



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารตั้งต้นในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยเชื้อ

*Bacillus licheniformis* และ *Bacillus megaterium*

Effect of metabolic pathway precursors on Poly- $\gamma$ -glutamic acid

Production by

*Bacillus licheniformis* and *Bacillus megaterium*

นางสาววิรามศรี ศรีพจนารถ

600270407

R000186

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ผลของสารตั้งต้นในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus megaterium*

แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้.....

ประจำปีงบประมาณ..... 2559..... จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน..... 56,000..... บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย..... 1..... ปี ตั้งแต่ 1 ต.ค. 2558..... ถึง 30 ก.ย. 2559.....

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ นางสาววิรวมศรี ศรีพจนารณ..... สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

หน่วยงานต้นสังกัด คณะอุตสาหกรรมเกษตร.....

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาหาผลของการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU01 และ *Bacillus megaterium* SRU02 จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus licheniformis* SRU 01 เป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid-dependent ที่ต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ในขณะที่ *Bacillus megaterium* SRU02 เป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid-independent bacteria ที่ไม่ต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอกเพื่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก การศึกษาหาความเข้มข้นของสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 และ *Bacillus megaterium* SRU 02 เพื่อทำให้ผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกได้สูงที่สุด โดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนองที่มีการวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) เพื่อศึกษาผลของปัจจัย 3 ปัจจัย คือ กรดแอลฟาดีโตกลูตาริก ( $X_1$ ) แอลกลูตามีน ( $X_2$ ) และกรดซิตริก ( $X_3$ ) ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU01 คือกรดแอลฟาดีโตกลูตาริกความเข้มข้น 18.41 มิลลิโมลาร์ แอลกลูตามีน 0.92 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริก 28.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 9.68 กรัมต่อลิตร ผลของการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02 ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกคือ แอลฟาดีโตกลูตาริกเท่ากับ 8.89 มิลลิโมลาร์ แอลกลูตามีนเท่ากับ 0.08 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกเท่ากับ 28.41 กรัมต่อลิตร กรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้สูงสุดคือ 0.10 กรัมต่อลิตร

**คำสำคัญ :** กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, วิถีเมแทบอลิซึม, วิธีพื้นผิวตอบสนอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Research Title:** Effect of metabolic pathway precursors on poly- $\gamma$ -glutamic acid production by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus megaterium*.....  
**Researcher:** Ms. Wiramsri Sripochanart.....  
**Faculty:** Faculty of Agro-Industry..... **Department:** Industrial Fermentation Technology.....

## ABSTRACT

The objectives of the research were to investigate effect of the addition of metabolic pathway precursors on poly- $\gamma$ -glutamic acid production by *Bacillus licheniformis* SRU01 and *Bacillus megaterium* SRU02. The results found that *Bacillus licheniformis* SRU01 was glutamic acid-dependent bacteria that require L-glutamic acid in the medium for enhancing poly- $\gamma$ -glutamic acid production while *Bacillus megaterium* SRU02 was glutamic acid-independent bacteria that could produce poly- $\gamma$ -glutamic acid even in the absence of exogenously added L-glutamic acid. The concentration of metabolic pathway precursors for increasing poly- $\gamma$ -glutamic acid production by *Bacillus licheniformis* SRU01 and *Bacillus megaterium* SRU02 was studied by the use of Central composite design (CCD). Different concentrations of 3 metabolic intermediates including  $\alpha$ -ketoglutaric acid (X1), L-glutamine (X2) and citric acid (X3) were studied. The results found that the optimum concentration of metabolic intermediates for poly- $\gamma$ -glutamic acid production by *Bacillus licheniformis* SRU01 was 18.41 mM of  $\alpha$ -ketoglutaric acid, 0.92 mM of L-glutamine and 28.41 g/L of citric acid. The maximum poly- $\gamma$ -glutamic acid was 9.68 g/L. The optimum concentration of metabolic intermediates for poly- $\gamma$ -glutamic acid production by *Bacillus megaterium* SRU02 was 8.89 mM of  $\alpha$ -ketoglutaric acid, 0.08 mM of L-glutamine and 28.41 g/L of citric acid. The maximum poly- $\gamma$ -glutamic acid was 0.1 g/L.

**Keywords :** Poly- $\gamma$ -glutamic acid, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, Metabolic pathway, Response surface method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 สัญญาเลขที่ 2559-17-009

ขอขอบคุณนางสาวพรสุตา สระจิตร นางสาวศิรินทิพย์ ธงถาวรสุวรรณ นางสาวพิมพ์พิชชา สรสิทธิ์ นางสาวศิวพร วราภรณ์สวัสดิ์ และนางสาวกุลธิดา ยอดมาลี ที่ได้ช่วยทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในระหว่างปฏิบัติงาน ทำให้การดำเนินงานสำเร็จไปได้ด้วยดี

และสุดท้ายนี้ความดีอันเกิดจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ผู้เขียนขอมอบแด่บิดา มารดา ครู อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

วิรามศรี ศรีพจนารถ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ .....	I
ABSTRACT .....	II
กิตติกรรมประกาศ .....	III
สารบัญ .....	IV
สารบัญตาราง .....	VI
สารบัญรูปภาพ .....	VII
<b>บทที่ 1 บทนำ</b> .....	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> .....	<b>3</b>
2.1 กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก (Poly- $\gamma$ -glutamic acid; PGA).....	3
2.2 วิธีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมาไกลูตามิกโดยแบคทีเรีย.....	3
2.3 การประยุกต์ใช้กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	5
2.4 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	6
2.5 การผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกโดยกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย.....	6
2.6 การผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกโดยกระบวนการหมักโดยการเติมสารตัวกลางในวิธี เมแทบอลิซึม.....	7
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย</b> .....	<b>9</b>
3.1 วัตถุประสงค์.....	9
3.2 สารเคมี.....	9
3.3 อุปกรณ์.....	10
3.4 วิธีการทดลอง.....	10
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัย</b> .....	<b>16</b>
4.1 ผลของกรดกลูตามิกต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> SRU01 และ <i>Bacillus megaterium</i> SRU 02 .....	16
4.2 ศึกษาผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยใช้เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01 .....	17
4.3 ผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกโดยใช้เชื้อ <i>B. megaterium</i> SRU 02.....	28
4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	40
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b> .....	<b>42</b>
5.1 สรุปผล.....	42
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 6 สรุปผลผลิตของการวิจัย.....	44
บรรณานุกรม .....	45
ภาคผนวก .....	49
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและการคำนวณ.....	50
ภาคผนวก ข การเตรียมกราฟมาตรฐาน .....	53
ภาคผนวก ค บทความวิจัยที่ตีพิมพ์.....	56
ภาคผนวก ง สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย .....	57
ข้อมูลประวัติผู้วิจัย.....	59



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	10
3.2 ปัจจัยระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง.....	12
3.3 ลำดับการทดลองของการออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ที่มี 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับและมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 6 ครั้ง.....	12
4.1 ปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตโดย <i>B. licheniformis</i> SRU01 และ <i>B. megaterium</i> SRU 02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ตัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่เติมและไม่เติมกรดแอลกลูตามิก.....	16
4.2 ค่าการทดลองของผลการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยใช้เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01.....	17
4.3 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	21
4.4 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	22
4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	22
4.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	23
4.7 ค่าการทดลองของผลการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยใช้เชื้อ <i>B. megaterium</i> SRU02.....	29
4.8 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	33
4.9 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	34
4.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	34
4.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	35

## สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก (Poly- $\gamma$ -glutamic acid; PGA).....	3
2.2 วิธีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ของ Bacillus subtilis IFO3335.....	4
4.1 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	18
4.2 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	18
4.3 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	19
4.4 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	19
4.5 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	20
4.6 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	20
4.7 พื้นผิวผลตอบและโครงสร้างของปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่าง แอลฟาดีโตกลูตาริกและกลูตามีนที่ความเข้มข้นกรดซิตริกที่ 28.4 กรัมต่อลิตร.....	24
4.8 พื้นผิวผลตอบและโครงสร้างของปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่าง แอลฟาดีโตกลูตาริกและกรดซิตริก ที่ความเข้มข้นกลูตามีนที่ 0.92 มิลลิโมลาร์.....	25
4.9 พื้นผิวผลตอบและโครงสร้างของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่าง กลูตามีนและกรดซิตริก ที่ความเข้มข้นแอลฟาดีโตกลูตาริกที่ 18.4 มิลลิโมลาร์.....	25
4.10 พื้นผิวผลตอบและโครงสร้างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาดีโตกลูตาริกและ กลูตามีน ที่ความเข้มข้นกรดซิตริกที่ 20 กรัมต่อลิตร.....	26
4.11 พื้นผิวผลตอบและโครงสร้างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาดีโตกลูตาริกและ กรดซิตริกที่ความเข้มข้นกลูตามีนที่ 0.5 มิลลิโมลาร์.....	26
4.12 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและโครงสร้างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีนและ กรดซิตริก ความเข้มข้นแอลฟาดีโตกลูตาริกที่ 0.5 มิลลิโมลาร์.....	27
4.13 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	28
4.14 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการผลิตน้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	28
4.15 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	30
4.16 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	30
4.17 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	31
4.18 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	31
4.19 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก.....	32
4.20 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	32
4.21 พื้นผิวผลตอบสนองและโครงสร้างของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาดีโต กลูตาริกและกลูตามีน ที่ความเข้มข้นของกรดซิตริก 24.50 กรัมต่อลิตร.....	36
4.22 พื้นผิวผลตอบสนองและโครงสร้างของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่าง แอลฟาดีโตกลูตาริกและกรดซิตริก ที่ความเข้มข้นกลูตามีน 0.71 มิลลิโมลาร์.....	37
4.23 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงสร้างของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ ระหว่างกลูตามีนและกรดซิตริก ที่ความเข้มข้นแอลฟาดีโตกลูตาริก 8.89 มิลลิโมลาร์.....	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.24 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาซีโตกลูตาริกและกลูตามีน ที่ความเข้มข้นกรดซิตริก 28.41 กรัมต่อลิตร.....	38
4.25 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาซีโตกลูตาริกและกรดซิตริกที่ ความเข้มข้นกลูตามีน 0.08 มิลลิโมลาร์.....	38
4.26 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีนและกรดซิตริกที่ความเข้มข้นแอลฟาซีโตกลูตาริก 1.59 มิลลิโมลาร์.....	39
4.27 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก.....	39
4.28 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง .....	40



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก (Poly- $\gamma$ -glutamic acid; PGA) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ หรือพอลิเอไมด์ที่ประกอบด้วยกรดกลูตามิก ทั้งชนิด L- และ D-ไอโซเมอร์ ซึ่งเชื่อมต่อกันระหว่าง  $\alpha$ -amino acid และหมู่  $\gamma$ -carboxylic acid ด้วยพันธะเอไมด์ เป็นสารเหนียวที่แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. ปล่อยออกมาออกเซลล์ซึ่งมีความสามารถละลายน้ำได้ กรดพอลิแกมมาไกลูตามิกเป็นสารที่มีประจุลบ ย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ รับประทานได้ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อมนุษย์ และไม่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการนำกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก มาใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง และรวมทั้งการใช้เพื่อสิ่งแวดล้อม โดยจะเป็นสารเพิ่มความเหนียวหนืด สารดูดความชื้น สารลดความขม สารป้องกันการแข็งตัว สารช่วยลดการรับน้ำหนัก เป็นตัวจับและพายาเข้าสู่ร่างกาย และยังใช้เป็นสารดูดซับโลหะหนัก คุณสมบัติของกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ที่น่าสนใจและเป็นประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร คือเป็นสารที่ย่อยสลายได้ในสภาพธรรมชาติ และรับประทานได้โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย ดังนั้นปัจจุบันจึงให้ความสนใจศึกษากระบวนการผลิตที่จะให้ได้ปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกมาก ในการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกเพื่อมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะมีการใช้กล้าเชื้อที่คัดแยกได้จากธรรมชาติคือ *Bacillus subtilis* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้กล้าเชื้อในการผลิตเพื่อปลดปล่อยกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ซึ่งทั่วไปอาจเพิ่มศักยภาพของการผลิตได้โดยเลือกใช้แหล่งสับสเตรทและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการเติมสารตั้งต้นในวิถีเมแทบอลิซึม ได้แก่ กรดกลูตามิกชนิดแอล แอลกลูตามีน กรดแอลฟาดีไฮโดรกลูตาริก และกรดซิติริก ต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus megaterium*

### 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของกรดกลูตามิกชนิดแอล ต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกของเชื้อ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus megaterium*

1.2.2 เพื่อศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของสารตั้งต้นในวิถีเมแทบอลิซึม ได้แก่ กรดกลูตามิก ชนิดแอล แอลกลูตามีน กรดแอลฟาดีไฮโดรกลูตาริก และกรดซิติริก ที่ส่งผลต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่สูงที่สุดโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus megaterium*

### 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 การศึกษาผลของกรดกลูตามิกชนิดแอล ต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกของเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU01 และ *Bacillus megaterium* SRU02 ซึ่งคัดแยกได้จากมูลไก่ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ E ที่เติมและไม่เติมกรดกลูตามิกชนิดแอล

1.3.2 การศึกษาผลของการเติมสารตั้งต้นในวิถีเมแทบอลิซึม โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) เพื่อศึกษาผลของปัจจัย 3 ปัจจัย ๆ ละ 3 ระดับ คือ กรดแอลฟาดีไฮโดรกลูตาริก ( $X_1$ ) แอลกลูตามีน ( $X_2$ ) และกรดซิติริก ( $X_3$ ) ได้แก่ แอลกลูตามีน กรดแอลฟาดีไฮโดรกลูตาริกและกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชิตริกต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU01 และ *Bacillus megaterium* SRU02

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงชนิดของสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมที่มีความสามารถในการช่วยส่งเสริมกรดพอลิแกมมากลูตามิกและเป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

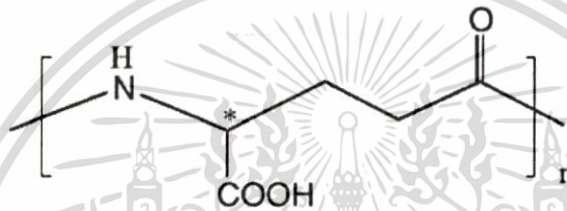


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก (Poly- $\gamma$ -glutamic acid; PGA)

กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก (Poly- $\gamma$ -glutamic acid; PGA) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ เป็นโฮโมพอลิเมอร์ของกรดกลูตามิก ทั้งชนิด L- และ D-ไอโซเมอร์ ซึ่งเชื่อมต่อกันระหว่าง  $\alpha$ -amino acid และหมู่  $\gamma$ -carboxylic acid ด้วยพันธะเอไมด์ (ภาพที่ 2.1) มีลักษณะเหนียวหนืด เป็นสารที่แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. จะปล่อยออกมาจากเซลล์เมื่อเซลล์แตก เซลล์แก่ หรือเซลล์หมดอายุ กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก พบได้ในถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่นนัตโตะ (Natto)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก (Poly- $\gamma$ -glutamic acid; PGA)

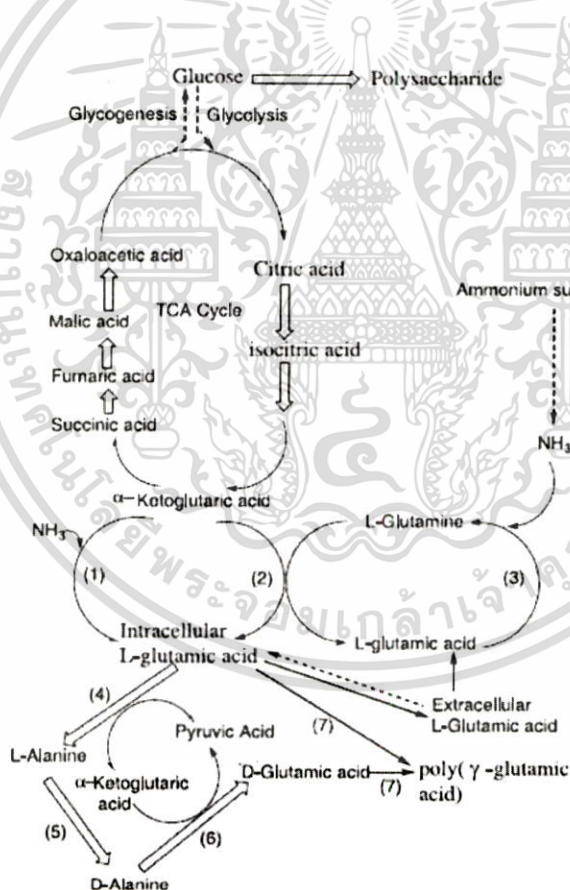
ที่มา : Shih และ Van (2001)

คุณสมบัติทางกายภาพของกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก จะมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตและสิ่งแวดล้อม เช่น แบคทีเรียที่อยู่ในดินโดยเฉพาะสายพันธุ์ *Bacillus* ยกเว้น *B. anthracis* จะผลิตและปล่อยกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ออกมาจากเซลล์ใช้ป้องกันโอโซนโลหะ เพื่อเพิ่มความต้านทานของเชื้อในสิ่งแวดล้อมที่อันตราย นอกจากนี้กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ยังถูกใช้เป็นแหล่ง กลูตามีนสำหรับแบคทีเรียในสภาวะที่ขาดสารอาหารช่วงท้ายของระยะคงจำนวนเซลล์ (Stationary phase) *B. anthracis* และ *Staphylococcus epidermidis* จะผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก แล้วเกาะอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Anchored PGA) เพื่อทำหน้าที่ในการป้องกันเซลล์จากการติดเชื้อก่อโรค *Natrialba asiatica* ใช้กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ลดความเข้มข้นของเกลือในสภาวะที่อาศัยอยู่ เพื่อสามารถอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมที่อันตราย (Bajaj and Singhal, 2011; Hezayen *et al.*, 2001)

### 2.2 วิธีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมาไกลูตามิกโดยแบคทีเรีย

จากภาพที่ 2.2 หมายเลข (1) คือเอนไซม์ Glutamate dehydrogenase (GD) หมายเลข (2) คือเอนไซม์ Glutamate 2-oxoglutarate aminotransferase (GOGAT) หมายเลข (3) คือเอนไซม์ Glutamine synthetase (GS) หมายเลข (4) คือเอนไซม์ L-glutamic acid pyruvic acid aminotransferase หมายเลข (5) คือเอนไซม์ alanine racemase หมายเลข (6) คือเอนไซม์ D-glutamic acid pyruvic acid aminotransferase และ หมายเลข (7) คือเอนไซม์ poly(glutamic acid) synthetase (PgsBCA) การสังเคราะห์กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ ขั้นที่ 1 การสังเคราะห์กรดกลูตามิก ทั้งชนิด L- และ D-ไอโซเมอร์ โดยการใช้อคริติก (Citric acid) เป็นซับสเตรต ถูกเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนเป็นกรดไอโซซิทริกและเปลี่ยนเป็นกรดแอลฟาคีโตกลูตาริก ( $\alpha$ -ketoglutaric acid) ตามลำดับ ในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิก (Tricarboxylic acid cycle: TCA cycle) จากนั้นกรดแอลฟาคีโตกลูตาริกจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดกลูตามิกชนิดแอล (L-glutamic acid) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutamate dehydrogenase (GD) ร่วมกับการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และอีกกรณีหนึ่งคือมีการสร้างกรดกลูตามิกชนิดแอล จากแอลกลูตามีน (L-glutamine) ร่วมด้วยโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutamate 2-oxoglutarate aminotransferase (GOGAT) เอนไซม์ Glutamine synthetase (GS) และการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งกรดกลูตามิกชนิดแอล ที่สร้างได้ทั้งหมดนี้ ส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นกรดดีกลูตามิก (D-glutamic acid) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ L-glutamic acid pyruvic acid aminotransferase เอนไซม์ alanine racemase และเอนไซม์ D-glutamic acid pyruvic acid aminotransferase ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 และกรดกลูตามิกชนิดแอล อีกส่วนหนึ่งจะเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 โดยตรง เพื่อสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก (Poly- $\gamma$ -glutamic acid; PGA) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ poly(glutamic acid) synthetase (PgsBCA) ร่วมกับ ATP และปลดปล่อยกรดพอลิแกมมากลูตามิก ออกสู่ภายนอกเซลล์ต่อไป (Kunioka, 1995; ญัฐวุฒิ และคณะ, 2556)



ภาพที่ 2.2 วิธีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก ของ *Bacillus subtilis* IFO3335

ที่มา : Shih และ Van (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 การประยุกต์ใช้กรดพอลิแกมมากลูตามิก

ด้านอุตสาหกรรมอาหาร พบว่า การใช้กรดพอลิแกมมากลูตามิก เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง จะส่งผลกระทบต่อรสชาติอาหารน้อยกว่าสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งชนิดอื่นๆ ในอุตสาหกรรมเบเกอรี่ พบว่ากรดพอลิแกมมากลูตามิก มีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์และลดการดูดซับน้ำมันในเบเกอรี่ ลดการดูดซับน้ำมันของโดนัท พบว่าเมื่อเติมกรดพอลิแกมมากลูตามิก ปริมาณ 1 กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักโดนัททอด จะทำให้ลดการดูดซับน้ำมันและทำให้มีการยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยรวมของผู้บริโภคดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโดนัททอดที่ไม่มีการเติมกรดพอลิแกมมากลูตามิก และการเติมกรดพอลิแกมมากลูตามิก ในแป้ง สปองจ์เค้ก พบว่าสามารถปรับปรุงเนื้อสัมผัสของเค้กสปองจ์ได้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ กรดพอลิแกมมากลูตามิก ส่งผลให้ความคงตัวในการขึ้นโฟมและค่าความหนืดของแป้งสปองจ์เค้กสูงขึ้น นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดพอลิแกมมากลูตามิก เป็นสารลดความขมของอาหาร โดยการเติมเข้าไปในอาหารที่มีรสขมต่างๆ เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ ควินิน คาเฟอีน และแร่ธาตุต่างๆ การเติมกรดพอลิแกมมากลูตามิก หรือเกลือที่รับประทานได้ในทางอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อาหารที่ผลิตจากแป้งขนมอบ และการผลิตก๋วยเตี๋ยวเพื่อเป็นการยืดอายุการเก็บรักษา และการทำให้สภาพอาหารคงรูปทรง นอกจากนี้ยังมีการใช้ กรดพอลิแกมมากลูตามิก ในการทำให้ไอศกรีมคงสภาพไม่ละลาย รวมถึงการใช้เป็นสารเพิ่มความเหนียวหนืดในน้ำผลไม้และเพิ่มรสชาติกับเครื่องดื่มได้ดีขึ้น (Mitsuiki *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2012; Shyu and Sung, 2010; Yokoigawa *et al.*, 2006) นอกจากนี้กรดพอลิแกมมากลูตามิก ยังถูกนำไปใช้เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งสำหรับการทำแห้งของเชื้อ โปรไบโอติกโดยกระบวนการระเหิดแบบเย็นเพื่อปรับปรุงการรอดชีวิตในกระบวนการผลิต (Bhat *et al.*, 2013) ด้านสุขภาพพบว่ากรดพอลิแกมมากลูตามิก ช่วยเพิ่มศักยภาพการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน ช่วยรักษาโรคกระดูกได้ ช่วยในการดูแลช่องปาก ลดอัตราการเป็นโรคเบาหวาน ป้องกันการเป็นโรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น (Tanimoto, 2010)

Bhat และคณะ (2015) ศึกษาการใช้กรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Bifidobacterium* ให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำผลไม้ที่เป็นกรด นอกจากนี้แล้วกรดพอลิแกมมากลูตามิกยังสามารถปกป้องแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Bifidobacterium* ให้มีชีวิตอยู่รอดได้นานขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกรดในกระเพาะ

ด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง มีการเติมกรดพอลิแกมมากลูตามิกลงในครีมบำรุงผิวและมาสก์บำรุงผิวหน้า เพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว และช่วยลดริ้วรอย

ด้านการแพทย์ใช้กรดพอลิแกมมากลูตามิกเติมลงในสเปรย์เพื่อให้ความชุ่มชื้นภายในช่องปาก Yamamoto และคณะ (2016) ทำการศึกษาเรื่อง การทดสอบประเมินผลสภาวะแวดล้อมภายในปากที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อใช้สเปรย์ให้ความชุ่มชื้นในช่องปากที่มีส่วนผสมของกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยทำการสุ่มตัวอย่างอาสาสมัครเพื่อทำการทดสอบ ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มการทดลองจำนวน 50 คน ใช้สเปรย์ที่มีส่วนผสมของกรดพอลิแกมมากลูตามิก กลุ่มควบคุม 1 จำนวน 20 คน ใช้น้ำกลั่นสเตอไรด์ และกลุ่มควบคุม 2 จำนวน 32 คน ไม่มีการใช้สารใด ๆ และทดสอบการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส โดยการวัดด้วยวิธี salivary amylase monitor วัดความชุ่มชื้นภายในปากด้วยวิธี Mucusc และทดสอบการกระตุ้นอัตราการไหลของ น้ำลายด้วยวิธี Saxon test พบว่ากลุ่มการทดลอง ใช้สเปรย์ที่มีส่วนผสมของกรดพอลิแกมมากลูตามิก มีอัตราการไหลของน้ำลายเพิ่มขึ้น ในขณะที่กลุ่มการทดลองกลุ่มควบคุม 1 และกลุ่มควบคุม 2 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ภายในช่องปาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

กรดพอลิแกมมากลูตามิก เป็นผลผลิตหลักของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ได้แก่ *B. licheniformis* *B. subtilis* *B. megaterium* *B. pumilis* *B. mojavensis* และ *B. amyloliquefaciens* (Bajaj and Singhal, 2011a) Sundhagul และคณะ (1972) ได้ศึกษาแบคทีเรียในตัวอย่าง ถั่วเน่าที่ผลิตและจำหน่ายในตลาดเขตจังหวัดลำพูน และลำปาง พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนยาว มีเอนโดสปอร์ ซึ่งเมื่อทดสอบทางชีวเคมีเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* (natto) และ *B. subtilis* พบว่าเป็น *B. subtilis* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแกรมลบท่อนสั้น ไม่มีเอนโดสปอร์ และแบคทีเรียแกรมบวก ท่อนสั้น ไม่มีเอนโดสปอร์ และเมื่อนำทั้งหมดไปใช้เป็นกล้าเชื้อตั้งต้นในการหมักถั่วเน่า พบว่ามี 2 ไอโซเลต ที่เป็น *B. subtilis* ที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่คล้ายถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่น (natto) มาก นอกจากนี้ Inatsu และคณะ (2002) ได้แยกแบคทีเรียจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่า *B. subtilis* 63 ไอโซเลต จากทั้งหมด 90 ไอโซเลต มีความสามารถในการผลิตกรดพอลิแกมมา-กลูตามิก ทดสอบจากการเลี้ยงบนอาหาร GSP agar (glutamic acid, sucrose และ phyton) ที่เติม L-glutamate ในอาหาร และ รัศมีกร (2544) ได้คัดแยกแบคทีเรียจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย ซึ่งสามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ได้ที่อุณหภูมิสูงและได้หาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต โดยพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต RS2 ที่สามารถเจริญใน PGA producing medium ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 1 % และโซเดียมกลูตาเมต 6 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และอัตราให้อากาศ 200 รอบต่อนาที สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ได้ 8.75 กรัมต่อลิตร Ju และคณะ (2014) ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* MJ80 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน พบว่า *B. subtilis* MJ80 สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ได้ 75.5 กรัมต่อลิตร และ 68.7 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 3 ลิตร และ 300 ลิตร ตามลำดับ หมักเป็นเวลา 3 วัน Kunioka และ Atsuo (1995) ได้คัดแยกแบคทีเรียจากอาหารพื้นเมืองของญี่ปุ่น (natto) และจัดจำแนกว่าเป็นสายพันธุ์ *B. subtilis* IFO3335 ซึ่งสามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ได้ 9.6 กรัมต่อลิตร ในอาหารซึ่งประกอบด้วยกรดซิตริก และกรดกลูตามิก และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยกรดพอลิแกมมากลูตามิก ที่ผลิตได้จะไม่มีพอลิแซคคาไรด์ปนเปื้อนมาด้วย นอกจากนี้ได้มีการแยกแบคทีเรีย *B. subtilis* F-2-01 จากดิน และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก พบว่าผลิตได้ปริมาณสูงสุด 50 กรัมต่อลิตร และพบว่าเชื้อที่แยกได้ต้องการกรดกลูตามิกจากภายนอกในการนำไปสร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิก (Kubota et al., 1993)

## 2.5 การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย

งานวิจัยหลายงานที่ค้นคว้าเกี่ยวกับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นการหาปริมาณของสารอาหารและสภาวะที่เหมาะสมที่แบคทีเรียต้องการ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ให้ได้ผลผลิตสูงและได้มวลโมเลกุลตามที่ต้องการ (Ogunleye et al., 2015) แบคทีเรียที่ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มที่ต้องการกรดกลูตามิกชนิดแอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ (L-glutamic acid dependent bacteria) ได้แก่ *B. subtilis* (chungkookjang) *B. licheniformis* 9945a *B. subtilis* CGMCC 0833 (Ashiuchi et al., 2001; Birrer et al., 1994; Wu et al., 2010) การเติมกรดกลูตามิกชนิดแอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กลุ่มที่ไม่ต้องการกรดกลูตามิกชนิดแอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ (L-glutamic acid independent bacteria) ได้แก่ *B. subtilis* C1 *B. subtilis* C10 *B. amyloliquefaciens* LL3 (Shih *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012b; Cao *et al.*, 2011)

Yao และคณะ (2010) พบว่า *B. subtilis* NX-2 จะใช้กลูโคสสำหรับการเจริญเติบโต และผลิตพลังงานระหว่างการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ในขณะที่กรดกลูตามิกชนิดแอลจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก Yao และคณะ (2010) จึงใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation) เพื่อเติมกลูโคส และกรดกลูตามิกชนิดแอล 40 กรัมต่อลิตรที่เติมลงไปจะถูกใช้หมด พบว่าได้ผลผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก 42 กรัมต่อลิตร การใช้แหล่งอาหารที่เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารหรือวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ได้ Zhang และคณะ (2012a) ได้ผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* NX-2 เลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากกากน้ำตาลและของเสียจากการผลิตผงชูรส พบว่าการใช้ปริมาตรทำงาน 4.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 7.5 ลิตร จะได้ผลผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก 33.6 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเท่ากับ 0.006 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยการหมักแบบกะ และ 51.1 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเท่ากับ 0.53 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยการหมักแบบกึ่งกะ และเมื่อใช้อาหารที่เตรียมจากของเสียจากการผลิตผงชูรสจะได้ผลผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก 52.1 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเท่ากับ 0.54 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยการหมักแบบกึ่งกะ Zhu และคณะ (2014) ใช้เส้นใยต้นข้าวโพดเป็นแหล่งอาหารให้กับ *B. subtilis* HB-1 เพื่อใช้ผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก พบว่า *B. subtilis* HB-1 สามารถผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ได้ 24.92 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาตรทำงาน 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร อัตราการผลิตเท่ากับ 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยการหมักแบบกะ

นอกจากนี้ยังมีสารอนินทรีย์อื่นๆ ที่มีความจำเป็นต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก เช่น แอมโมเนียมไอออน ( $\text{NH}_4^+$ ) (Yoon *et al.*, 2000; Ashiuchi *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2005) แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิต และโครงสร้างของกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ด้วย Huang และคณะ (2011) พบว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยลดความหนืดของอาหาร และเพิ่มการใช้กรดกลูตามิกที่เติมลงไปได้อย่างมีประสิทธิภาพถึง 11.4 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มผลผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ด้วย

## 2.6 การผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกโดยกระบวนการหมักโดยการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึม

Goto และคณะ (1991) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยเชื้อ *B. subtilis* IF03335 เมื่อใช้กลูโคส กรดซิตริก กรดแอลมาริก กรดซัคซินิค และกรดฟูมาริก เป็นแหล่งคาร์บอนที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกที่มีส่วนผสมของกรดแอล-กลูตามิก และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าพีจีเอถูกผลิตขึ้นจำนวนมากสูงสุดเมื่อเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในทางตรงกันข้าม เมื่อเติมกลูโคสลงในอาหารที่มีกรดกลูตามิก พบว่าเกิดผลพลอยได้ที่เปปไทด์ไฮดรอลิก แต่อาหารที่เติมกรดซิตริกไม่เกิดผลพลอยได้

Sung และคณะ (2000) การเลี้ยงเชื้อโดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะๆ โดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* ในการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก พบว่าการหมักโดยใช้กรดซิตริก 1.44 กรัมต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และแอล-กลูตามิก 2.4 กรัมต่อชั่วโมง สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ถึง 37 กรัมต่อลิตร ต่อผลผลิต 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเชื้อใช้กรดซัลฟูริกไปแล้วครึ่งหนึ่งของการหมัก

Bajaj และ Singhal (2009) ได้ทำการศึกษาผลของการเติมกรดอะมิโนที่แตกต่างกันทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ อะลานีน กลูตามีน อาร์จินีน แอสปาร์ติก ออร์นิติน โพรลีน และ สารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ ได้แก่ แอลฟา-คีโตกลูตาริก กรดมาลิก กรดซัคซินิก และกรดไพรูวิก เป็นสารตั้งต้นของการเผาผลาญอาหารในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* NCIM 2324 พบว่าการเติมแอล-กลูตามีน ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ผลผลิตที่ได้สูงสุดของกรดพอลิแกมมากลูตามิกเท่ากับ 31.40 กรัมต่อลิตร และ การเติมแอลฟา-คีโตกลูตาริก ผลผลิตที่ได้สูงสุดของกรดพอลิแกมมากลูตามิกเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ 35.75 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับกรณีที่ไม่มีการเติมสารตั้งต้น

Shih และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* C1 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและกรดพอลิแกมมากลูตามิก ได้รับการศึกษาว่าเชื้อชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดได้โดยไม่อาศัยแอล-กลูตามีน ผลผลิตที่ผลิตได้มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 21.44 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 37 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน โดยนำหมักโมเลกุลเฉลี่ยอยู่ที่  $1 \times 10^7$  ดาลตัน นำหมักโมเลกุลที่อยู่ในสภาวะเกลือที่เป็นกลางในการหมัก พบว่านำหมักโมเลกุลที่มากที่สุดที่ค่าเท่ากับ  $7.94 \times 10^6$  ดาลตัน ที่ pH 7.15 NaCl 0.05 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 4 วัน

Peng และคณะ (2015) ได้ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. methylotrophicus* ศึกษาผลของการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่มีผลต่อการผลิตแหล่งที่มาของคาร์บอน เช่น โซเดียมกลูตาเมต กลูโคส กลีเซอรอล สารละลายแป้ง แอลฟา-แลคโตส มอลโตส ซูโครส กรดซัลฟูริก และ ฟรุกโตส โดยการศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยเปรียบเทียบกับการผลิตโดยแบคทีเรียที่ใช้กลูตามิกซึ่งผลิตได้ 33.8-35.34 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล 30 กรัมต่อลิตร โซเดียมซัลเฟต 15 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 50 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดพอลิแกมมา กลูตามิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากเกินกว่า 10,000 กิโลดาลตัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

### 3.1 วัสดุดิบ

#### 3.1.1 เชื้อที่ใช้

*Bacillus licheniformis* SRU01

*Bacillus megaterium* SRU 02

### 3.2 สารเคมี

#### 3.2.1 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ (Pre-incula)

Agar agar, Difco, U.S.A

Tryptone, Difco, U.S.A

Yeast extract, Difco, U.S.A

Sodium chloride, Carlo Erba, Italy

#### 3.2.2 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

Ammonium chloride, Scharlau, Barcelona

Calcium chloride, Carlo Erba, Italy

Citric acid, Univar, Australia

Dipotassium phosphate, Merck, Germany

Glucose, Univar, Australia

Glutamic acid, Himedia, india

$\alpha$  -ketoglutamic, Sigma, U.S.A

Magnesium sulfate heptahydrate, merck, Germany

Manganese Sulfate, Carlo Erba, Italy

Potassium dihydrogen phosphate, Carlo Erba, Italy

#### 3.2.3 สำหรับการวิเคราะห์ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

Dinitrosalicylic acid (DNS), Carlo Erba, Italy

Sodium hydroxide, Carlo Erba, Italy

Potassium sodium tartrate, Carlo Erba, Italy

#### 3.2.4 สำหรับการวิเคราะห์ค่ากรดแกมมาพอลิกลูตามิก

Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), Calbiochem, India

Ethyl alcohol 95%

Sodium hydroxide, Univar, Australia

Poly-L- $\gamma$ -glutamic acid sodium, Sigma, U.S.A

#### 3.2.5 สำหรับการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออน

Phenol-nitroprusside

Hypochlorite reagent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 อุปกรณ์

เครื่องชั่ง (Balance)	(Mettler Toledo, Germany)
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	(Heraeus, Germany)
ตู้อบเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	(Heraeus, Germany)
ตู้แช่แข็ง (Freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	(Sanyo, Japan)
ตู้ดูดควัน (Fume hood)	(Heraeus, Germany)
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow): ABS 1200	(BossTech, Thailand)
ไมโครเวฟ (Microwave): MR-30A	(Electrolux, China)
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	(Memmer, Germany)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)	(tommy, Japan)
ไมโครปิเปต (Micropipette)	(Brand, Germany)
เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)	(Scientific industris, USA)
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter)	(inolab, Germany)
เครื่อง High speed Centrifuge : 3804R	(Appendrop, Germany)
หลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge tube)	(Appendrop, Thailand)

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

##### 3.4.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหัวเชื้อ

เตรียมอาหารเหลวและอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) ซึ่งประกอบด้วย Yeast extract 10 กรัม Tryptone 10 กรัม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้ได้ 7.0 และอาหารแข็งเตรียมโดยเติมวุ้น เป็นร้อยละ 2 ของอาหารเหลวนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

##### 3.4.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงมาจาก Cesaro และคณะ (2014) แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารอาหาร	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
กรดกลูตามิกชนิดแอล	20
กลูโคส	20
NH <sub>4</sub> Cl	7
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.04
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.15
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.04
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมโดยชั่งส่วนประกอบตามตารางที่ 1 ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้ได้ 7 โดยใช้ NaOH หรือ HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

### 3.4.1.3 การเลี้ยงเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อโดยนำเชื้อจากตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงโดยการ streak เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU01 และ *B. megaterium* SRU 02 ลงในเพลทที่มีอาหารวุ้นแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บโคโลนีเดี่ยวโดยเลี้ยงในอาหารวุ้นเอียง LB และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง streak เชื้อ *B. licheniformis* SRU01 และ *B. megaterium* SRU 02 มาทำการเชื้อเชื้อ 1 โคโลนีใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารเหลว LB และเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปรับค่าความขุ่นเป็น  $1.0 \pm 0.1$  OD ที่ 600 นาโนเมตรและเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ E ที่ 10% โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.4.2 การศึกษาผลการเติมกรดกลูตามิกต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของแบคทีเรีย *B. licheniformis* SRU01 และ *B. megaterium* SRU 02

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.4.1.3 ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 แบบ คืออาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงมาจาก Cesaro และคณะ (2014) และอาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงมาจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่ไม่เติมกรดแอล-กลูตามิก 225 มิลลิลิตร และเติมเชื้อปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 72 ชั่วโมงไปตรวจวิเคราะห์ค่าปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก และปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง

3.4.3 การศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นในการเติมการสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้กระบวนการหมักด้วยเชื้อ *B. licheniformis* SRU01 และ *B. megaterium* SRU 02

#### 3.4.3.1 การทดลองเพื่อหาอิทธิพลของปัจจัยจากแบบจำลอง

การทดลองเพื่อหาอิทธิพลของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง ปริมาณกรดกลูตามิก และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และใช้การออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ที่มีปัจจัย 3 คือ กรดแอลฟา-คีโตกลูตาริก ( $X_1$ ) แอล-กลูตามีน ( $X_2$ ) และ กรดซิตริก ( $X_3$ ) ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินการ ดังนี้

##### 1. การกำหนดระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

การกำหนดระดับปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย โดยพิจารณาจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และการทดลองเบื้องต้นซึ่งระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมี 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) โดยมีค่าแอลฟา ( $\alpha$ ) เท่ากับ 1.68 ดังแสดงในตารางที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ปัจจัยละระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

	ปัจจัย	ระดับ				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
$X_1$	กรดแอลฟา-คีโตกลูตาริก (มิลลิโมลาร์)	1.59	5	10	15	18.41
$X_2$	แอลกลูตามีน (มิลลิโมลาร์)	0.08	0.25	0.5	0.75	0.92
$X_3$	กรดซิตริก ( $X_3$ ) (กรัม/ลิตร)	11.59	15	20	25	28.41

## 2. การออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD)

ในการทดลองการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU01 และ *B. megaterium* SRU 02 ได้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติกำหนดลำดับการทดลองและออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ที่มีปัจจัย 3 แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับและมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 6 ครั้ง ดังนั้นจึงมีจำนวนหน่วยการทดลองทั้งหมด 20 หน่วย ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ลำดับการทดลองของการออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ที่มี 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับและมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 6 ครั้ง

Std Order	Run Order	Block	$X_1$	$X_2$	$X_3$
			A:แอลฟา-คีโตกลูตามิก	B:กลูตามีน	C:กรดซิตริก
16	1	Block 1	0	0	0
6	2	Block 1	+1	-1	+1
18	3	Block 1	0	0	0
4	4	Block 1	+1	+1	-1
15	5	Block 1	0	0	0
17	6	Block 1	0	0	0
7	7	Block 1	-1	+1	+1
8	8	Block 1	+1	+1	+1
5	9	Block 1	-1	-1	+1
14	10	Block 1	0	0	+1.68
9	11	Block 1	-1.68	0	0
11	12	Block 1	0	-1.68	0
20	13	Block 1	0	0	0
10	14	Block 1	+1.68	0	0
1	15	Block 1	-1	-1	-1
3	16	Block 1	-1	+1	-1
19	17	Block 1	0	0	0
12	18	Block 1	0	+1.68	0
13	19	Block 1	0	0	-1.68
2	20	Block 1	+1	-1	-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกด้วยการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึม โดยใช้กระบวนการหมักจากเชื้อ *B. licheniformis* SRU01 และ *B. megaterium* SRU 02

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.4.1.3 ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ที่ไม่เติม กรดกลูตามิกดัดแปลงมาจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่มีการเติมแอลฟา-คีโตกลูตาริก แอล-กลูตามีน และกรดซิตริก ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันจำนวน 20 ชนิดตามลำดับการทดลองที่กำหนดไว้ในตารางที่ 3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ เก็บตัวอย่างที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ค่า ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และปริมาณแอมโมเนียไอออน

### 3.4.3.2 การตรวจวิเคราะห์ค่าผลการทดลอง

#### 1. การตรวจวิเคราะห์ค่าน้ำหนักรเซลล์แห้ง

เตรียมฟรอยด์ที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน ทำการปิเปตสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่เตรียมไว้ และนำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนน้ำที่เป็นอาหารเก็บไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ต่อบริเวณเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโบลติกเคเตอร์ ซึ่งน้ำหนักที่แน่นอน คำนวณหาน้ำหนักแห้ง (X) ในหน่วยกรัมต่อลิตรโดยใช้สูตร (Ashiuchi และคณะ, 1999) ดังแสดงในสมการที่ 3.1

$$X \left( \frac{\text{กรัม}}{\text{ลิตร}} \right) = \frac{\text{น้ำหนักหลอดทดสอบและเซลล์แห้ง(กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดทดสอบ (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}} \quad (3.1)$$

#### 2. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิธี DNS

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที นำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank (Miller และคณะ, 1959)

#### 3. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก

การแยกกรดพอลิแกมมากลูตามิก ออกจากสารละลายตัวอย่างโดยใช้เอทานอลเย็น 3 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง โดยสารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาทำการแยกตะกอน กรดพอลิแกมมากลูตามิก ออกจากสารละลายโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนไว้แล้วเติมน้ำกลั่นใส่ลงไป 7 มิลลิลิตร นำไปแยกตะกอนโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสเพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก (Chintrakool และคณะ, 2014) ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ กรดพอลิแกมมากลูตามิก ด้วยวิธี cetylmeethylammonium bromide (CTAB) ความเข้มข้น 0.07 โมลาร์ โดยปิเปตส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอน กรดพอลิแกมมากลูตามิก ออกจากสารละลายตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตรผสมกับ CTAB 2 มิลลิลิตร และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นวัดความเข้มข้น กรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยการวัดสเปกโตรมิเตอร์ที่ 400 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดพอลิแกมมากลูตามิกเป็นสารมาตรฐาน (Kongklom และคณะ, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 7 จากนั้นนำตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร เติม phenol-nitroprusside ความเข้มข้น 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม hypochlorite ความเข้มข้น 15 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที รอให้เปลี่ยนสี นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร (SalÓrzano, 1969)

#### 5. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูตามิก

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร แต่ละหลอดเติมสารละลาย FDNB 0.0060 โมลาร์ 400 ไมโครลิตร สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ pH 8.2 – 8.5 1 มิลลิลิตร และสารละลาย อะซิโตนไนไตร์ 4 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันและนำไปตั้งทิ้ง ไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ แล้วนำไปแช่ในน้ำเย็น เพื่อให้เย็นลง จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ 150 ไมโครลิตร ทำการปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ด้วยอะซิโตนไนไตร์ (1:10) แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 356 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Paraskevas และคณะ, 2002)

##### 3.4.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

##### 1. การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

เป็นการตรวจสอบข้อมูลที่ได้จากการทดลองก่อนนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยข้อมูลที่ได้จากการทดลองต้องเป็นไปตามสมมติฐาน 3 ข้อ คือ (1) ส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ (2) ค่าส่วนตกค้างมีความเป็นอิสระต่อกัน และ (3) ค่าความแปรปรวนมีเสถียรภาพ ถ้าหากค่าส่วนตกค้างเป็นไป ตามสมมติฐานทั้ง 3 ข้อ จะถือว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองมีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน

##### 2. การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ

เป็นการวิเคราะห์ว่าการออกแบบที่ใช้การทดลองมีความเหมาะสมหรือไม่ ซึ่งในการทดลองทุกครั้งจะต้องมีความผันแปรที่อธิบายไม่ได้หรือคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ การออกแบบการทดลองที่ดีจะต้องทำให้เกิดความผันแปรที่อธิบายไม่ได้น้อยที่สุดค่าประสิทธิ์ของการตัดสินใจสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3.2

$$\text{สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ} = \frac{\text{ความผันแปรที่อธิบายได้} \times 100}{\text{ความผันแปรทั้งหมด}} \quad (3.2)$$

##### 3. การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเป็นการตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลองโดยพิจารณาจากค่า P-value ของเทอมต่าง ๆ ในตารางของการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ได้เปรียบเทียบกับค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด

##### 4. การสร้างสมการทำนายปริมาณของผลการทดลอง

การสร้างสมการทำนายปริมาณของผลการทดลอง โดยนำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของผลการทดลอง มาเขียนให้อยู่ในรูปของสมการที่ 3.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.3)$$

#### 5. การสร้างพื้นผิวตอบสนองของผลการทดลอง

เมื่อได้สมการสำหรับทำนายผลการทดลองแล้วจึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณผลการทดลองเทียบกับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง คือ กรดแอลฟา-คีโตกลูตาริก แอล-กลูตามีน และกรดซิตริกโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

#### 6. การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้ปริมาณผลการทดลองมากที่สุด โดยใช้ฟังก์ชัน Response optimizer ในโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติซึ่งเป็นฟังก์ชันที่ใช้ค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยและใช้วัดความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบ (Composite desirability :D) ซึ่งค่าความพึงพอใจของผลตอบมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 ถ้า D มีค่าเท่ากับ 1 หมายถึง ผลตอบนั้นได้รับความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 ผลของกรดกลูตามิกต่อการผลิตกรดโพลิแกมมากลูตามิกของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* SRU01 และ *Bacillus megaterium* SRU 02

การเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* SRU01 และ *B. megaterium* SRU 02 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 แบบ คืออาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลง Cesaro และคณะ (2014) ที่เติมกรดแอลกลูตามิก และที่ไม่เติมแอลกลูตามิก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่า *B. licheniformis* SRU 01 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดแอลกลูตามิกจะมีการผลิตกรดโพลิแกมมากลูตามิกในปริมาณมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดแอลกลูตามิก และยังพบอีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดแอลกลูตามิกจะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่น้อยกว่า จากที่กล่าวมาข้างต้น แสดงว่า *B. licheniformis* SRU 01 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแอลกลูตามิกจะทำให้มีแอลกลูตามิกที่มากขึ้นที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ กรดโพลิแกมมากลูตามิกให้ได้ปริมาณกรดโพลิแกมมา-กลูตามิกที่มากกว่าในอาหารเลี้ยงที่ไม่เติมแอลกลูตามิก ในขณะที่ *B. megaterium* SRU 02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดแอลกลูตามิกสามารถสังเคราะห์ กรดโพลิแกมมากลูตามิกได้ปริมาณมากกว่าในอาหารเลี้ยงที่เติมแอลกลูตามิก

ตารางที่ 4.1 ปริมาณกรดโพลิแกมมากลูตามิกที่ผลิตโดย *B. licheniformis* SRU01 และ *B. megaterium* SRU 02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่เติมและไม่เติมกรดแอลกลูตามิก

สภาวะอาหาร	กรดโพลิแกมมากลูตามิก (กรัมต่อลิตร)	
	<i>B. licheniformis</i> SRU01	<i>B. megaterium</i> SRU 02
เติมกรดแอลกลูตามิก	0.009±0.00	0.041±0.01
ไม่เติมกรดแอลกลูตามิก	0.002±0.00	0.069±0.009

สรุปได้ว่า *B. licheniformis* SRU 01 ที่ผลิตกรดโพลิแกมมากลูตามิกเป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid dependent คือเป็นกลุ่มที่ต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอกเพิ่มเข้าไปในสารอาหารเพื่อจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพลิแกมมากลูตามิกในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น *B. megaterium* SRU 02 ที่ผลิตกรดโพลิแกมมากลูตามิกเป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid independent คือ กลุ่มที่ไม่ต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอก เพื่อการผลิตกรดโพลิแกมมากลูตามิก เช่นเดียวกับการทดลอง Kongklom และคณะ (2015) ที่ศึกษาการผลิตกรดโพลิแกมมากลูตามิกจากเชื้อ *B. licheniformis* TISTR 1010 โดยการเปรียบเทียบวิธีการเติมสารตั้งต้น พบว่าสามารถระบุได้ว่าเชื้อ *B. licheniformis* TISTR 1010 จัดอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการกรดแอลกลูตามิกในการสร้างกรดโพลิแกมมากลูตามิก ในขณะที่เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ต้องการกรดกลูตามิกในการสร้างกรดโพลิแกมมากลูตามิก จากงานวิจัยของ Cao และคณะ (2011) ที่ศึกษาการผลิตกรดโพลิแกมมากลูตามิกจากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* LL3 พบว่าสามารถระบุได้ว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* LL3 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการกรดแอลกลูตามิกในการสร้างกรดโพลิแกมมากลูตามิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ศึกษาผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01

### 4.2.1 ผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01

ในการทดลองเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* SRU01 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติกำหนดลำดับและออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ที่มี 3 ปัจจัย คือ กรดแอลฟาดีโตกลูตาริก ( $X_1$ ) แอลกลูตามีน ( $X_2$ ) และกรดแอลฟาดีโตกลูตาริก ( $X_3$ ) โดยมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 6 ครั้ง ดังนั้นจึงมีจำนวนหน่วยทดลองทั้งหมด 20 หน่วยทดลอง เมื่อทำการทดลองผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 ตามลำดับการทดลองและสภาวะที่กำหนดไว้ ผลที่ได้จากการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าการทดลองของผลการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01

ลำดับการทดลอง	ปัจจัยที่ศึกษา			ผลตอบสนอง	
	แอลฟาดีโต- กลูตาริก ( $X_1$ ) (มิลลิโมลาร์)	แอลกลูตามีน ( $X_2$ ) (มิลลิโมลาร์)	กรดซิตริก ( $X_3$ ) (กรัมต่อลิตร)	กรดพอลิแกมมา- กลูตามิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	10	0.92	20	0.72	0.77
2	15	0.25	15	1.196	0.89
3	18.41	0.5	20	1.273	0.89
4	10	0.5	20	1.14	0.85
5	10	0.5	20	1.473	0.62
6	5	0.25	25	1.442	1.00
7	15	0.75	25	1.354	0.52
8	5	0.25	15	1.265	0.75
9	10	0.5	28.41	1.331	0.70
10	1.59	0.5	20	1.631	0.86
11	10	0.5	11.59	1.148	0.73
12	10	0.08	20	1.433	0.65
13	10	0.5	20	0.617	1.04
14	10	0.5	20	1.263	0.73
15	5	0.75	15	1.363	0.80
16	5	0.75	25	1.452	0.79
17	10	0.5	20	1.423	0.74
18	15	0.75	15	1.45	0.79
19	15	0.25	25	1.3202	0.71
20	10	0.5	20	1.381	0.74

### 4.2.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

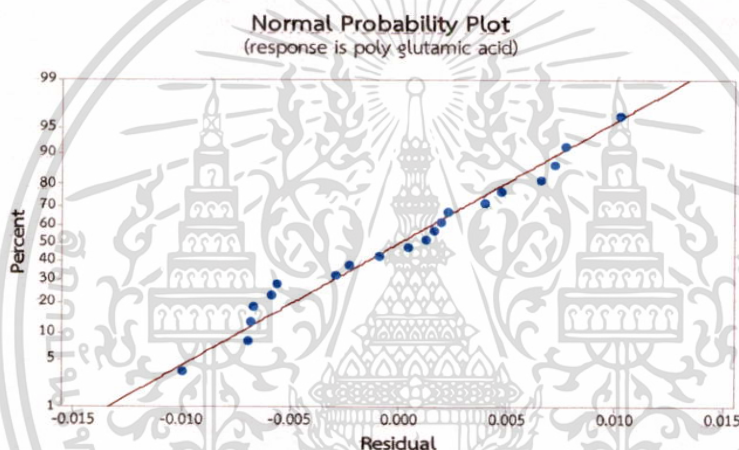
#### 4.2.2.1 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

เมื่อทำการทดลองเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 ทั้ง 20 หน่วยทดลอง แล้วจึงนำผลการทดลองที่ได้มาตรวจสอบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

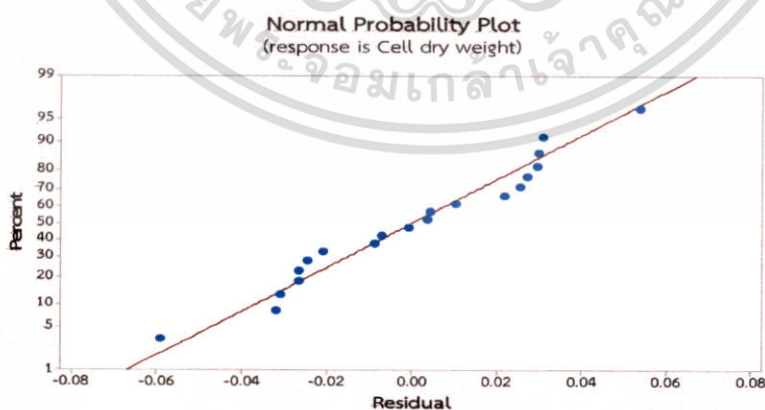
คุณภาพของข้อมูลว่ามีความเหมาะสมหรือไม่ด้วยการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง หากข้อมูลมีความเหมาะสมจึงนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square:R-Sq) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลมี 3 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ (2) การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล และ (3) การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน

(1) การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ

เป็นการตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูลว่ามีการกระจายแบบแจกแจงปกติหรือไม่ จากการพิจารณาการกระจายของค่าส่วนตกค้าง ในภาพที่ 4.1 และ 4.2 ของปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก และปริมาณน้ำหนักรเซลแห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีหมักแบบโบลีซิมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 พบว่ามีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรงทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า ส่วนตกค้างจากผลการทดลองของปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก และปริมาณน้ำหนักรเซลแห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีหมักแบบโบลีซิมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 ไม่แสดงสิ่งผิดปกติให้เห็น จึงสรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ



ภาพที่ 4.1 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก

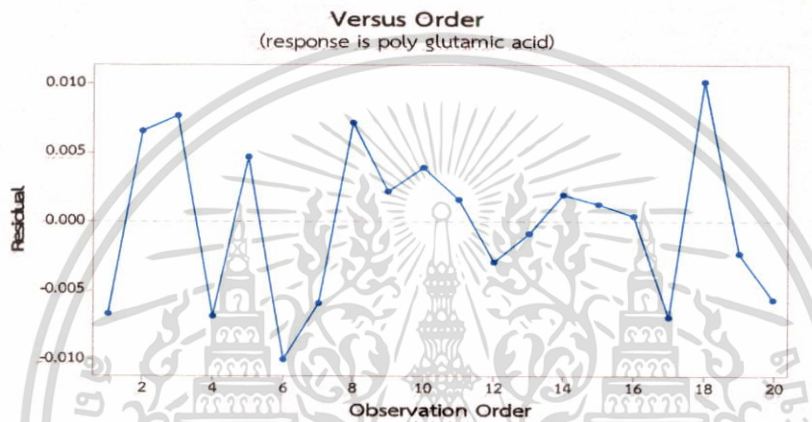


ภาพที่ 4.2 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณน้ำหนักรเซลแห้ง

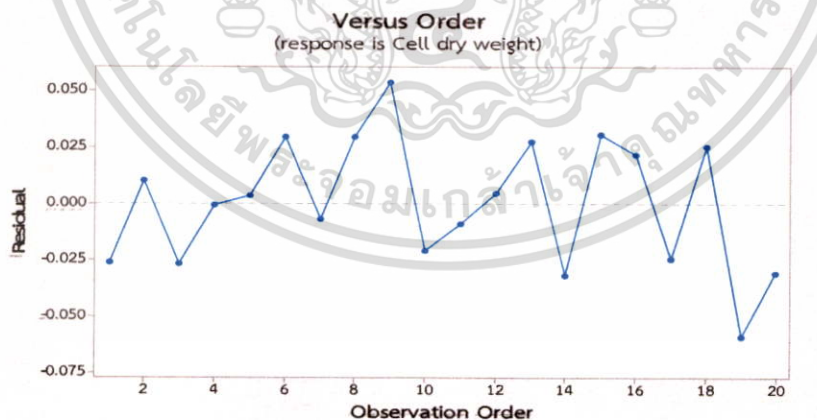
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## (2) การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล

การตรวจสอบความเป็นอิสระของค่าส่วนตกค้างโดยใช้แผนภูมิการกระจายเพื่อสังเกตลักษณะการกระจายของจุดที่แทนข้อมูลบนแผนภูมิว่ามีรูปแบบอิสระหรือไม่ จากการพิจารณาภาพที่ 4.3 และ 4.4 ของปริมาณกรดพอลิแกมมาคลูตามิกและปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาคลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 พบว่า ส่วนตกค้างของผลการทดลองของปริมาณกรดพอลิแกมมาคลูตามิกและปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาคลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 ไม่มีรูปแบบที่แน่นอน หรือไม่สามารถประมาณรูปแบบที่แน่นอนได้ มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ แสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ



ภาพที่ 4.3 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณพอลิแกมมาคลูตามิก

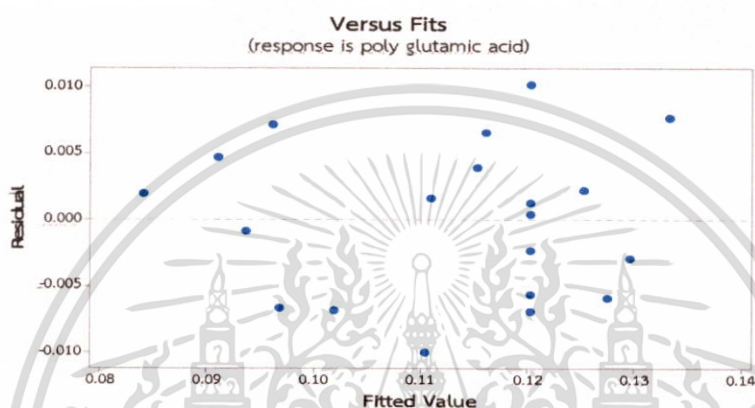


ภาพที่ 4.4 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

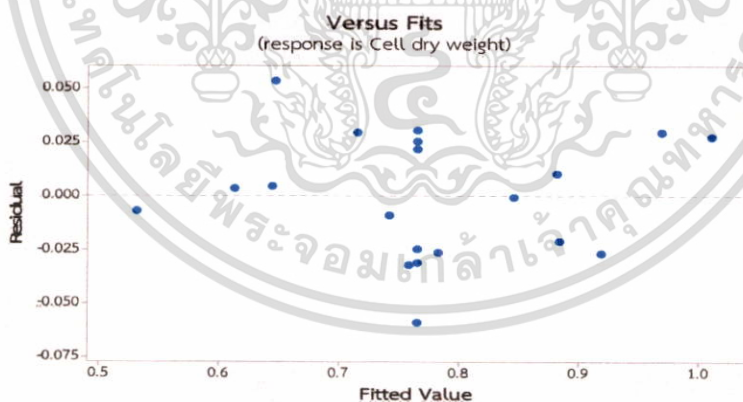
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวนโดยใช้แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย

จากการพิจารณาภาพที่ 4.5 และ 4.6 ของปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก และ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 ตามลำดับ พบว่า ส่วนตกค้างของผลการทดลองของปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกและปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและทางลบ แสดงว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน



ภาพที่ 4.5 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณพอลิแกมมากลูตามิก



ภาพที่ 4.6 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลองของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก และปริมาณน้ำหนักรูบเซลล์แห้งที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 พบว่า ค่าส่วนตกค้างของข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นไปตามสมมติฐานทั้ง 3 ข้อ คือ (1) ส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ (2) ค่าส่วนตกค้างมีความเป็นอิสระต่อกัน และ (3) ค่าความแปรปรวนมีเสถียรภาพ จึงสรุปได้ว่า ข้อมูลที่ได้จากการทดลองชุดนี้มี ความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน

#### 4.2.2.2 ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ

ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Sq) เป็นค่าที่ใช้บอกร้อยละการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามที่สามารถอธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระในสมการถดถอย (ประไพศรี และพงศ์ชนัน, 2551)

##### (1) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นว่า ค่า R-Sq มีค่าเท่ากับ 92.7% หมายความว่า ตัวแปรอิสระได้แก่ กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก แอลกลูตามีน และกรดซิตริก สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามคือปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ ได้ร้อยละ 92.7 แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนาย เพื่อหาค่าผลตอบได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

##### (2) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของปริมาณน้ำหนักรูบเซลล์แห้ง

จากตารางที่ 4.4 จะเห็นว่า ค่า R-Sq มีค่าเท่ากับ 94.48% หมายความว่า ตัวแปรอิสระได้แก่ กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก แอลกลูตามีน และกรดซิตริก สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามคือ ปริมาณน้ำหนักรูบเซลล์แห้งที่ผลิตได้ ได้ร้อยละ 94.48 แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนาย เพื่อหาค่าผลตอบได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก

Factor	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	-3.668	0.566	-6.48	0.000
$\alpha$ -Ketoglutaric acid	0.066	0.035	1.90	0.087
L-Glutamine	3.044	0.695	4.38	0.001
Citric acid	-0.354	0.042	-8.33	0.000
$\alpha$ -Ketoglutaric acid $\times\alpha$ -Ketoglutaric acid	0.001	0.001	1.28	0.230
L-GlutaminexL-Glutamine	-0.592	0.382	-1.55	0.152
Citric acid $\times$ Citric acid	-0.006	0.001	-6.75	0.000
$\alpha$ -Ketoglutaric acid $\times$ L-Glutamine	-0.067	0.026	-2.61	0.026
$\alpha$ -Ketoglutaric acid $\times$ Citric acid	-0.002	0.001	-1.81	0.100
L-Glutamine $\times$ Citric acid	-0.079	0.026	-3.10	0.011

S = 0.09, R-sq = 92.7%, R-sq (adj) = 86%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองขอปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

Factor	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	1.545	0.239	6.47	0.000
$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-0.029	0.0147	-1.95	0.080
L-Glutamine	1.458	0.294	4.96	0.001
Citric acid	-0.0898	0.0179	-5.00	0.001
$\alpha$ -Ketoglutaric acid $\times\alpha$ -Ketoglutaric acid	0.0003	0.0004	0.64	0.536
L-GlutaminexL-Glutamine	-0.4066	0.162	-2.52	0.031
Citric acid $\times$ Citric acid	0.00174	0.0004	4.32	0.002
$\alpha$ -Ketoglutaric acid $\times$ L-Glutamine	-0.031	0.0108	-2.86	0.017
$\alpha$ -Ketoglutaric acid $\times$ Citric acid	-0.00265	0.0005	4.89	0.001
L-Glutamine $\times$ Citric acid	-0.043	0.0108	-3.97	0.003

S = 0.038, R-sq = 94.48%, R-sq (adj) = 90.1

#### 4.2.2.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเป็นการตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลอง

(1) การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ในตารางที่ 4.5 พบว่า ค่า P-value ของเทอมอันตรกิริยามีค่าเท่ากับ 0.000 และเทอมกำลังสองมีค่าเท่ากับ 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด แสดงว่ามีส่วนโค้งเกิดขึ้นที่พื้นผิวตอบสนอง (Montgomery, 2001) ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการแบบจำลองกำลังสองสำหรับทำนายปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิก

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	9	1.032	0.115	14.01	0.000
Lack-of-Fit	5	0.068	0.014	4.92	0.053
Pure Error	5	0.014	0.003	0.00	
Total	19	1.113			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## (2) การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ในตารางที่ 4.6 พบว่า ค่า P-value ของเทอมอันตรกิริยามีค่าเท่ากับ 0.000 และเทอมกำลังสองมีค่าเท่ากับ 0.001 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด แสดงว่ามีส่วนโค้งเกิดขึ้นที่พื้นผิวตอบสนอง (Montgomery, 2001) ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการแบบจำลองกำลังสองสำหรับทำนายปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	9	0.268	0.030	20.32	0.000
Lack-of-Fit	5	0.008	0.002	1.19	0.426
Pure Error	5	0.007	0.001		
Total	19	0.283			

## 4.2.2.4 การสร้างสมการทำนายปริมาณของผลการทดลอง

การสร้างสมการทำนายปริมาณของผลการทดลองได้จากผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 โดยนำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของปริมาณของผลการทดลอง ในตารางที่ 4.3 และ 4.4 มาเขียนให้อยู่ในรูปของสมการดังนี้

## (1) การสร้างสมการทำนายปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก แสดงดังสมการที่ 4.1

$$\begin{aligned} \text{กรดพอลิแกมมากลูตามิก (กรัมต่อลิตร)} = & -3.668 + 0.066 X_1 + 3.044X_2 + 0.354 X_3 - 0.001 X_1^2 \\ & - 0.592 X_2^2 - 0.006 X_3^2 - 0.67 X_1X_2 - 0.002 X_1X_3 \\ & - 0.079 X_2X_3 \end{aligned} \quad (4.1)$$

เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (Lack of fit) ในตารางที่ 4.5 พบว่า ค่า P-value ของ Lack of fit มีค่าเท่ากับ 0.053 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 ทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบบจำลองนี้มีความพอเพียงของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถนำสมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก ที่ได้จากผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 ได้

(2) การสร้างสมการทำนายปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง แสดงดังสมการที่ 4.2

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = & 1.545 - 0.0286 X_1 + 1.458 X_2 - 0.0898 X_3 + 0.0003 X_1^2 \\ & - 0.407 X_2^2 + 0.00174 X_3^2 - 0.031 X_1X_2 + 0.00265 X_1X_3 \\ & - 0.0438 X_2X_3 \end{aligned} \quad (4.2)$$

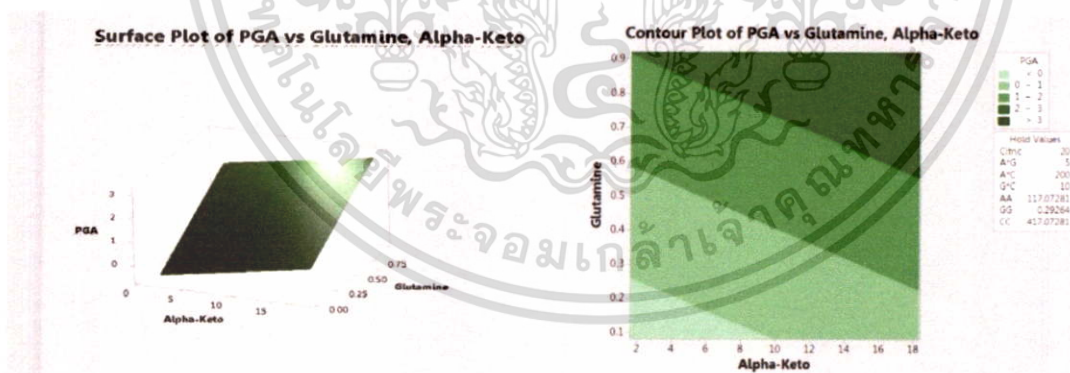
เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (Lack of fit) ในตารางที่ 4.6 พบว่าค่า P-value ของ Lack of fit มีค่าเท่ากับ 0.426 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 มาก ทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบบจำลองนี้มีความพอเพียงของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถนำสมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 ได้

#### 4.2.2.5 การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณผลการทดลอง

เมื่อได้สมการสำหรับทำนายผลการทดลองแล้ว จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวผลตอบของผลการทดลองและกราฟโครงร่าง

##### (1) การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิก

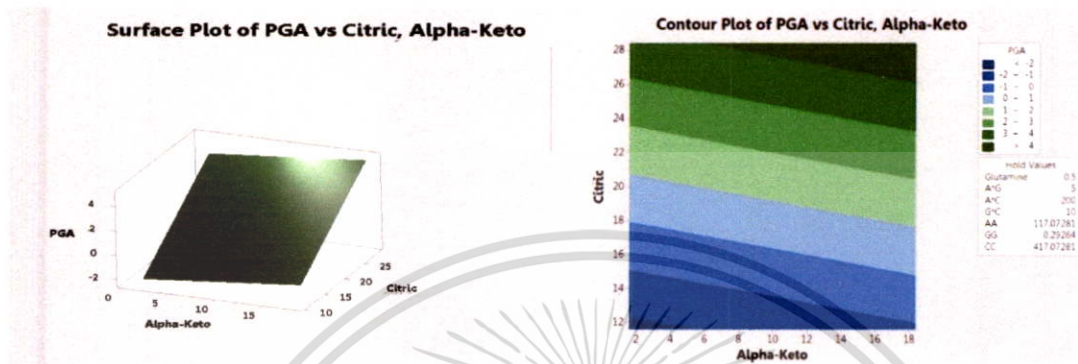
จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริก และกลูตามีน ในภาพที่ 4.7 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดคือ ต้องการปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิกในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กรดซิตริกที่ใช้ในการผลิตคือ 28.4 กรัมต่อลิตร จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิกในการผลิตมากที่สุดคือ แอลฟาคีโตกลูตาริกความเข้มข้น 18.4 มิลลิโมลาร์ และกลูตามีนความเข้มข้น 0.92 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 4.7 พื้นผิวผลตอบและโครงร่างของปริมาณพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริก และกลูตามีนที่ความเข้มข้นกรดซิตริกที่ 28.4 กรัมต่อลิตร

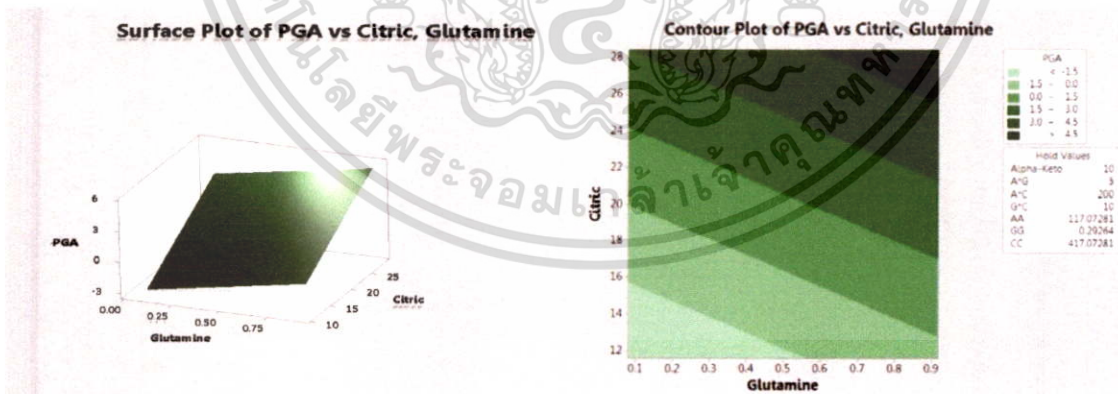
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณพอลิแกมมากลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริก และกรดซิตริกในภาพที่ 4.8 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณพอลิแกมมากลูตามิกในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กลูตามีนที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.92 มิลลิโมลาร์ จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกในการผลิตมากที่สุด คือแอลฟาคีโตกลูตาริกความเข้มข้น 18.4 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกความเข้มข้น 28.4 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.8 พื้นผิวผลตอบและโครงร่างของปริมาณพอลิแกมมากลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริก และกรดซิตริก ที่ความเข้มข้นกลูตามีนที่ 0.92 มิลลิโมลาร์

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีน และกรดซิตริกในภาพที่ 4.9 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณพอลิแกมมากลูตามิกในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้แอลฟาคีโตกลูตาริกที่ใช้ในการผลิตคงที่ 18.4 มิลลิโมลาร์ จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณพอลิแกมมากลูตามิกในการผลิตมากที่สุดคือกรด กลูตามีน ความเข้มข้น 0.92 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกความเข้มข้น 28.4 กรัมต่อลิตร

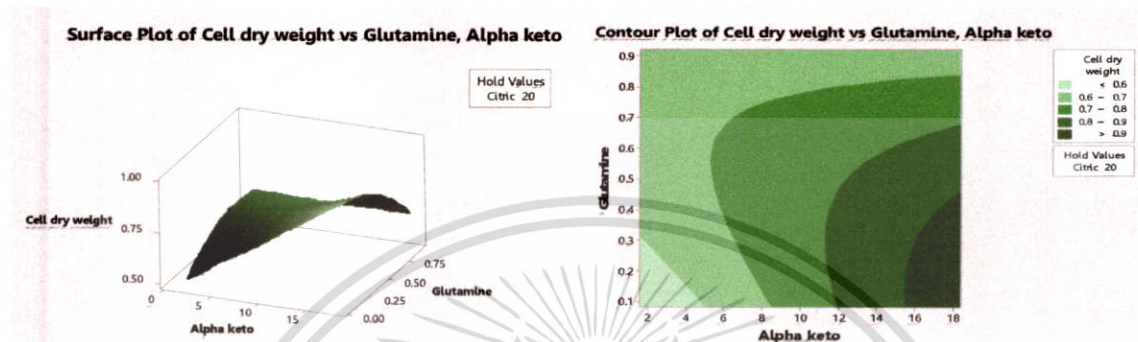


ภาพที่ 4.9 พื้นผิวผลตอบและโครงร่างของปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีนและกรดซิตริก ที่ความเข้มข้นแอลฟาคีโตกลูตาริกที่ 18.4 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

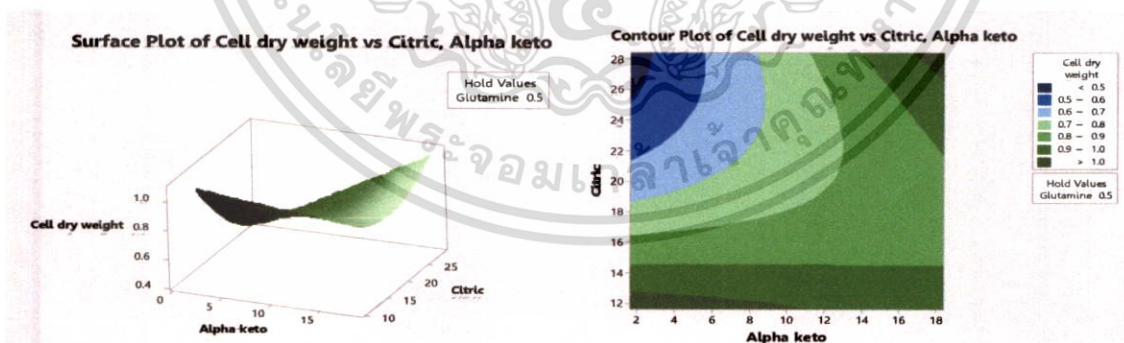
## (2) การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริก และกลูตามีน ในภาพที่ 4.10 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กรดซิตริกที่ใช้ในการผลิตคงที่ 20 กรัมต่อลิตร จะพบว่าค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด คือ แอลฟาคีโตกลูตาริก ความเข้มข้น 18.4 มิลลิโมลาร์ และกลูตามีนความเข้มข้น 0.08 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 4.10 พื้นผิวผลตอบและโครงร่างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริก และกลูตามีน ที่ความเข้มข้นกรดซิตริกที่ 20 กรัมต่อลิตร

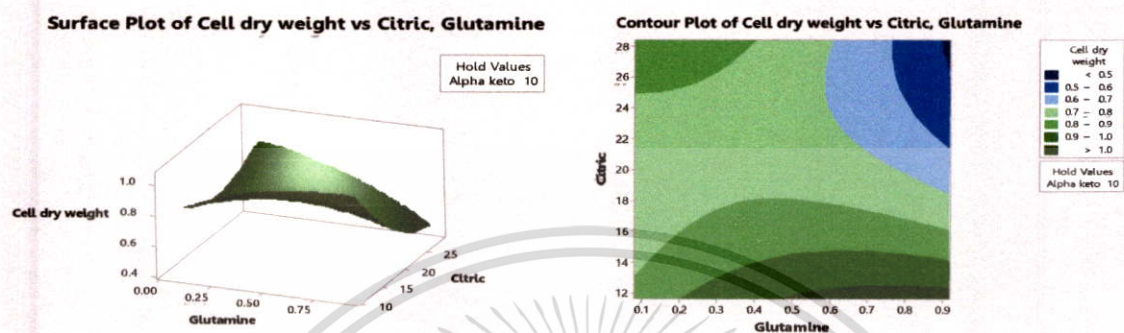
จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริก และกรดซิตริกในภาพที่ 4.11 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กลูตามีนที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.5 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุดคือ แอลฟาคีโตกลูตาริก ความเข้มข้น 18.4 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกความเข้มข้น 28.4 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.11 พื้นผิวผลตอบและโครงร่างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริก และกรดซิตริก ที่ความเข้มข้นกลูตามีนที่ 0.5 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีน และกรดซิตริก ในภาพที่ 4.12 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้แอลฟาดีโกลูตาริกที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.5 มิลลิโมลาร์ จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด คือ กลูตามีนความเข้มข้น 0.08 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกความเข้มข้น 28.4 กรัมต่อลิตร

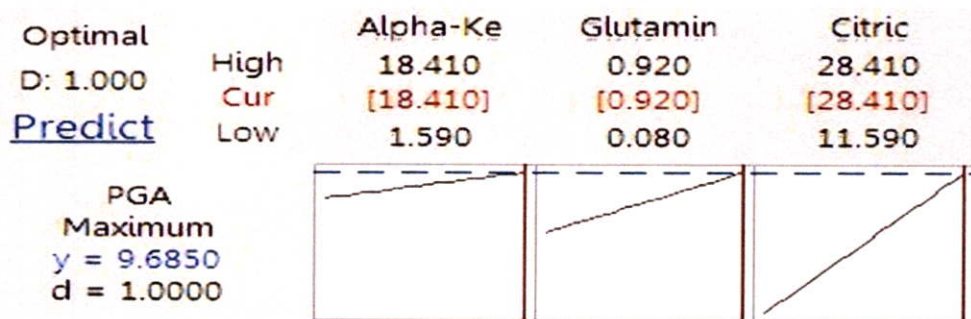


ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและโครงร่างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีน และกรดซิตริก ความเข้มข้นแอลฟาดีโกลูตาริกที่ 0.5 มิลลิโมลาร์

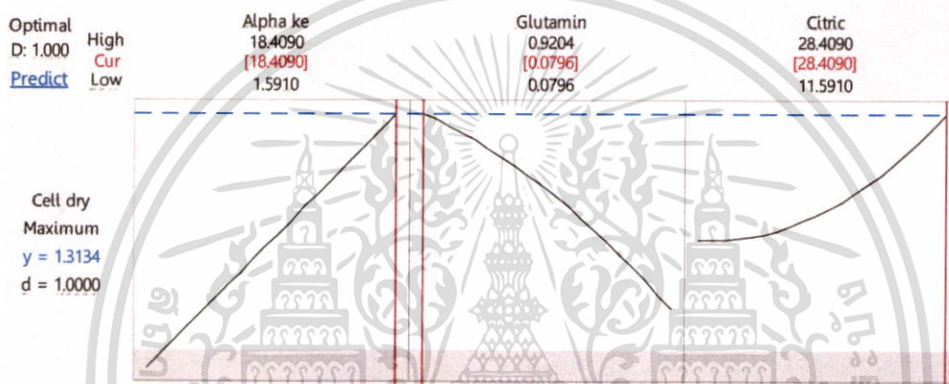
#### 4.2.2.6 การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* SRU 01 โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer ในโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติซึ่งเป็นฟังก์ชันที่ใช้หาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยและใช้วัดความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบ (composite desirability: D) ซึ่งค่าความพึงพอใจของผลตอบมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 ถ้า D มีค่าเท่ากับ 1 หมายถึง ผลตอบนั้นได้รับความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์

จากการหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ใช้ ฟังก์ชัน response optimizer พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก และปริมาณน้ำหนักเซลล์ โดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 คือ แอลฟาดีโกลูตาริกที่ 18.41 มิลลิโมลาร์ กลูตามิกที่ 0.92 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกที่ 28.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ความเข้มข้นกรดพอลิแกมมากลูตามิกเท่ากับ 9.68 กรัมต่อลิตร ส่วนสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ แอลฟาดีโกลูตาริกที่ 18.41 มิลลิโมลาร์ กลูตามิกที่ 0.08 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกที่ 28.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.3134 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าความพึงพอใจรวมเท่ากับ 1 ดังภาพที่ 4.13 และ 4.14



ภาพที่ 4.13 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก



ภาพที่ 4.14 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง

#### 4.3 ผลของการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้เชื้อ

##### *B. megaterium* SRU 02

ในการทดลองเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* SRU 02 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติกำหนดลำดับและออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ที่มี 3 ปัจจัย คือ กรดแอลฟาดีโตกลูตาริก ( $X_1$ ) แอลกลูตามีน ( $X_2$ ) และกรดแอลฟาดีโตกลูตาริก ( $X_3$ ) โดยมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 6 ครั้ง ดังนั้นจึงมีจำนวนหน่วยทดลองทั้งหมด 20 หน่วยทดลอง เมื่อทำการทดลองผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ตามลำดับการทดลอง และสภาวะที่กำหนดไว้ ผลที่ได้จากการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ค่าการทดลองของผลการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมา-กลูตา-มิกโดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU02

ลำดับการทดลอง	ปัจจัยที่ศึกษา			ผลตอบสนอง	
	แอลฟาดีโกลูตาริก ( $X_1$ ) (มิลลิโมลาร์)	แอลกลูตามีน ( $X_2$ ) (มิลลิโมลาร์)	กรดซิตริก ( $X_3$ ) (กรัมต่อลิตร)	กรดพอลิแกมมา- กลูตามิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	10	0.92	20	0.0959	3.1407
2	15	0.25	15	0.0472	3.0033
3	18.41	0.5	20	0.0850	3.1300
4	10	0.5	20	0.0706	3.3220
5	10	0.5	20	0.0956	3.2120
6	5	0.25	25	0.0803	3.5967
7	15	0.75	25	0.0834	3.1060
8	5	0.25	15	0.0466	3.5207
9	10	0.5	28.41	0.1031	3.3113
10	1.59	0.5	20	0.0766	3.4307
11	10	0.5	11.59	0.0253	3.2127
12	10	0.08	20	0.0841	3.5907
13	10	0.5	20	0.0834	3.1920
14	10	0.5	20	0.0891	3.3820
15	5	0.75	15	0.0575	3.5473
16	5	0.75	25	0.0956	3.3520
17	10	0.5	20	0.0809	3.3667
18	15	0.75	15	0.0522	3.4053
19	15	0.25	25	0.0906	3.0447
20	10	0.5	20	0.1209	3.1747

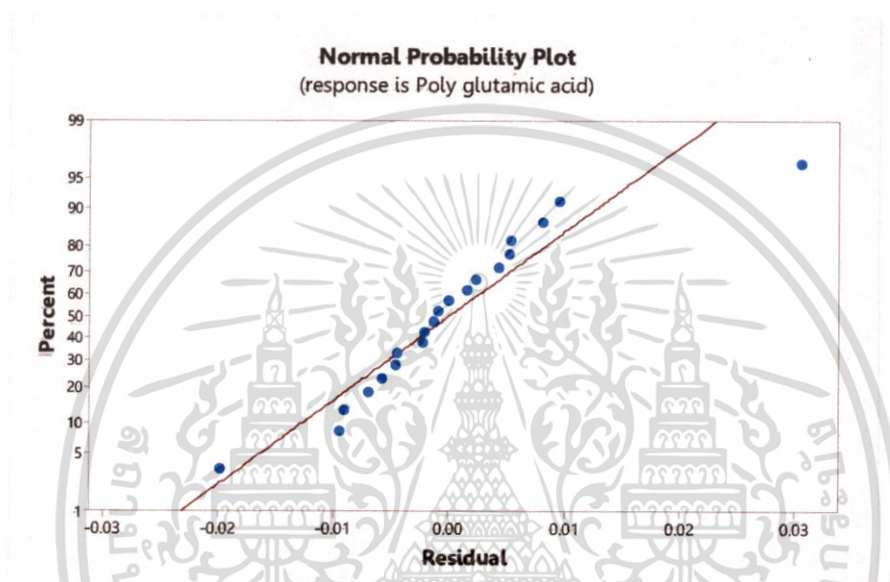
#### 4.3.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

##### 4.3.1.1 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

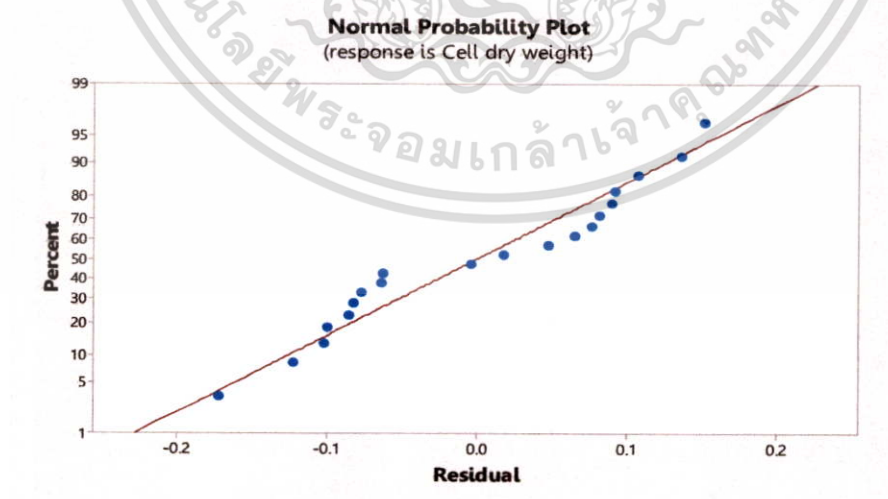
เมื่อทำการทดลองเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมา-กลูตา-มิกโดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ทั้งหมด 20 หน่วยทดลอง แล้วจึงนำผลการทดลองที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลว่ามีความเหมาะสมหรือไม่ด้วยการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง หากข้อมูลมีความเหมาะสมจึงนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R-Squar:R-Sq) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลมี 3 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ (2) การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล และ (3) การตรวจสอบความเสถียรความแปรปรวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1) การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ เป็นการตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูล ว่ามีการกระจายแบบแจกแจงปกติหรือไม่ จากการพิจารณาการกระจายของค่าส่วนตกค้าง ในภาพที่ 4.15 และภาพที่ 4.16 ของปริมาณกรดพอลิแกมมาลูลตามิก และ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาลูลตามิก โดยเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 พบว่ามีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรงทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าส่วนตกค้างจากการทดลองของปริมาณกรดพอลิแกมมาลูลตามิก และ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาลูลตามิก โดยเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ไม่แสดงสิ่งผิดปกติให้เห็น จึงสรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ



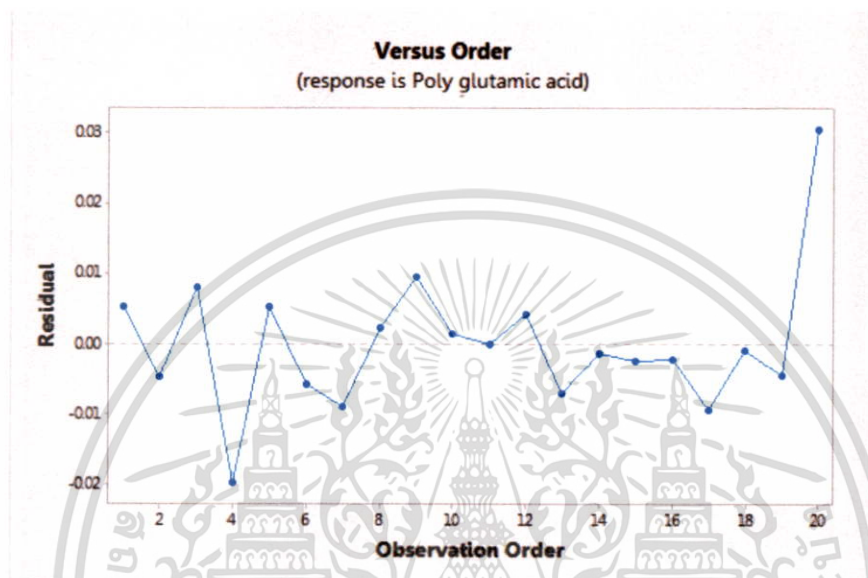
ภาพที่ 4.15 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณกรดพอลิแกมมาลูลตามิก



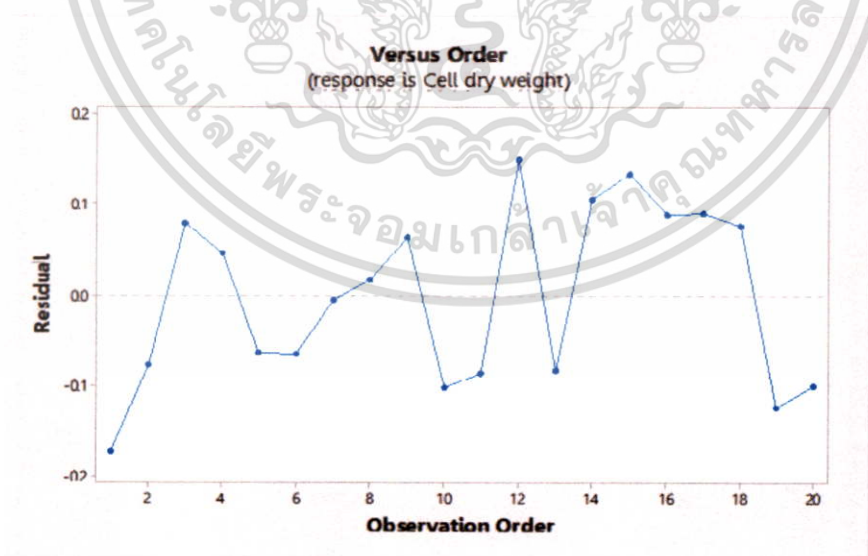
ภาพที่ 4.16 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล การตรวจสอบความเป็นอิสระของค่า ส่วนตกค้างโดยใช้แผนภูมิการกระจายเพื่อสังเกตลักษณะการกระจายของจุดที่แทนข้อมูลบนแผนภูมิว่ามี รูปแบบอิสระหรือไม่ จากการพิจารณาภาพที่ 4.17 และ 4.18 ของปริมาณกรดพอลิแกมมาลูตามิก และ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ไม่มีรูปแบบที่แน่นอนหรือไม่สามารถประมาณรูปแบบที่แน่นอนได้ มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ แสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ



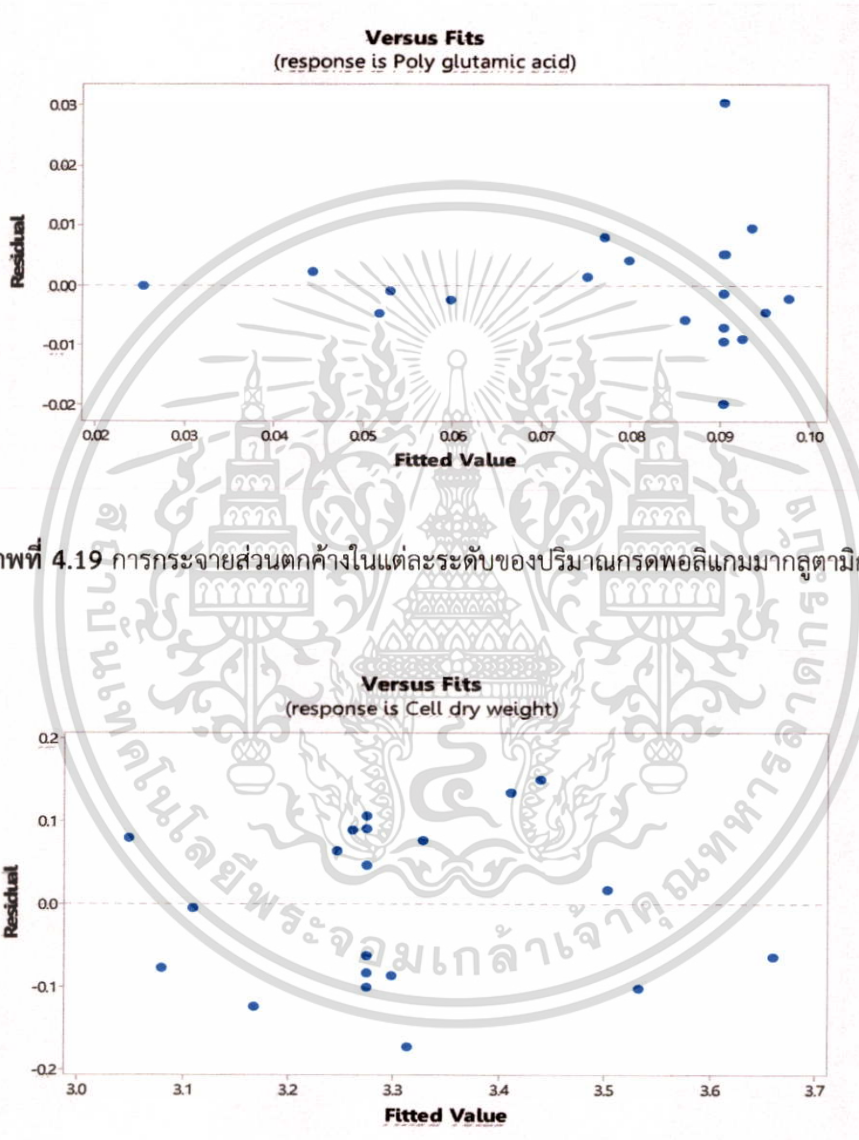
ภาพที่ 4.17 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณกรดพอลิแกมมาลูตามิก



ภาพที่ 4.18 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน โดยใช้แผนภูมิการกระจายของ ส่วนตกค้างในแต่ละระดับปัจจัยจากการพิจารณาภาพที่ 4.19 และ 4.20 ของปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก และ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ตามลำดับ พบว่า ส่วนตกค้างของผลการทดลองของ ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ผลิตโดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ ทั้ง ทางบวกและทางลบ แสดงว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน



ภาพที่ 4.19 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก

ภาพที่ 4.20 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลองของปริมาณกรดพอลิแกมมาตามิก และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาตามิก โดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 พบว่าค่าส่วนตกค้างของข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นไปตามสมมุติฐานทั้ง 3 ข้อคือ ส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ ค่าส่วนตกค้างมีความเป็นอิสระต่อกัน และ ค่าความแปรปรวนมีความเสถียรภาพ จึงสรุปได้ว่า ข้อมูลที่ได้จากการทดลองชุดนี้มีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน

#### 4.3.1.2 ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ

ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Sq) เป็นค่าที่ใช้บอกร้อยละการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามที่สามารถอธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระในสมการถดถอย (ประไพศรี และพงศ์ชนัน, 2551) Stowe และคณะ (1966) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Sq) ที่มากกว่า 70% เป็นค่าอยู่ในระดับความพึงพอใจที่สามารถยอมรับและนำไปสร้างสมการการทำนายผลการทดลองได้

##### (1) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของปริมาณกรดพอลิแกมมาตามิก

จากตารางที่ 4.8 จะเห็นว่าค่า R-Sq มีค่าเท่ากับ 80.79% หมายความว่า ตัวแปรอิสระได้แก่ กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก แอลกลูตามีน และกรดซิตริก สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามคือ ปริมาณกรดพอลิแกมมาตามิกที่ผลิตได้ ได้ร้อยละ 80.79 แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนาย เพื่อหาค่าผลตอบได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณกรดพอลิแกมมาตามิก

Term	Coef	SE coef	T-Value	P-Value
Constant	-0.2201	0.0855	-2.580	0.028
$\alpha$ -ketoglutaric acid	0.0053	0.0052	1.010	0.335
Glutamine	0.0860	0.1050	0.820	0.431
Citric acid	0.0218	0.0064	3.400	0.007
$\alpha$ -ketoglutaric acid	-0.0002	0.0001	-1.410	0.189
* $\alpha$ -ketoglutaric acid				
Glutamine* Glutamine	-0.0292	0.0577	-0.510	0.624
Citric acid* Citric acid	-0.0004	0.0001	-3.040	0.013
$\alpha$ -ketoglutaric acid * Glutamine	-0.0028	0.0039	-0.740	0.479
$\alpha$ -ketoglutaric acid * Citric acid	0.0000	0.0002	0.070	0.943
Glutamine* Citric acid	-0.0008	0.0039	-0.200	0.844

S = 0.0136612, R-sq = 80.79%, R-sq (adj) = 63.50%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## (2) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของปริมาณน้ำหนักรวมแห้ง

จากตารางที่ 4.9 จะเห็นว่าค่า R-Sq มีค่าเท่ากับ 70.27% หมายความว่า ตัวแปรอิสระได้แก่ กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก แอลกลูตามีน และกรดซิตริก สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามคือ ปริมาณน้ำหนักรวมแห้งที่ผลิตได้ ได้ร้อยละ 70.27 แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนาย เพื่อหาค่าผลตอบได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์การถดถอยของพินผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักรวมแห้ง

Term	Coef	SE	Coef	T-Value	P-Value
Constant	3.4410		0.8450	4.070	0.002
$\alpha$ -ketoglutaric acid	-0.0535		0.0518	-1.030	0.326
Glutamine	-0.1800		1.0400	-0.170	0.865
Citric acid	0.0358		0.0634	0.560	0.585
$\alpha$ -ketoglutaric acid * $\alpha$ -ketoglutaric acid	0.0002		0.0014	0.160	0.877
Glutamine* Glutamine	0.5740		0.5700	1.010	0.337
Citric acid * Citric acid	0.0000		0.0014	-0.020	0.981
$\alpha$ -ketoglutaric acid * Glutamine	0.0681		0.0382	1.780	0.105
$\alpha$ -ketoglutaric acid * Citric acid	-0.0007		0.0019	-0.360	0.724
Glutamine* Citric acid	-0.0612		0.0382	-1.600	0.140

S = 0.134, R-sq = 70.27%, R-sq (adj) = 43.52%

## 4.3.1.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเป็นการตอบสนองแหล่งผันแปรของแบบจำลอง

## (1) การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ในตารางที่ 4.10 พบว่า ค่า P-value ของเทอมอันตรกิริยามีค่าเท่ากับ 0.012 และเทอมสองกำลังสองมีค่าเท่ากับ 0.002 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด แสดงว่ามีส่วนโค้งเกิดขึ้นที่พินผิวตอบสนอง (Montgomery, 2001) ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการแบบจำลองกำลังสองสำหรับทำนายปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้

ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	9	0.0078	0.0008	4.67	0.012
Lack-of-Fit	5	0.0003	0.0000	0.25	0.921
Pure Error	5	0.0015	0.0002		
Total	19	0.0097			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบว่าสมการถดถอยที่ได้มีความเหมาะสมกับแบบจำลองหรือไม่ พิจารณาได้จากค่า P-Value ของ Lack-of-fit พบว่า Lack-of-fit ในตารางที่ 4.10 ไม่มีนัยสำคัญ หมายความว่าสมการที่ได้นั้น fit กับผลการทดลอง จึงทำให้ค่า Lack-of-fit ที่เท่ากับ 0.921 สามารถใช้ในการทำนายค่าของกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้

(2) การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ในตารางที่ 4.11 พบว่า ค่า P-value ของเทอมอันตรกิริยามีค่าเท่ากับ 0.07 และเทอมกำลังสองมีค่าเท่ากับ 0.016 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด แสดงว่ามีส่วนโค้งเกิดขึ้นที่ผิวตอบสนอง (Montgomery, 2001) ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการแบบจำลองกำลังสองสำหรับทำนายปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้

ตารางที่ 4.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง

source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	9	0.4306	0.0478	2.63	0.07
Lack-of-Fit	5	0.1391	0.0278	3.24	0.11
Pure Error	5	0.0429	0.0085		
Total	19	0.6128			

การทดสอบว่าสมการถดถอยที่ได้มีความเหมาะสมกับแบบจำลองหรือไม่ พิจารณาได้จากค่า P-Value ของ Lack-of-fit พบว่า Lack-of-fit ในตารางที่ 4.11 ไม่มีนัยสำคัญ หมายความว่าสมการที่ได้นั้น fit กับผลการทดลอง จึงทำให้ค่า Lack-of-fit ที่เท่ากับ 0.11 สามารถใช้ในการทำนายค่าของกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้

4.3.1.4 การสร้างสมการทำนายปริมาณของผลการทดลอง

การสร้างสมการทำนายปริมาณของผลการทดลองได้จากผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีหมักแบบอลิซิมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 โดยนำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของปริมาณของผลการทดลอง ในตารางที่ 4.8 และ 4.9 มาเขียนให้อยู่ในรูปของสมการดังนี้

(1) การสร้างสมการทำนายปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก แสดงดังสมการที่ 4.3

$$\begin{aligned} \text{กรดพอลิแกมมากลูตามิก (กรัมต่อลิตร)} = & -0.2201 + 0.00531 X_1 + 0.086 X_2 + 0.02180 X_3 \\ & - 0.000203 X_1^2 - 0.0292 X_2^2 - 0.000437 X_3^2 - 0.00284 X_1 * X_2 \\ & + 0.000014 X_1 * X_3 - 0.00078 X_2 * X_3 \end{aligned} \quad (4.3)$$

การทดสอบว่าสมการถดถอยที่ได้มีความเหมาะสมกับแบบจำลองหรือไม่ พิจารณาได้จากค่า P-Value ของ Lack-of-fit พบว่าค่า P-Value ของ Lack-of-fit ในตารางที่ 4.10 มีค่าเท่ากับ 0.921 ซึ่งที่ค่ามากกว่า 0.05 ทำให้สรุปได้ว่าแบบจำลองนี้มีความเหมาะสมของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถนำสมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ได้จากผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีหมักแบบอลิซิมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## (2) การสร้างสมการทำนายปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง แสดงดังสมการที่ 4

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = & 3.441 - 0.0535 X_1 - 0.18 X_2 + 0.0358 X_3 + 0.00023 X_1^2 + 0.574 X_2^2 \\ & - 0.00003 X_3^2 + 0.0681 X_1 * X_2 - 0.00069 X_1 * X_3 - 0.0612 X_2 * X_3 \end{aligned} \quad (4.4)$$

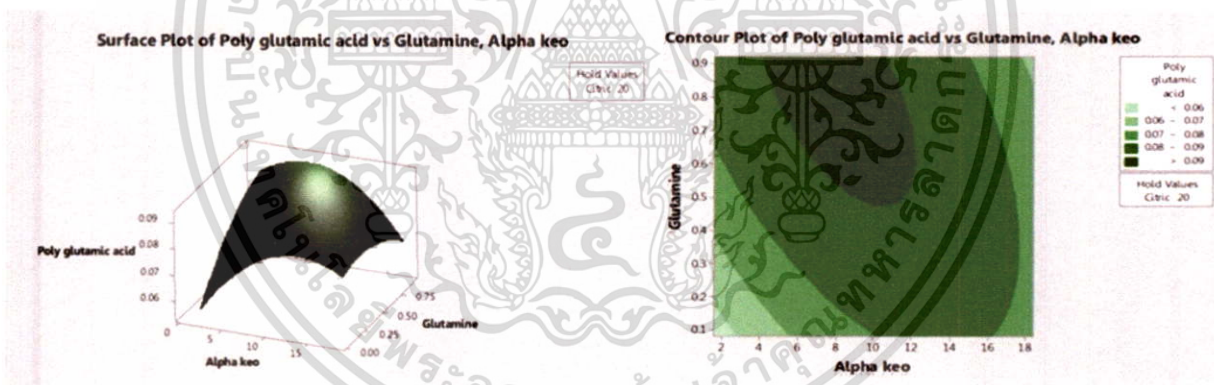
การทดสอบว่าสมการถดถอยที่ได้มีความเหมาะสมกับแบบจำลองหรือไม่ พิจารณาได้จากค่า P-Value ของ Lack-of-fit ในตารางที่ 4.11 พบว่าค่า P-Value ของ Lack-of-fit มีค่าเท่ากับ 0.11 ซึ่งที่ค่ามากกว่า 0.05 ทำให้สรุปได้ว่าแบบจำลองนี้มีความเหมาะสมของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถนำสมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ได้จากผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีหมักแบบออลิซิมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ได้

## 4.3.1.5 การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณผลการทดลอง

เมื่อได้สมการสำหรับทำนายผลการทดลองแล้ว จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองของผลการทดลองและกราฟโครงร่าง

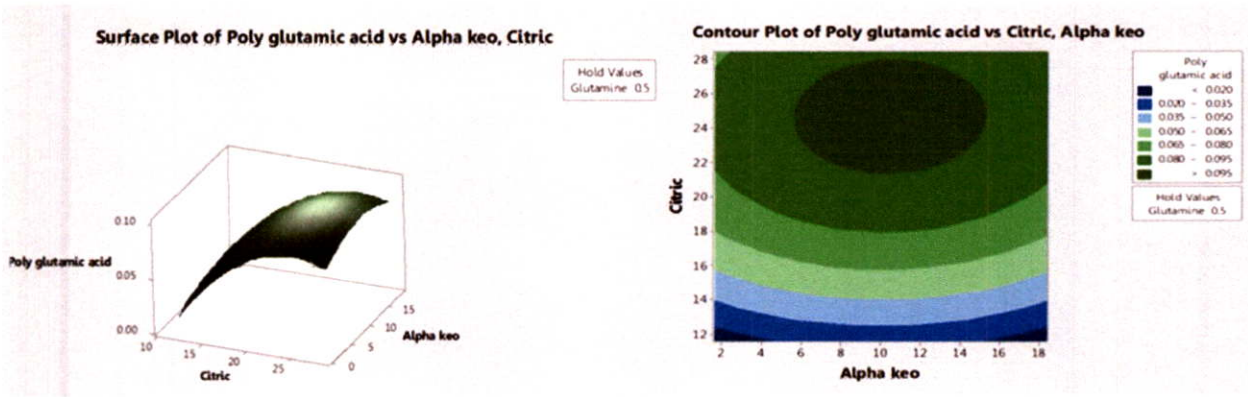
## (1) การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก

จากกราฟแสดงพื้นผิวตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณกรดพอลิแกมมาที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาเคโตกลูตาริกและกลูตามีน ในภาพที่ 4.21 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือต้องการปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กรดซิตริกที่ใช้ในการผลิตคงที่ 24.50 กรัมต่อลิตร จะพบว่าค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกในการผลิตมากที่สุดคือแอลฟาเคโตกลูตาริก 8.89 มิลลิโมลาร์ และกลูตามีน 0.71 มิลลิโมลาร์



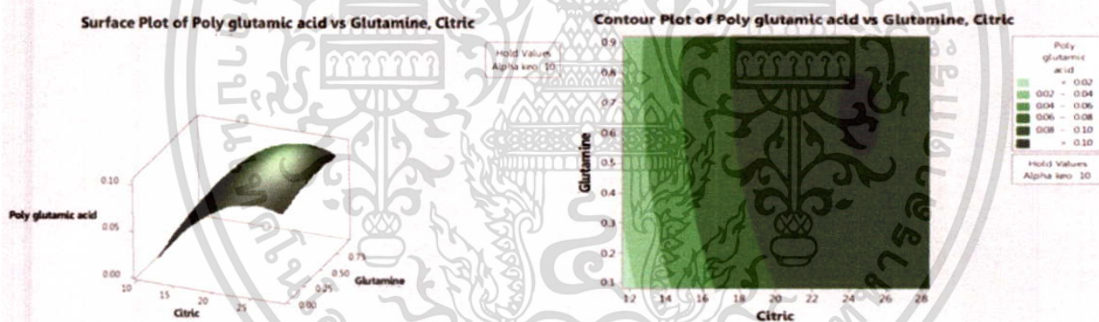
ภาพที่ 4.21 พื้นผิวตอบสนองและโครงร่างของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาเคโตกลูตาริกและกลูตามีน ที่ความเข้มข้นของกรดซิตริก 24.50 กรัมต่อลิตร

จากกราฟแสดงพื้นผิวตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาเคโตกลูตาริก และกรดซิตริก ในภาพที่ 4.22 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือต้องการปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กลูตามีนที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.71 มิลลิโมลาร์ จะพบว่าค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกในการผลิตมากที่สุดคือแอลฟาเคโตกลูตาริกเท่ากับ 8.89 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกเท่ากับ 24.50 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.22 พื้นผิวผลตอบสนองและโครงร่างของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาซีโตกลูตาริกและกรดซิตริก ที่ความเข้มข้นกลูตามีน 0.71 มิลลิโมลาร์

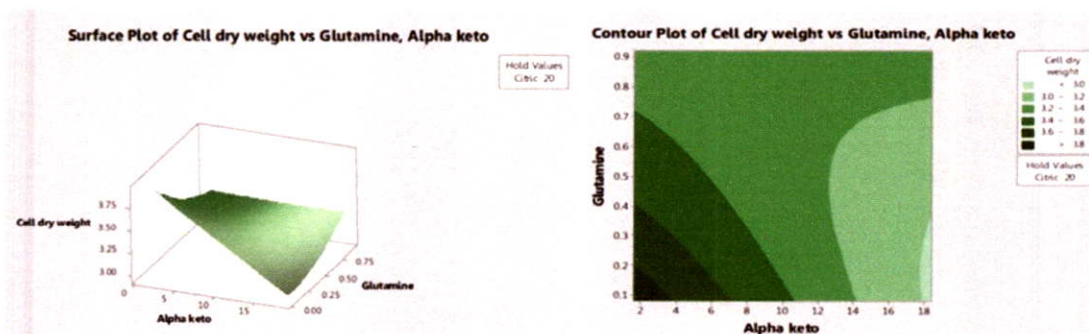
จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีน และกรดซิตริก ในภาพที่ 4.23 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้แอลฟาซีโตกลูตาริกที่ใช้ในการผลิตคงที่ 8.89 มิลลิโมลาร์ จะพบว่าค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกในการผลิตมากที่สุด คือ กลูตามีนเท่ากับ 0.71 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกเท่ากับ 24.50 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.23 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีนและกรดซิตริก ที่ความเข้มข้นแอลฟาซีโตกลูตาริก 8.89 มิลลิโมลาร์

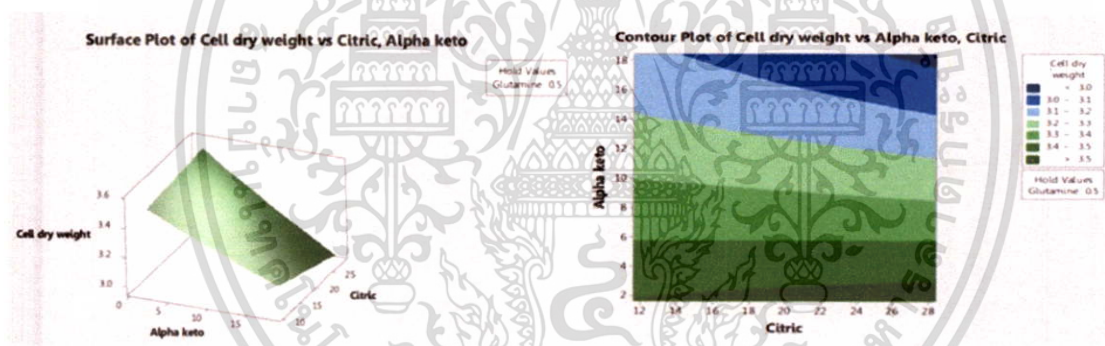
#### (2) การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้ง

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งที่ผลิต ได้ระหว่างแอลฟาซีโตกลูตาริก และกลูตามีน ในภาพที่ 4.24 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กรดซิตริกที่ใช้ในการผลิตคงที่ 28.41 กรัมต่อลิตร จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด คือ แอลฟาซีโตกลูตาริกเท่ากับ 1.59 มิลลิโมลาร์ และกลูตามีนเท่ากับ 0.08 มิลลิโมลาร์



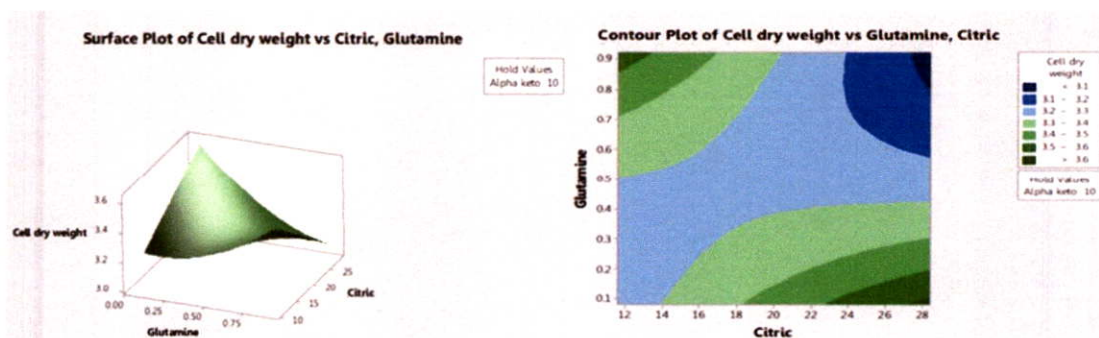
ภาพที่ 4.24 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่าง แอลฟาคีโตกลูตาริกและกลูตามีน ที่ความเข้มข้นกรดซิตริก 28.41 กรัมต่อลิตร

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริก และกรดซิตริก ในภาพที่ 4.25 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือต้องการปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กลูตามีนที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.08 มิลลิโมลาร์ พบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด คือ แอลฟาคีโตกลูตาริกเท่ากับ 1.59 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกเท่ากับ 28.41 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.25 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่าง แอลฟาคีโตกลูตาริกและกรดซิตริกที่ ความเข้มข้นกลูตามีน 0.08 มิลลิโมลาร์

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีน และกรดซิตริก ในภาพที่ 4.26 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้แอลฟาคีโตกลูตาริกที่ใช้ในการผลิตคงที่ 1.59 มิลลิโมลาร์ พบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด คือ กลูตามีนเท่ากับ 0.08 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกเท่ากับ 28.41 กรัมต่อลิตร

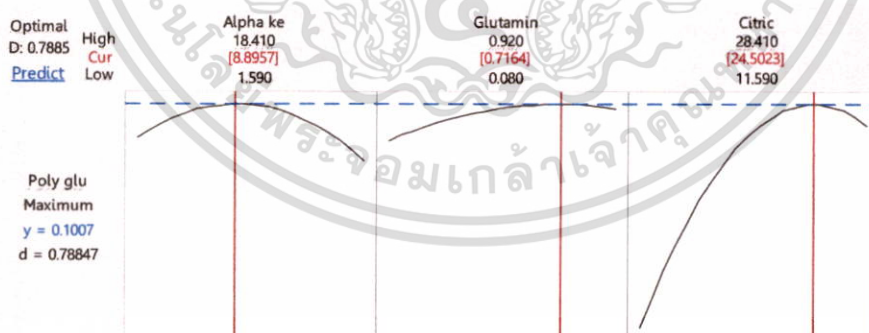


ภาพที่ 4.26 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีนและกรดซิตริกที่ความเข้มข้นแอลฟาคีโตกลูตาตริก 1.59 มิลลิโมลาร์

#### 4.3.1.6 การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer ในโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติซึ่งเป็นฟังก์ชันที่ใช้หาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยและใช้วัดความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบ (composite desirability: D) ซึ่งค่าความพึงพอใจของผลตอบมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 ถ้า D เท่ากับ 1 หมายถึง ผลตอบนั้นได้รับความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์

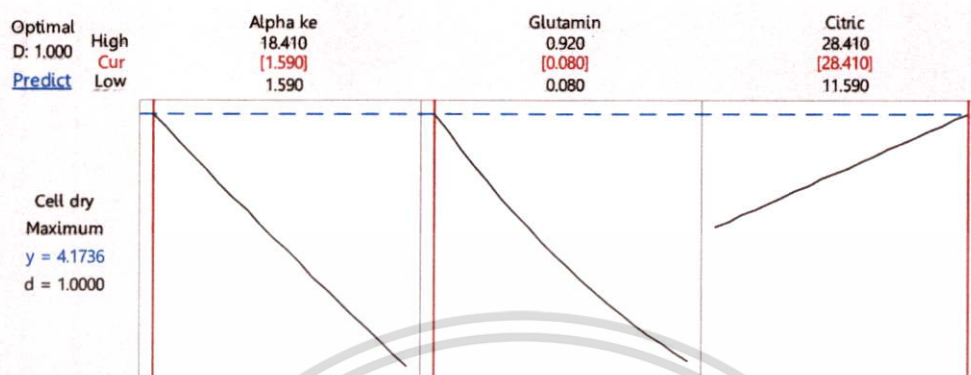
จากการหาค่าปัจจัยที่เหมาะสม ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิต กรดพอลิแกมมากลูตามิกที่มากที่สุด โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 คือ แอลฟาคีโตกลูตามิกที่ 8.89 มิลลิโมลาร์ กลูตามีนที่ 0.71 มิลลิ โมลาร์ และกรดซิตริกที่ 24.50 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกเท่ากับ 0.10 กรัมต่อลิตรโดยมีค่าความพึงพอใจรวมเท่ากับ 0.78 ดังภาพที่ 4.27



ภาพที่ 4.27 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ แอลฟาคีโตกลูตาริกที่ 1.59 มิลลิโมลาร์ กลูตามีนที่ 0.08 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกที่ 28.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.17 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าความพึงพอใจรวมเท่ากับ 1 ดังภาพที่ 4.28



ภาพที่ 4.28 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

#### 4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 มีค่าที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.1209 กรัมต่อลิตรโดยเปรียบเทียบกับการศึกษาทดลองของ Cao และคณะ (2011) พบว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* LL3 ในการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกพบว่าได้กรดพอลิแกมมาไกลูตามิกเท่ากับ 4.36 กรัมต่อลิตร Goto และ Kunioka (1991) ทำการศึกษาการผลิตโดยใช้เชื้อ *B. subtilis* IF03335 พบว่าเชื้อผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกได้เท่ากับ 9.6 กรัมต่อลิตร Berkaa และ Al-otaibi (2013) ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกจากเชื้อ *B. sp.* SW1-2 ซึ่งเป็นเชื้อใกล้เคียงกับเชื้อ *B. megaterium* และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของแคลเซียมคลอไรด์ กลูตามิก แอมโมเนียมซัลเฟตและซีเตรต ในการทดสอบการผลิตพบว่าเชื้อสามารถผลิตได้ 36.5 กรัมต่อลิตร Soliman และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตจากเชื้อ *B. sp.* SAB-26 พบว่าเชื้อผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกได้ 33.5 กรัมต่อลิตร

ซึ่งเชื้อ *B. amyloliquefaciens* LL3 *B. subtilis* IF03335 *B.sp.* SAB-26 และ *B. sp.* SW1-2 ผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่มากกว่าเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 อาจเนื่องมาจากสารอาหารที่แตกต่างกันที่เชื้อต้องการได้รับ เชื้อที่แตกต่างกัน หรือมีปัจจัยอื่นๆเช่นอุณหภูมิ วิธีการทดลอง ระยะเวลาในการผลิต เป็นต้น ที่ส่งผลให้เชื้อผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกได้ต่างกัน

จากผลการทดลองของ Goto และ Kunioka (1991) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยเชื้อ *B. subtilis* IF03335 เมื่อใช้กลูโคส กรดซิตริก กรดแอลมาริก กรดซัคซินิก และกรดฟูมาริก เป็นแหล่งคาร์บอนที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกลูตามิกที่มีส่วนผสมของกรดแอลกลูตามิก และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า ผลผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก มากสูงสุดเมื่อเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและจาก

การศึกษาในครั้งนี้พบว่ากรดซिटริกมีผลในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกมากที่สุดเช่นกัน เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Sq) ที่มากกว่า 70% เป็นค่าอยู่ในระดับความพึงพอใจที่สามารถยอมรับและนำไปสร้างสมการการทำนายผลการทดลองได้ (Stowe และคณะ, 1966) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Sq) ของกรดพอลิแกมมากลูตามิกมีค่า 80.79 % ซึ่งมากกว่า 70 % ทำให้สรุปว่าเป็นค่าอยู่ในระดับความพึงพอใจที่สามารถยอมรับได้

Masao Kunioka และคณะ (1995) ได้ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก (พีจีเอ) โดยเชื้อ *B. subtilis* IFO3335 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดซिटริก 2 กรัม และ แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม ทำให้เชื้อ *B. subtilis* IFO3335 ผลิตพีจีเอได้เพียงเล็กน้อย และเมื่อเติมแอล-กลูตามีน 0.01 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร พบว่าเกิดการผลิตพีจีเอเป็นจำนวนมากถึง 0.45 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และการเติมกรดซिटริก แอมโมเนียมซัลเฟตและแอล-กลูตามีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตพีจีเอ และพบว่าการเติมแอล-กลูตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์พีจีเอของเชื้อ *B. subtilis* IFO3335 และยังสันนิษฐานว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูตาเมตซินเทส จาก 2-ออกโซกลูตาริกไปเป็นกรดแอลกลูตามิก ในเชื้อ *B. subtilis* IFO3335



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผล

จากการศึกษาหาชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* SRU 01 พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* SRU 01 เป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid-dependent คือต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอกเพิ่มเข้าไปในสารอาหารเพื่อให้สามารถที่จะทำการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ *B. megaterium* SRU 02 เป็นแบคทีเรียชนิดที่ Glutamic acid-independent คือไม่ต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอกเพิ่มเข้าไปในสารอาหารเพื่อให้สามารถทำการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นในการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกโดยใช้กระบวนการหมักจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 แสดงในรูปของสมการสำหรับทำนายปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก คือ กรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิต ได้เท่ากับ  $-3.668 + 0.066 X_1 + 3.044 X_2 + 0.354 X_3 - 0.001 X_1^2 - 0.592 X_2^2 - 0.006 X_3^2 - 0.67 X_1 X_2 - 0.002 X_1 X_3 - 0.079 X_2 X_3$  โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ เท่ากับ 0.927 เมื่อนำมาหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก คือ แอลฟาดีโตกลูตาริกที่ 18.41 มิลลิโมลาร์ กลูตามิกที่ 0.92 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกที่ 28.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ เท่ากับ 9.68 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าความพึงพอใจรวมเท่ากับ 1 สมการสำหรับทำนายน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ ปริมาณเซลล์แห้งที่ผลิต ได้เท่ากับ  $1.462 - 0.0201 X_1 + 1.511 X_2 - 0.0865 X_3 - 0.409 X_2^2 + 0.001688 X_3^2 - 0.0345 X_1 X_2 + 0.002576 X_1 X_3 - 0.0438 X_2 X_3$  โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ เท่ากับ 0.945 เมื่อนำมาหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ แอลฟาดีโตกลูตาริกที่ 18.41 มิลลิโมลาร์ กลูตามิกที่ 0.08 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกที่ 28.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ผลิตได้ เท่ากับ 1.3134 กรัม โดยมีค่าความพึงพอใจรวมเท่ากับ

จากการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นในการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก โดยใช้กระบวนการหมักจากเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 แสดงในรูปของสมการสำหรับทำนายปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก คือ ปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิต ได้เท่ากับ  $-0.2201 + 0.00531 X_1 + 0.086 X_2 + 0.02180 X_3 - 0.000203 X_1^2 - 0.0292 X_2^2 - 0.000437 X_3^2 - 0.00284 X_1 X_2 + 0.000014 X_1 X_3 - 0.00078 X_2 X_3$  โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ เท่ากับ 0.81 เมื่อนำมาหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต กรดพอลิแกมมาไกลูตามิก คือ แอลฟาดีโตกลูตาริกที่ 8.89 มิลลิโมลาร์ กลูตามีนที่ 0.71 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกที่ 24.50 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ผลิตได้ เท่ากับ 0.107 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าความพึงพอใจรวมเท่ากับ 1

สมการสำหรับทำนายน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ ปริมาณเซลล์แห้งที่ผลิตได้เท่ากับ  $3.441 - 0.0535 X_1 - 0.18 X_2 + 0.0358 X_3 + 0.00023 X_1^2 + 0.574 X_2^2 - 0.00003 X_3^2 + 0.0681 X_1 X_2 - 0.00069 X_1 X_3 - 0.0612 X_2 X_3$  โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ เท่ากับ 0.70 เมื่อนำมาหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ แอลฟาดีโตกลูตาริกที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.59 มิลลิโมลาร์ กลูตามีนที่ 0.008 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกที่ 28.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง ที่ผลิตได้เท่ากับ 4.173 กรัม โดยมีค่าความพึงพอใจเท่ากับ 1

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาสารตัวกลางที่ต่างจากจากการศึกษานี้เพิ่มเติม เพื่อศึกษาผลของการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก

5.2.2 ควรศึกษาเชื้อ *Bacillus spp.* ที่สกลต่างจากการศึกษานี้เพิ่มเติม เพื่อศึกษาผลของการผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิก

5.2.3 ควรเปลี่ยนช่วงของความเข้มข้นให้อยู่ในช่วงที่ได้ผลผลิตของกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกที่ดีที่สุด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6  
สรุปผลผลิตของการวิจัย

บทความวิจัย

Sarjid, P., Thongtharvonsuwan, S., Yaiyen S. and **Sripchochanart, W.** Effect of metabolic intermediates on poly-( $\gamma$ -glutamic acid) production by *Bacillus licheniformis* SRU01. The 19<sup>th</sup> Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC 2017). Innovative Food Science and Technology For Mankind: Empowering Research for Health and Aging Society, BITEC, 15-17 June 2017.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- ณัฐวดี คงล้อม, ชนิกา ชื่นแสงจันทร์ และสาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2556. วิธีการสังเคราะห์แกมมาพอลิ-กลูตามิกแอซิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacilli*. หน้า 9. ในสรุสาระเทคโนโลยีชีวภาพ ปี ที่3. กรุงเทพฯ: ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการหมัก.
- ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา และ พงศ์ชนัน เหลืองไพบูลย์. 2551. การออกแบบและการวิเคราะห์การทดลอง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ท็อป. 277-280.
- รัศมีกร สิงห์เจริญ. 2544. การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียทนร้อนจากถั่วเน่าที่สามารถผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- Ashiuchi, M., Soda, K. and Misono, H. 1999. A poly-gamma-glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: gene cloning and biochemical analysis of poly-gamma-glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 263:6-12.
- Ashiuchi, M., Kamei, T., Baek, D. H., Shin, S. Y., Sung, M. H., Soda, K., Yagi, T. and Misono, H., 2001. Isolation of *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*), a poly- $\gamma$ -glutamate producer with high genetic competence. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 764–769.
- Bajaj, I. and Singhal, R. 2009. Enhanced production of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 159:133–141.
- Bajaj, I. and Singhal, R. 2011a. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*. 102: 5551-5561.
- Bajaj, I. B. and Singhal, R. S. 2011b. Flocculation properties of poly( $\gamma$ -glutamic acid) produced from *Bacillus subtilis* isolate. *Food and Bioprocess Technology*. 4: 745–752.
- Bhat, A.R., Irorere, V.U., Bartlett, T., Hill, D., Kedai, G., Charalampopoulos, D., Nualkaekul, S. and Radecka, I. 2015. Improving survival of probiotic bacteria using bacterial poly-  $\gamma$  - glutamic. *Food Microbiology*. 196:24–31.
- Birrer, G. A., Cromwick, A. M. and Gross, R. A., 1994. Poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physiological and biochemical studies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 16: 265–275.
- Cao, M., Geng, W., Liu, li., Song, C., Xie, H., Guo, W., Jin, Y. and Wang, S. 2011. Glutamic acid independent production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 and cloning of *pgsBCA* genes. *Bioresource Technology*. 102:4251-4257.
- Cesaro, A., Silva, S.B. and Ayub, M.A.Z. 2014. Effects of metabolic pathway precursors and polydimethylsiloxane (PDMS) on poly-(gamma)-glutamic acid production by *Bacillus subtilis* BL53. *Industrial Microbiology and Biotechnology*. 41:1375-1382.
- Chintrakool, M., Kongklom, N. and Sirisansaneeyakul, S. 2014. The production of poly-  $\gamma$  - glutamic acid from monosodium glutamate waste (ami-ami) by *Bacillus licheniformis*
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ATCC 9. Biodiversity Biotechnology Bioeconomy. 179:222-228.
- Du, G., Yang, G., Qu, Y., Chen, J. and Lun, S., 2005. Effects of glycerol on the production of poly( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis*. Process Biochemistry. 40: 2143–2147.
- Goto, A. and Kunioka, M. 1991. Biosynthesis and hydrolysis of poly( $\gamma$ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 56:1031-1035.
- Hezayen, F. F., Rehm, B. H., Tindall, B. J., Steinbuchel, A. and Eberhardt, R., 2001. Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, nonpigmented member of the Archaea from Egypt that produces extracellular poly (glutamic acid). Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 1133–1142.
- Huang, B., Qin, P., Xu, Z., Zhu, R. and Meng, Y., 2011. Effects of  $\text{CaCl}_2$  on viscosity of culture broth, and on activities of enzymes around the 2-oxoglutarate branch, in *Bacillus subtilis* CGMCC 2108 producing poly-( $\gamma$ -glutamic acid). Bioresource Technology. 102: 3595–3598.
- Inatsu, Y., Kimura, K. and Itoh, Y. 2002. Characterization of *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in southeast asia: Comparison with *B. subtilis* (natto) starter strains. Japan Agricultural Research Quarterly. 36: 169-175.
- Ju, W. T., Song, Y. S., Jung, W. J. and Park, R. D. 2014. Enhanced production of poly- $\gamma$ -glutamic acids by a newly-isolated *Bacillus subtilis*. Biotechnology Letters. 36: 2319-2324.
- Kongklom, N., Luo, H., Shi, Z., Pechyen, C., Chisti, Y. and Sirisansaneeyakul, S. 2015. Production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by glutamic acid-independent *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 using different feeding strategies. Biochemical Engineering. 100:67-75.
- Kubota, H., Matsunobu, T., Uotani, K., Takebe, H., Satoh, A., Tanaka, T. and Tanguchi, M. 1993. Production of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 57: 1212-1213.
- Kunioka, M. and Atsuo, G. 1995. Biosynthesis of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. Applied Microbiology and Biotechnology. 44: 501-506.
- Lim, S.M., Kim, J., Shim, J. Y., Imm, B. Y., Sung, M. H. and Imm, J. Y. 2012. Effect of poly- $\gamma$ -glutamic acids (PGA) on oil uptake and sensory quality in doughnuts. Food Science and Biotechnology. 21:247-252.
- Masao, K. 1995. Biosynthesis of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) from l-glutamine, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. 10.1007/BF00169951.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
- Mitsuiki, M., Mizuno, A., Tanimoto, H. and Motoki, M. 1998. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo- and poly( $\gamma$ -glutamic acid)s. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 891–895.
- Montgomery, D. C. 2001. Design analysis experiments. *Design and Analysis of Experiments by Douglas Montgomery*. Pp 201-209.
- Ogunleye, A., Bhat, A., Irorere, U., Hill, D., Williams, C. and Radecka, I. 2015. Poly- $\gamma$ -glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiology*. 161: 1-17.
- Peng, Y. TaoZhang, B., Mu, W., Miao, M., Hua, Y. 2015. High-level production of poly( $\gamma$ -glutamic acid) by a newly isolated glutamate-independent strain, *Bacillus methylotrophicus*. *Process Biochemistry*. 50:329-335.
- SalÓrzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolphthorite method. *Limnology and Oceanography*. 14: 799-801.
- Shih, I. L. and Van, Y. T. 2001. The production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*. 79:207-225.
- Shih, I. L., Wu, P. J and Shieh, C. J. 2005. Microbial production of a poly( $\gamma$ -glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*. 40: 2827-2832.
- Shyu, Y. S. and Sung, W. C. 2010. Improving the emulsion stability of sponge cake by the addition of  $\gamma$ -polyglutamic acid. *Journal of Marine Science and Technology*. 18: 895-900.
- Soliman, N. A., Berekaa, M. M., Abdel-Fattah, Y. R. 2005. Polyglutamic acid (PGA) production by *Bacillus* sp. SAB-26: application of Plackett–Burman experimental design to evaluate culture requirements. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 259–267.
- Stowe, R. A. and Mayer, R. P. 1966. Efficient screening of process variables. *Industrial & Engineering Chemistry*. 58:36-40.
- Sundhagul, M., Samanmarthroj, P. and Bhodacharoen, W. 1972. Thua-nao: A fermented soybean food of northern Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*. 5: 43-56.
- Sung, H. Y., Jin, H. D., Sang, Y. L., Ho, N. C. 2000. Production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*. 585–588.
- Tanimoto, H. 2010. Food Applications of Poly-Gamma-Glutamic Acid. *Microbial Monographs*. 15:156-168.
- Wu, Q., Xu, H., Liang, J. and Yao, J., 2010. Contribution of glycerol on production of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) in *B. subtilis* NX-2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160: 386–392.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Yamamoto, S., Yoshida, H., Ohkubo, T., Sawai, H. and Morita, S. 2016. Evaluation of environmental in the mouth with the use of spray-type oral moisturizer containing  $\gamma$ -PGA. *Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*. 28:446-449.
- Yokoigawa, K., Sato, M. and Soda, K. 2006. Simple improvement in freeze-tolerance of bakers' yeast with poly- $\gamma$ -glutamate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 102: 215-219.
- Yoon, H. Y., Do, J. H., Lee, S. Y. and Chang, H. N., 2000. Production of poly-glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*. 22: 585-588.
- Zhang, H., Feng, X., Zhou, Z., Zhang, Y. and Xu, Z. 2012a. Economical production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) using untreated cane molasses and monosodium glutamate waste liquor by *Bacillus subtilis* NX-2. *Bioresource Technology*. 114: 583-588.
- Zhang, H., Zhu, J., Zhu, X., Cai, J., Zhang, A., Hong, Y., Huang, J., Huang, L. and Xu, Z. 2012b. High-level exogenous glutamic acid-independent production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) with organic acid addition in a new isolated *Bacillus subtilis* C10. *Bioresource Technology*. 116: 241-246.
- Zhu, F., Cai, J., Zheng, Q., Zhu, X., Cen, P. and Xu, Z. 2014. A novel approach for poly- $\gamma$ -glutamic acid production using xylose and corncob fibres hydrolysate in *Bacillus subtilis* HB-1. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 89: 616-622.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ก  
การเตรียมสารเคมีและการคำนวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ก.1 การเตรียมสารละลาย Hydrochloric acid (HCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เมื่อ HCl เข้มข้น 37% (W/W) ความหนาแน่น 1.19 กรัมต่อมิลลิลิตร มวลโมเลกุล 36.5 กรัมต่อโมล

$$\text{จากสูตร } C = \frac{10 \times D \times \%}{MW}$$

โดย C = ความเข้มข้น หน่วยเป็น โมลาร์  
D = ความหนาแน่น (density) หน่วยเป็น กรัมต่อมิลลิลิตร  
% = เปอร์เซ็นต์ปริมาณเนื้อกรด  
MW = มวลโมเลกุลของ HCl หน่วยเป็นกรัมต่อโมล

$$\begin{aligned} \text{จะได้ } C &= \frac{(10 \times 1.19 \times 37)}{36.5} \\ &= 12.06 \text{ โมลาร์} \end{aligned}$$

ดังนั้น กรด HCl เข้มข้น 37% (W/W) มีความเข้มข้น 12.06 โมลาร์ ถ้าต้องการเตรียมกรด HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ 250 มิลลิลิตร จากกรด HCl ความเข้มข้น 12.06 โมลาร์ จะทำการเจือจางความเข้มข้นดังกล่าวโดยคำนวณปริมาตรที่ต้องเจือจาง

$$\begin{aligned} \text{จากสูตร } N_1V_1 &= N_2V_2 \\ 12.06 \times V_1 &= 1 \times 250 \\ V_1 &= 20.73 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ปีเปตกรด HCl เข้มข้นมา 20.73 มิลลิลิตร แล้วเจือจางเป็น 250 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

\*\*\*เพื่อความปลอดภัย ให้เทกรดลงในน้ำ อย่าเทน้ำใส่กรดเด็ดขาด

### ก.2 การเตรียมสารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 2 โมลาร์

เมื่อ NaOH ความหนาแน่น 2.13 กรัมต่อมิลลิลิตร มวลโมเลกุล 39.99 กรัมต่อโมล

$$\text{จากสูตร } \frac{g}{MW} = \frac{CV}{1000}$$

โดย g = น้ำหนักของ NaOH ที่ต้องการ หน่วยเป็น กรัม  
MW = มวลโมเลกุลของ NaOH หน่วยเป็น กรัมต่อโมล  
C = ความเข้มข้นที่ต้องการ หน่วยเป็น โมลาร์  
V = ปริมาตรที่ต้องการ หน่วยเป็น มิลลิลิตร

$$\begin{aligned} \text{จะได้ } g &= \frac{(2) \times (50) \times (39.99)}{1000} \\ &= 3.99 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ชั่ง NaOH มา 3.99 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ด้วยการเติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร

### ก.3 การเตรียมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

#### ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วยสาร

3,5-Dinitrosalicylic acid	10 กรัม
Sodium hydroxide	16 กรัม
Potassium sodium tartrate	300 กรัม

ชั่งสาร 3,5-Dinitrosalicylic acid 10 กรัม ลงในบีกเกอร์ ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และชั่ง NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมสารละลายต่างที่ละน้อยลงไปจนสารละลาย คนให้เข้ากันนำไปกรองบนอ่างน้ำร้อนจนสารละลายใส เติม Potassium sodium tartrate ลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม วางไว้จนสารละลายเย็นตัว ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

### ก.4 การเตรียมสารละลาย Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) ความเข้มข้น 0.07 โมลาร์

#### ในสารละลาย 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสาร

Cetyltrimethyl ammonium bromide	12.76 กรัม
Sodium hydroxide	10 กรัม

เมื่อ CTAB มวลโมเลกุล 364.5 กรัมต่อโมล

$$\text{จากสูตร } \frac{g}{MW} = \frac{CV}{1000}$$

โดย g = น้ำหนักของ NaOH ที่ต้องการ หน่วยเป็น กรัม  
 MW = มวลโมเลกุลของ NaOH หน่วยเป็น กรัมต่อโมล  
 C = ความเข้มข้นที่ต้องการ หน่วยเป็น โมลาร์  
 V = ปริมาตรที่ต้องการ หน่วยเป็น มิลลิลิตร

$$\text{จะได้ } \frac{g}{364.5} = \frac{(0.07) \times (500)}{1000}$$

$$g = 12.76 \text{ กรัม}$$

NaOH 2% ใน CTAB ความเข้มข้น 0.07 โมลาร์

CTAB 100 มิลลิลิตร ใช้สาร NaOH 2 กรัม

ถ้า CTAB 500 มิลลิลิตร ใช้สาร NaOH  $2 \times 500 = 10$  กรัม

100

ชั่ง NaOH มา 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยการเติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร และชั่ง CTAB มา 12.76 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ แล้วนำ NaOH ที่เตรียมเติมใส่ลงใน CTAB 300 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยการเติม NaOH ที่เตรียมไว้ให้ครบ 500 มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

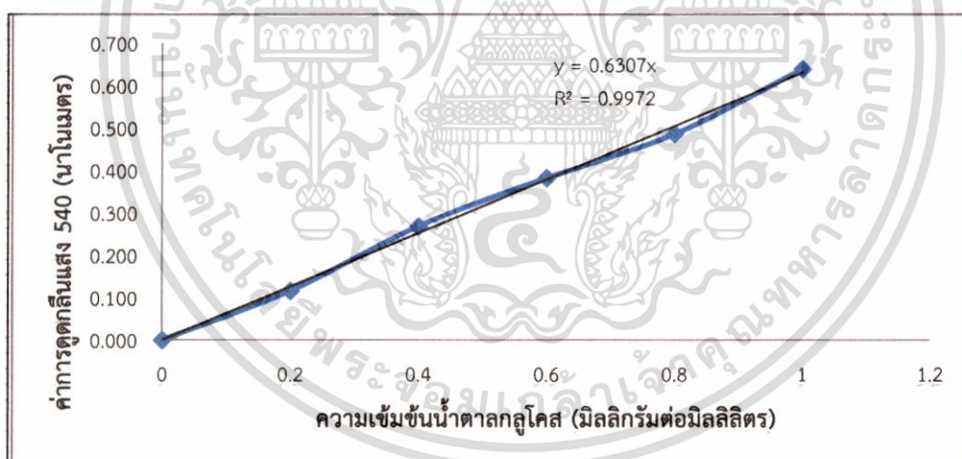
### ข.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ข-1 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานและค่า OD<sub>540</sub> ที่กลูโคสความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	การเจือจาง		ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัม / มล.)	OD <sub>540</sub>
	สารมาตรฐาน (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)		
1	0	10	0	0
2	2	8	0.2	0.084
3	4	6	0.4	0.170
4	6	4	0.6	0.260
5	8	2	0.8	0.338
6	10	0	1.0	0.432

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสง x อัตราการเจือจาง  
ความเข้มข้น



ภาพผนวกที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

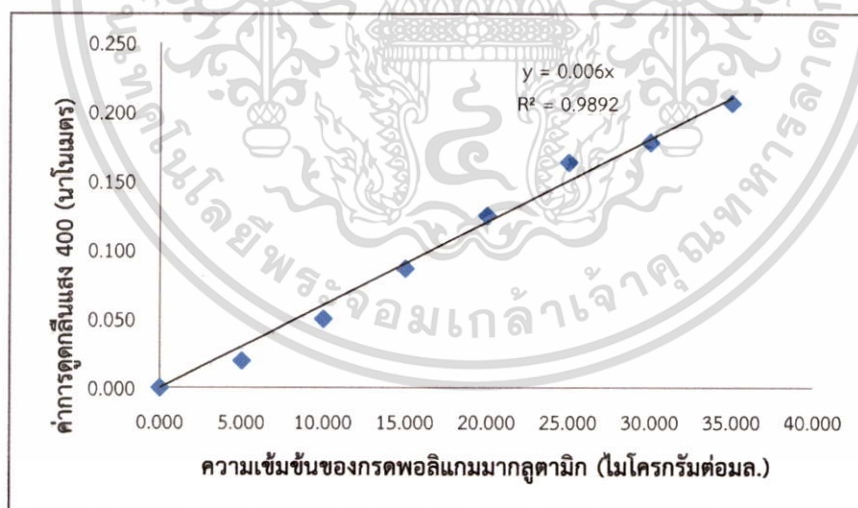
## ข.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิกความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิก 0.002 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิก มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 5 10 15 20 25 30 และ 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ข-2 การเจือจางสารละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิกมาตรฐานและค่า OD<sub>400</sub> ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอด ที่	การเจือจาง		ความเข้มข้น $\gamma$ -PGA (ไมโครกรัม / มล.)	OD400
	สารมาตรฐาน (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)		
1	0	5	0	0.000
2	0.62	4.37	5	0.020
3	1.25	3.75	10	0.050
4	1.87	3.12	15	0.087
5	2.5	2.5	20	0.125
6	3.12	1.87	25	0.164
7	3.75	1.25	30	0.178
8	4.37	0.62	35	0.207

ปริมาณ  $\gamma$ -PGA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) =  $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความเข้มข้น}}$



ภาพผนวกที่ ข-2 กราฟมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Effect of Metabolic Intermediates on Poly ( $\gamma$ -Glutamic Acid) Production by *Bacillus Licheniformis* SRU01

Pronsuda Sarjid, Srinthip Thongtharvonsuwan, Surachai Yaiyen  
and Wiramsri Sriphochanart\*

Faculty of Agro-Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang,  
1 Chalongkrung Rd. Ladkrabang, Bangkok, Thailand 10520

\*Corresponding author. E-mail: wiramsri.sr@kmitl.ac.th

**ABSTRACT:** The objective of this study was to investigate effect of the addition of metabolic intermediates on poly- $\gamma$ -glutamic acid) production by *B. licheniformis* SRU01. Central composite design (CCD) was used for experimental design. The optimum concentrations of the 3 metabolic intermediates including  $\alpha$ -ketoglutaric acid ( $X_1$ ), L-glutamine ( $X_2$ ) and citric acid ( $X_3$ ) which yielded the highest  $\gamma$ -PGA concentration were determined. The fermentation was agitated at 200 rpm at 37 °C for 72 h with an initial pH of 7.0. The optimization analysis found that the optimum concentrations of metabolic intermediates for  $\gamma$ -PGA production were 18.41 mM of  $\alpha$ -ketoglutaric acid, 0.92 mM of L-glutamine and 28.41 g/L of citric acid. The prediction value of poly- $\gamma$ -glutamic acid) was 9.68 g/L. The results suggest that the addition of metabolic pathway intermediates,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, L-glutamine and citric acid can enhance poly( $\gamma$ -glutamic acid) production by *B. licheniformis* SRU01.

**Keywords:** Poly- $\gamma$ -glutamic acid), biopolymer, *Bacillus licheniformis*, metabolic intermediate, fermentation

### INTRODUCTION

Poly- $\gamma$ -glutamic acid), known as  $\gamma$ -PGA, is an anionic biopolymer composed of D- and L-glutamic acid polymerized by gamma amide linkages. Its biological properties are water-soluble, edible, biodegradable and non-toxic to human and environmental safety. According to these properties,  $\gamma$ -PGA has been applied in food, drug, cosmetic industries and waste water treatment [1]. The polymer is synthesized by *Bacillus* spp. through fermentation process for example *B. subtilis* MJ80, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. pumilis* and *B. licheniformis* [2]. The biosynthesis of  $\gamma$ -PGA in bacteria is consists of 2 steps. The first step is glutamic

acid formation, and the second step is polymerization of glutamic acid unit [3] as shown in Figure 1.

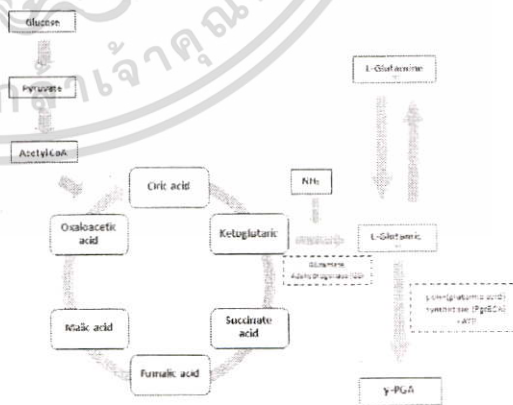


Figure 1 Pathway of poly- $\gamma$ -glutamic acid) synthesis

The synthesis occurs through the pathway of Krebs cycle. Metabolic intermediates of Krebs cycle such as  $\alpha$ -ketoglutaric acid and L-glutamine can also enhance enzymatic activity for production of the polymer. In order to increase  $\gamma$ -PGA production, researchers have determined the nutrient requirements and revealed that the nutrient requirements depended on the bacterial strain. The effect of addition of different amino acids and Krebs cycle intermediates as metabolic precursors on  $\gamma$ -PGA production by *B. licheniformis* NCIM 2324 was studied [5]. The medium supplemented with L-glutamine and  $\alpha$ -ketoglutaric acid gave the highest yield of 35.75 g/L. The utilization of L-glutamic acid also increased during fermentation with the addition of the precursors. Moreover, the effect of different organic acids which are metabolic intermediates in Krebs cycle on  $\gamma$ -PGA production by *B. subtilis* C10 was evaluated [6]. The results indicated that citric acid and oxalic acid could significantly increase the production of  $\gamma$ -PGA by *B. subtilis* C10. Therefore, this study investigated effect of metabolic intermediate concentrations of  $\alpha$ -ketoglutaric acid, L-glutamine and citric acid on  $\gamma$ -PGA production by a new isolated *B. licheniformis* SRU01.

## MATERIAL AND METHODS

### *Bacterial strain, medium and culture condition*

*B. licheniformis* SRU01,  $\gamma$ -PGA producing strain, isolated from chicken manure was kindly obtained from Dr. Harit Nimraksa, Division of Agriculture Technology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University. Working stocks of culture were maintained at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 20% glycerol cell suspension. Bacterial cells for immediate use were kept at  $4^{\circ}\text{C}$  on LB (Luria-Bertani) agar slant. A medium E modified with glucose as carbon source was used for  $\gamma$ -PGA containing : L-glutamic acid, 20.0 g/L; glucose, 20.0 g/L;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 7.0 g/L;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g/L;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.04 g/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.15 g/L;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.04 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 g/L [7]. The medium was then supplemented with different concentrations of metabolic intermediates including  $\alpha$ -ketoglutaric acid, L-glutamine and citric acid. The initial pH was adjusted to 7.0 by using either 2 M NaOH or 2 M HCl. A loopful of cells from a slant was transferred to 30 mL of LB broth in 250 mL Erlenmeyer flask and then incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 200 rpm. The cultures used for inocula for all cultivation were standardized to  $1.0 \pm 0.1$  OD (Optical density) at 600 nm and were added to the medium at 10% (v/v). The culture cultivations were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  and under shaking condition (200 rpm) for 72 h on a rotary shaker. All the fermentations were carried out in duplicates. The samples were collected at the end of fermentation and analyzed for  $\gamma$ -PGA concentration and dry cell weight (DCW).

### *Analytical methods*

For DCW, 50 mL of fermentation culture was centrifuged at 6,000 g for 15 min. The cell pellets were then washed twice with 40 mL of distilled water and dried to constant weight at  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

$\gamma$ -PGA was extracted by ethanol method [8]. After cell removing, three volumes of cold ethanol was added to the supernatant and kept at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for overnight. Crude  $\gamma$ -PGA was collected by centrifugation at 10,000 g and  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min, and dissolved in distilled water. The concentration of  $\gamma$ -PGA was determined by spectrophotometer base on the complexation reaction with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) [9]. The turbidity of micelle-like complex was measured at 400 nm.

### *Experimental design*

A Central Composite Design (CCD) was conducted to formulate the medium that yielded optimal effect for the highest  $\gamma$ -PGA production by *B. licheniformis* SRU01. The independent variables selected for the study

of  $\gamma$ -PGA production were  $\alpha$ -ketoglutaric acid, L-glutamine and citric acid. For the 3 factors, this trial was a  $2^3$  factorial design extended by 6 axial points coded  $\pm\alpha$  and 6

central points, resulting in a total of 20 experiments. The factors and levels corresponding to the CCD are shown in Table 1.

Table 1 The independent variables and levels in CCD

Independent variables	Levels				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X <sub>1</sub> $\alpha$ -Ketoglutaric acid (mM)	1.59	5	10	15	18.41
X <sub>2</sub> L-Glutamine (mM)	0.08	0.25	0.5	0.75	0.92
X <sub>3</sub> Citric acid (g/L)	11.59	15	20	25	28.41

The response variable was fitted by the model expressed as follow:

$$y = \beta_0 + \beta_1 \sum_{i=1}^3 x_i + \beta_{ij} \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 x_i x_j + \beta_{ii} \sum_{i=1}^3 x_i^2 \quad (1)$$

Where  $y$  is the predicted response,  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_{ij}$  and  $\beta_{ii}$  are the intercept term, linear coefficient, interactive coefficient, and quadratic coefficient, respectively; and  $x_i$  and  $x_j$  are coded independent variables.

The statistics were analysed by using the Design Expert Software.

## RESULT AND DISCUSSION

The relationship between  $\gamma$ -PGA production, dry cell weight and 3 independent variables including  $\alpha$ -ketoglutaric acid (X<sub>1</sub>), L-glutamine (X<sub>2</sub>) and citric acid (X<sub>3</sub>) were investigated. The optimum values of the parameters for maximum  $\gamma$ -PGA and biomass productions were determined by using CCD. The matrix corresponding to the CCD is shown in Table 2, together with  $\gamma$ -PGA and biomass productions.

The maximum  $\gamma$ -PGA production at 1.63 g/L was observed in treatment 10 which was 18.41 mM  $\alpha$ -ketoglutaric acid, 0.5 mM L-glutamine and 20 g/L citric acid. The result was in accordance with the study of Zhang *et*

*al.* (2012) [6] which revealed that the highest yield of  $\gamma$ -PGA was obtained when 20 g/L citric acid was used. As a result, bacterial cell can convert citric acid to  $\alpha$ -ketoglutaric acid. Then,  $\alpha$ -ketoglutaric acid reacts with L-glutamine to generate L-glutamic acid which is a unit of  $\gamma$ -PGA.

The data was then analyzed by multiple regression analysis. An equation (2) was derived to represent  $\gamma$ -PGA production (g/L) ( $y_1$ ) as a function of the independent variables tested.

$$y_1 = -3.668 + 0.066x_1 + 3.044x_2 + 0.354x_3 + 0.001x_1^2 - 0.592x_2^2 - 0.006x_3^2 - 0.067x_1x_2 - 0.002x_1x_3 - 0.079x_2x_3 \quad (2)$$

An equation (3) for DCW (g/L) ( $y_2$ ) was developed based on a regression analysis of the experiment data.

$$y_2 = 1.545 - 0.0286x_1 + 1.458x_2 - 0.0898x_3 + 0.0003x_1^2 - 0.407x_2^2 + 0.00174x_3^2 - 0.031x_1x_2 + 0.00265x_1x_3 - 0.043x_2x_3 \quad (3)$$

The regression results and the summary of the analysis of variance for the selected quadratic equations are illustrated in Table 3 and Table 4, respectively.

The analysis of variation demonstrated that the models were highly significant as

evidenced by low P value ( $P < 0.05$ ). According to lack of fit, the model of  $\gamma$ -PGA production and the model of DCW were insignificant ( $P = 0.053, 0.426$ ).

Table 2 Experimental design and results of  $\gamma$ -PGA and biomass productions

Treatments	Factors			$\gamma$ -PGA (g/L)		DCW (g/L)	
	$\alpha$ -Ketoglutaric acid ( $X_1$ ) (mM)	L-Glutamine ( $X_2$ ) (mM)	Citric acid ( $X_3$ ) (g/L)	Experiment	Model	Experiment	Model
1	5	0.25	15	0.72	0.84	0.77	0.79
2	15	0.25	15	1.20	1.23	0.89	0.89
3	5	0.75	15	1.27	1.30	0.89	0.92
4	15	0.75	15	1.14	1.36	0.85	0.86
5	5	0.25	25	1.47	1.68	0.62	0.61
6	15	0.25	25	1.44	1.87	1.00	0.97
7	5	0.75	25	1.35	1.75	0.52	0.53
8	15	0.75	25	1.27	1.61	0.75	0.73
9	1.59	0.5	20	1.33	1.58	0.70	0.66
10	18.41	0.5	20	1.63	1.71	0.86	0.91
11	10	0.08	20	1.15	1.43	0.73	0.74
12	10	0.92	20	1.43	1.60	0.65	0.64
13	10	0.5	11.59	0.62	0.74	1.04	1.01
14	10	0.5	28.41	1.26	1.65	0.73	0.76
15	10	0.5	20	1.36	1.62	0.80	0.76
16	10	0.5	20	1.45	1.62	0.79	0.76
17	10	0.5	20	1.42	1.62	0.74	0.76
18	10	0.5	20	1.45	1.62	0.79	0.76
19	10	0.5	20	1.32	1.62	0.71	0.76
20	10	0.5	20	1.38	1.62	0.74	0.76

Table 3 Regression analysis of  $\gamma$ -PGA and biomass productions

Factor	Coef		SE Coef		T-Value		P-Value	
	$\gamma$ -PGA	DCW	$\gamma$ -PGA	DCW	$\gamma$ -PGA	DCW	$\gamma$ -PGA	DCW
Constant	-3.668	1.545	0.566	0.239	-6.48	6.47	0.000	0.000
$\alpha$ -Ketoglutaric acid	0.066	-0.029	0.035	0.0147	1.90	-1.95	0.087	0.080
L-Glutamine	3.044	1.458	0.695	0.294	4.38	4.96	0.001	0.001
Citric acid	0.354	-0.0898	0.042	0.0179	8.33	-5.00	0.000	0.001
$\alpha$ -Ketoglutaric acid $\times\alpha$ -Ketoglutaric acid	0.001	0.0003	0.001	0.0004	1.28	0.64	0.230	0.536
L-Glutamine $\times$ L-Glutamine	-0.592	-0.4066	0.382	0.162	-1.55	-2.52	0.152	0.031
Citric acid $\times$ Citric acid	-0.006	0.00174	0.001	0.0004	-6.75	4.32	0.000	0.002
$\alpha$ -Ketoglutaric acid $\times$ L-Glutamine	-0.067	-0.031	0.026	0.0108	-2.61	-2.86	0.026	0.017
$\alpha$ -Ketoglutaric acid $\times$ Citric acid	-0.002	0.00265	0.001	0.0005	-1.81	4.89	0.100	0.001
L-Glutamine $\times$ Citric acid	-0.079	-0.043	0.026	0.0108	-3.10	-3.97	0.011	0.003

Table 4 Analysis of variance for the select model of  $\gamma$ -PGA and biomass productions

Source	DF		Adj SS		Adj MS		F-Value		P-Value	
	$\gamma$ -PGA	DCW	$\gamma$ -PGA	DCW	$\gamma$ -PGA	DCW	$\gamma$ -PGA	DCW	$\gamma$ -PGA	DCW
Regression	9	9	1.032	0.268	0.115	0.030	14.01	20.32	0.000	0.000
Lack-of-Fit	5	5	0.068	0.008	0.014	0.002	4.92	1.19	0.053	0.426
Pure Error	5	5	0.014	0.007	0.003	0.001	0.00			
Total	19	19	1.113	0.283						

In addition, the coefficient of determination,  $R^2$  of  $\gamma$ -PGA production model was 0.927 and  $R^2$  adjust was 0.86 indicating that 92.5% of variation was explained by the model. For DCW model, the coefficient of determination ( $R^2=0.945$ ,  $R^2$  adjust = 0.901) was also satisfactory. Comparison between experimental and modeled results of  $\gamma$ -PGA production and DCW was shown in Table 2. The linear regression analysis represented that the modeled results were in good agreement with experimental results. Moreover, Root Mean Squared Error (RMSE) of  $\gamma$ -PGA production and DCW were 0.252 and 0.027, respectively. The RMSE values close to 0 revealed that values predicted by

the models were slightly different from the actual values from the experiments. Therefore, the model equations (2) and (3) could be used for predicting  $\gamma$ -PGA production and DCW. According to the coefficients (Table 3), the positive sign in front of the terms indicated synergetic effect, whereas the negative sign indicated antagonistic effect. From equation (2), the highest positive value of the term  $X_2$  was 3.044. The result implied that the most influential factor for  $\gamma$ -PGA production was L-glutamine ( $P<0.05$ ). Additionally, citric acid also significantly affected  $\gamma$ -PGA production due to the positive coefficient of  $X_3$  (0.354). Similar to Bajaj and Singhal

(2009) [5] and Moraes *et al.* (2012) [10], L-glutamine and citric acid were factors which enhanced the higher production of  $\gamma$ -PGA. According to the optimization analysis from the surface response plots, concentrations of metabolic intermediates,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, L-glutamine and citric acid for  $\gamma$ -PGA production were optimized to be 18.41 mM, 0.92 mM and 28.41 g/L, respectively. Prediction value of  $\gamma$ -PGA was 9.68 g/L. The experimental validation of the model produced 8.74 g/L  $\gamma$ -PGA.

## CONCLUSIONS

The optimization results from CCD and surface response method illustrated that the addition of metabolic intermediates, especially, L-glutamine and citric acid significantly enhanced poly( $\gamma$ -glutamic acid) production by *B. licheniformis* SRU01. The optimal concentrations of  $\alpha$ -ketoglutaric acid, L-glutamine and citric acid for  $\gamma$ -PGA production were 18.41 mM, 0.92 mM and 28.41 g/L, respectively. The maximum concentration of  $\gamma$ -PGA was 9.68 g/L which achieved at 72 h of fermentation.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financially supported by The Fiscal Year Fund 2016, Faculty of Agro-Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

## REFERENCES

- [1] Ogunleye, A., Bhat, A., Irorere, V.U., Hill, D., Williams, C. and Radecka, I. (2015). Poly- $\gamma$ -glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiology*. 161: 1-17.
- [2] Bajaj, I. and Singhal, R. (2011). Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*. 102: 5551-5561.
- [3] Shih, I.L. and Van, Y.T. (2001). The production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various application. *Bioresource Technology*. 79: 207-225.
- [4] Kunioka, M. and Atsuo, G. (1995). Biosynthesis of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 44: 501-506.
- [5] Bajaj, I. and Singhal, R. (2009). Enhanced production of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM2324 by using metabolic precursors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 159: 133-141.
- [6] Zhang, H., Zhu, J., Zhu, X., Cai, J., Zhang, A., Hong, Y., Huang, J., Huang, L. and Xu, Z. (2012). High-level exogenous glutamic acid-independent production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) with organic acid addition in a new isolated *Bacillus subtilis* C10. *Bioresource Technology*. 116: 241-246.
- [7] Mitsunaga, H., Meissner, L., Palmen, T., Bamba, T., Büchs, J. and Fukusaki, E. (2016). Metabolome analysis reveals the effect of carbon catabolite control on the poly( $\gamma$ -glutamic acid) biosynthesis of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 4: 413-419.
- [8] Goto, A. and Kunioka, M. (1992). Biosynthesis and hydrolysis of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 56: 1031-1035.
- [9] Ashiuchi M. (2011). Analytical approaches to poly- $\gamma$ -glutamate: Quantification, molecular size determination, and stereochemistry investigation. *Journal of Chromatography B*. 879: 3096-3101.

- [10] [10] Moraes, L.P., Alegre, R.M. and Brito, P.N. (2012). Optimisation of Poly( $\gamma$ -Glutamic Acid) Production by *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 in Liquid Fermentation with Molasses as the carbon source without Addition of Glutamic Acid. *International Review of Chemical Engineering*. 4: 618-623.



---

The 19<sup>th</sup> Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC 2017)  
*Innovative Food Science and Technology For Mankind:  
Empowering Research for Health and Aging Society*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ใด ๆ 773  
แม้ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## แบบรายงานการใช้จ่ายเงินโครงการวิจัย

## สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานความก้าวหน้า ครั้งที่.....รอบ.....เดือน ประจำปีงบประมาณ 2559.....

 แหล่งงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ)
  แหล่งเงินรายได้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ผลของสารตั้งต้นในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยเชื้อ *Bacillus.licheniformis* และ *Bacillus.megaterium*

(ภาษาอังกฤษ) Effect of metabolic pathway precursors on poly-γ-glutamic acid production by *Bacillus.licheniformis* and *Bacillus.megaterium*

ชื่อ-สกุลหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน/ผู้วิจัย อ.ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2560

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี เดือน

## ข้อมูลการรายงานค่าใช้จ่ายงบประมาณโครงการวิจัย

## 1. การเบิกจ่ายงบประมาณ (กรณีการจ่ายเงินถ้าจ่ายงวดเดียวให้ลบข้อที่ไม่เกี่ยวข้องออก)

งวดที่ 1 47,600 บาท 85% วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ว/ด/ป) -

งวดที่ 2 8,400 บาท 15% วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ว/ด/ป) -

## 2. สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย)

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ (หรือเกิน)
งบบุคลากร :ค่าจ้างชั่วคราว	-	-	-
งบดำเนินงาน			
ค่าตอบแทน	-	-	-
ค่าใช้สอย	2,000	370	1,630
ค่าวัสดุ	54,000	55,678.61	1,678.61 (เกิน)
ค่าสาธารณูปโภค	-	-	-
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
<b>รวม</b>	<b>56,000</b>	<b>56,048.61</b>	<b>48.61 (เกิน)</b>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ข้อมูลประวัติผู้วิจัย

### ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ

ตำแหน่ง อาจารย์

### ประวัติการศึกษาสูงสุด

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วศ.ด.	วิศวกรรมเคมี	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	2552
วท.ม	ชีวเคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2546
วท.บ	เคมี	มหาวิทยาลัยศิลปากร	2542

สถานที่ติดต่อ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร อาคารเจ้าคุณทหาร (C316/3) สจล.

ประสบการณ์วิจัยหรือสาขาที่ชำนาญ (1) อาหารหมัก  
(2) เทคโนโลยีการหมัก  
(3) โปรไบโอติกและพรีไบโอติก

## 2. ผลงาน

### ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์/สิ่งประดิษฐ์/สิทธิบัตร

#### 2.1 งานวิจัย

- 2.1.1 การผลิตผลิตภัณฑ์เจลผสมโปรไบโอติกและพรีไบโอติก  
ปี พ.ศ.2560  
สถานภาพ หัวหน้าโครงการ  
ทุนวิจัย ทุนวิจัยเงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
- 2.1.2 การกระตุ้นการสร้างบีตาไกลูแคนด้วยแทนนิน และศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของบีตาไกลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis* RU01  
ปี พ.ศ.2560  
สถานภาพ หัวหน้าโครงการ  
ทุนวิจัย ทุนวิจัยเงินงบประมาณ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
- 2.1.3 การผลิตกรดพอลิแกมมาไกลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* ในกระบวนการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะ  
ปี พ.ศ.2560  
สถานภาพ หัวหน้าโครงการ  
ทุนวิจัย ทุนวิจัยเงินงบประมาณคณะอุตสาหกรรมเกษตร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.1.4 การผลิตตรึงเซลล์ *Acetobactor aceti* WK ด้วยใยบัวร่วมกับแคปป์คาร์ราจีแนน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะซิติก

ปี พ.ศ. 2561-62

สถานภาพ หัวหน้าโครงการ

ทุนวิจัย ทุนพัฒนานักวิจัย กองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 2.2 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ (จำแนกระดับชาติและระดับนานาชาติหรือเทียบเท่า)

### ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับนานาชาติ

Chotigavin, N., Yaiyen, S., Kudan, S. 2 and **Sriphochanart, W.** Stimulation of Beta-glucan production from *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 by tannin. The 7<sup>th</sup> International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (FerVAAP 2017), Khonkhen, Thailand, 25-28 July, 2017.

Sarjid, P., Thongtharvonswan, S., Yaiyen S. and **Sriphochanart, W.** Effect of metabolic intermediates on poly-( $\gamma$ -glutamic acid) production by *Bacillus licheniformis* SRU01. The 19<sup>th</sup> Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC 2017). Innovative Food Science and Technology For Mankind: Empowering Research for Health and Aging Society, BITEC, 15-17 June 2017.

Wirunhatadaphong, I., Yaiyen, S. and **Sriphochanart, W.** The study of poly- $\gamma$ -glutamic acid production from cassava starch by *Bacillus megaterium* SRU02. The 19<sup>th</sup> Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC 2017). Innovative Food Science and Technology For Mankind: Empowering Research for Health and Aging Society, BITEC, 15-17 June 2017.

Chookaew, T., Wongwathanarat, K., Saimmai, A., **Sriphochanart, W.** and Danaisilichichon, C. Comparison of DNA Extraction methods and modification for PCR assay to detect genetically modified papaya and processed papaya products. The 19th Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC 2017). Innovative Food Science and Technology For Mankind: Empowering Research for Health and Aging Society, BITEC, 15-17 June 2017.

Laorjinyo, T., Swetwiwathana, A., Jindaprasert, A. **Sriphochanart, W.**, Kerdpi boon, S. and Vattanamanee, S. Effect of sodium lactate on inhibition of *Clostridium perfringens* spores in sous-vide model (SVM) broth. The 18<sup>th</sup> Food Innovation Asia Conference 2016 (FIAC 2016), Food Research and Innovation for Sustainable Global Prosperity, 16-18 June 2016. Bangkok, Thailand.

Tipayaklairaj, W., Mhoophueng, S., **Sripochanart, W.** and Yaiyen, S. The optimization of  $\beta$ -cyclodextrin production from gelatinized cassava starch. The 6<sup>th</sup> International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (FerVAAP 2015), Khonkhen, Thailand, 29-31 June, 2015.

**2.3 ผลงานที่ได้รับการอ้างอิงในวงวิชาการ (จำแนกระดับชาติและระดับนานาชาติหรือเทียบเท่า)  
ผลงานที่ได้รับการอ้างอิงในวงวิชาการระดับนานาชาติ**

**Sripochanart, W.** and Skolpap, W. (2010). Characterization of proteolytic effect of lactic acid bacteria starter cultures on Thai fermented sausages. *Food Biotechnology*. 24: 293-311.

**Prousoontorn, M. H., Jongmeevasana, P., Sripochanart, W.** and Pongsawasdi, P. (2008). Development of carbendazim and carbaryl detection method using immobilized cyclodextrin in competitive tracer encapsulation assay. *Journal of Biotechnology*. 136: 751-752.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้