bellumori M. and Mulinacci N. (2021). Food by-products valorisation: Grape pomace and olive pomace as sources of phenolic compounds and fiber for enrichment of tagliatelle pasta. Food Chemistry. 355: 129642-129642.
- Chen L., Madl R.L. and Vadlani P.V. (2013). Nutritional enhancement of soy meal via *Aspergillus oryzae* solid-state fermentation. Cereal Chemistry. 90(6): 529-534.
- Cheng A.C., Lin H.L., Shiu Y.L., Tyan Y.C. and Liu C.H. (2017). Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture. Fish and Shellfish Immunology. 67: 270-279.
- Chi C.H. and 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.
- Dai C., Ma H., He R., Huang L., Zhu S., Ding Q. and Luo L. (2017). Improvement of nutritional value and bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis*. LWT-Food Science and Technology. 86: 1-7.
- Ding Z., Zhang Y., Ye J., Du Z. and Kong Y. (2015). An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diet of *Macrobrachium nipponense*: Growth, nonspecific immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology. 44(1): 295-301.
- FAO. (2021). Fishery and aquaculture statistics. Global production by production source 1950-2019 (FishstatJ). Rome, Italy.
- FAO. (2022). The state of world fisheries and aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, Italy.
- Gao Y.L., Wang C.S., Zhu Q.H. and Qian G.Y. (2013). Optimization of solid-state fermentation with *LactoBacillus brevis* and *Aspergillus oryzae* for trypsin inhibitor degradation in soybean meal. Journal of Integrative Agriculture. 12(5): 869-876.

- Hamid N.K.A., Somdare P.O., Harashid K.A.M., Othman N.A., Kari Z.A., Wei L.S. and Dawood M.A. (2022). Effect of papaya (*Carica papaya*) leaf extract as dietary growth promoter supplement in Red hybrid tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) diet. Saudi Journal of Biological Sciences. 29(5): 3911-3917.
- Kim S.S., Galaz G.B., Pham M.A., Jang J.W., Oh D.H. and Yeo I.K. (2009). Effects of dietary supplementation of a meju, fermented soybean meal, and *Aspergillus oryzae* for juvenile parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 22(6): 849-856.
- Kumar V., Rani A., Mittal P. and Shuaib M. (2019). Kunitz trypsin inhibitor in soybean: Contribution to total trypsin inhibitor activity as a function of genotype and fate during processing. Journal of Food Measurement and Characterization. 13(2): 1583-1590.
- Lee S.M., Azarm H.M. and Chang K.H. (2016). Effects of dietary inclusion of fermented soybean meal on growth, body composition, antioxidant enzyme activity and disease resistance of rockfish (*Sebastes schlegeli*). Aquaculture. 459: 110-116.
- Li S., Jin Z., Hu D., Yang W., Yan Y., Nie X., Lin J., Zhang Q., Gai D., Ji Y. and Chen X. (2020). Effect of solid-state fermentation with *LactoBacillus casei* on the nutritional value, isoflavones, phenolic acids and antioxidant activity of whole soybean flour. LWT-Food Science and Technology. 125: 1-8.
- Mukherjee R., Chakraborty R. and Dutta A. (2016). Role of fermentation in improving nutritional quality of soybean meal-a review. Asian-Australasian journal of Animal Sciences. 29(11): 1523.
- Murthy L.N., Phadke G.G., Jeyakumari A. and Vijayakumar S. (2023). Secondary raw material and low-cost fish for fish meal production and its implications in the animal feed industry. In Majumder R.K. and Balange A.K. Editor. Advances in Fish Processing Technologies. Apple Academic Press. FL. 183-200.
- OECD/FAO. (2021). OECD/FAO Agricultural Outlook 2023-2035. OECD Publishing: Paris
<https://doi.org/10.1787/08801ab7-en>.
- Phengnuam T. and Suntornsuk W. (2013). Detoxification and anti-nutrients reduction of *Jatropha curcas* seed cake by *Bacillus* fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 115(2): 168-172.
- Rungruangsak-Torrissen K., Moss R., Andresen L.H., Berg A. and Waagbø R. (2006). Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiology and Biochemistry. 32(1): 7-23.
- Sirikasemsuk K., Kittipanya-ngam P. and Rintachai N. (2023). Red tilapia (*Oreochromis niloticus*) farming in Thailand using a split-plot experiment design to improve feeding frequency and feed intake: weight gain and profit return. Journal of Survey in Fisheries Sciences. 10(25): 2009-2020.
- Sharawy Z., Goda A.M.S. and Hassaan M.S. 2016. Partial or total replacement of fish meal by solid state fermented soybean meal with *Saccharomyces cerevisiae* in diets for Indian prawn shrimp, *Fenneropenaeus indicus*, postlarvae. Animal Feed Science and Technology. 212: 90-99.

- Sharifi M., Ajodani F.H., Pahlevanlo A. and Hosseinienezhad M. (2021). The first report of bacteriocin production by the *Bacillus coagulans* IS2 and its antibacterial effects. Egyptian Journal of Veterinary Sciences. 52(2): 195-202.
- Shiu Y.L., Hsieh S.L., Guei W.C., Tsai Y.T., Chiu C.H. and Liu C.H. (2015). Using *Bacillus subtilis* E20 fermented soybean meal as replacement for fish meal in the diet of orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*, Hamilton). Aquaculture Research. 46(6): 1403-1416.
- Wang L., Zhou H., He R., Xu W., Mai K. and He G. (2016). Effects of soybean meal fermentation by *Lactobacillus plantarum* P8 on growth, immune responses, and intestinal morphology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture. 464: 87-94.
- Yadav N. and Yadav V.K. (2003). *Bacillus coagulans*, a highly salt tolerant bacterium isolated from native soil of Rajasthan. Indian Journal of Microbiology. 43(4): 243-246.
- Zhang B., Zhang H., Yu Y., Zhang R., Wu Y., Yue M. and Yang C. (2021). Effects of *Bacillus coagulans* on growth performance, antioxidant capacity, immunity function, and gut health in broilers. Poultry Science. 100(6): 101168.
- Zhou F., Song W., Shao Q., Peng X., Xiao J. and Hua Y. (2011). Partial replacement of fish meal by fermented soybean meal in diets for black sea bream, juveniles. Journal of the World Aquaculture Society. 42(2): 184-197.