# สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02

# OPTIMUM CONDITION FOR POLY-γ-GLUTAMIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY *Bacillus megaterium* SRU02


อิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงศ์

ISSARAPORN WIRUNHATADAPHONG


วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561


KMITL-2018-AI-M-053-318

# สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02

# OPTIMUM CONDITION FOR POLY-γ-GLUTAMIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY *Bacillus megaterium* SRU02


**อิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงศ์**

**ISSARAPORN WIRUNHATADAPHONG**


**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**

**สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร**

**คณะอุตสาหกรรมเกษตร**

**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

**พ.ศ. 2561**


**KMITL-2018-AI-M-053-318**



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# OPTIMUM CONDITION FOR POLY-γ-GLUTAMIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY *Bacillus megaterium* SRU02

**ISSARAPORN WIRUNHATADAPHONG**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT**

**OF THE REQUIREMENT FOR DEGREE OF**

**MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE**

**AGRO-INDUSTRY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**2018**

**KMITL-2018-AI-M-053-318**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**COPYRIGHT 2018**

**FACULTY OF AGRO-INDUSTRY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**คณะอุตสาหกรรมเกษตร**

**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

**ใบรับรองวิทยานิพนธ์**

---

**หัวข้อวิทยานิพนธ์** สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02

OPTIMUM CONDITION FOR POLY-γ-GLUTAMIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY *Bacillus megaterium* SRU02

**ชื่อนักศึกษา** นางสาวอิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงษ์

**รหัสประจำตัว** 59608028

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

**สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์การอาหาร

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม** -

| คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ | |
| ผศ.ดร.อังคณา วิภาตนาวิน | |
| ดร.ปนัดดา นนทนำ | |
| ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น | |

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 26 กรกฎาคม 2561 เวลา 13.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 303 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่...26...เดือน...กรกฎาคม...พ.ศ...2561...

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อวิทยานิพนธ์** สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02

**นักศึกษา** นางสาวอิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงศ์

**รหัสประจำตัว** 59608028

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

**สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์การอาหาร

**พ.ศ.** 2561

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ

## บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02 โดยกระบวนการหมักแบบกะ ซึ่งในการทดลองใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังคือ 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ความเข้มข้นของกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงสุดเป็น 0.082 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) เท่ากับ 0.1081 ต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Productivity) $5.78\times10^{-8}$ g/ Log CFU/ h จากนั้นความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 40 กรัมต่อลิตร ถูกใช้สำหรับผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกในถังหมักขนาด 7 ลิตร ที่ปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร ด้วยกระบวนการหมักแบบกะเพื่อศึกษาอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนที่เหมาะสม โดยสภาวะที่ทำการศึกษาคือ อัตราการให้อากาศ 2 ระดับ คือ 1 และ 2 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที กับอัตราการกวนของใบพัด 2 ระดับ คือ 300 และ 500 รอบต่อนาที ผลพบว่าที่สภาวะอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที และอัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมแก่การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกมากที่สุด ซึ่งสามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้สูงที่สุดคือ 0.0589 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงที่สุด $7.37\times10^{-8}$ g/ Log CFU/ h ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล ($k_La$) สูงสุดเท่ากับ 8.19 ต่อชั่วโมง และมีอัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) ถึง 1.3901 และ 0.0359 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

**คำสำคัญ**: กรดพอลิแกมมากลูตามิก แป้งมันสำปะหลัง พอลิเมอร์ชีวภาพ อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน *Bacillus megaterium* SRU02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Thesis** | Optimum condition for poly-γ-glutamic acid production from cassava starch by *Bacillus megaterium* SRU02 |
| **Student** | Miss. Issaraporn Wirunhatadaphong |
| **Student ID.** | 59608028 |
| **Degree** | Master of Science |
| **Program** | Food Science |
| **Year** | 2018 |
| **Thesis Advisor** | Dr. Wiramsri Sriphochanart |

## ABSTRACT

The aims of this study were to determine optimum concentration of cassava starch for poly-γ-glutamic acid (γ-PGA) production by *Bacillus megaterium* SRU02 and optimize conditions for γ-PGA production in batch fermentation by *B. megaterium* SRU02. The concentration of cassava starch at 20, 40, 60 and 80 g/L were investigated and the concentration of ammonium chloride at 10 g/L was added into the starch medium. The results indicated that cassava starch at concentration of 40 g/L yielded the highest γ-PGA at 48 hours of fermentation period. The highest concentration of γ-PGA was 0.082 g/L with the maximum specific growth rates ($\mu_{max}$) was 0.1081 $h^{-1}$ and the γ-PGA productivity of $5.78\times10^{-8}$ g/ Log CFU/ h. The concentration of cassava starch at 40 g/L was used for γ-PGA production in a 7 liter fermenter with 5 L of working volume. The optimum aeration rate and agitation rate were determined. Two aeration rates at 1 and 2 vvm and two agitation rates at 300 and 500 rpm were used. It was found that aeration rate at 1 vvm and agitation rate at 300 rpm were the optimum condition for γ-PGA production. The highest concentration of γ-PGA was 0.0589 g/L at 48 hours with the γ-PGA productivity of $7.37 \times 10^{-8}$ g/ Log CFU/ h. The maximum mass transfer coefficient ($k_L$a) was 8.19 $h^{-1}$. The specific growth rates (μ) and maximum specific growth rates ($\mu_{max}$) were 1.3901 and 0.0359 $h^{-1}$, respectively.

**Keywords**: Poly-γ-glutamic acid, Cassava starch, Biopolymer, Aeration rate, Agitation rate, *Bacillus megaterium* SRU02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในหัวข้อเรื่องสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมา-กลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02 (Optimum condition for poly-γ-glutamic acid production from cassava starch by *Bacillus megaterium* SRU02) สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับคำปรึกษา คำแนะนำ และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ รวมไปถึงการแก้ปัญหาต่างๆ

ขอขอบพระคุณอย่างยิ่งต่ออาจารย์ ดร. วิรามศรี ศรีพจนารถ ซึ่งให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและกรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อแนะนำและให้คำแนะนำ แก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดขึ้น เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์ ผศ.ดร. อังคณา วิภาตนาวิน และ ดร. ปนัดดา นนทนำ กรรมการการสอบหัวข้อ และโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่กรุณาได้ให้คำแนะนำตลอดชี้แนะ จนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. สุรชัย ใหญ่เย็น ที่ให้เกียรติเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี และ

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำในข้อบกพร่องต่าง ๆ และคอยเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดามารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประศาสตร์วิชาความรู้ และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

อิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงศ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย…… I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…….... II

กิตติกรรมประกาศ……... III

สารบัญ……... IV

สารบัญตาราง…….. VII

สารบัญภาพ…….. VIII

บทที่ 1 บทนำ……... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา…….. 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของงานวิจัย……... 2

1.3 ขอบเขตงานวิจัย……..... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……..... 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง……..... 3

2.1 กรดพอลิแกมมากลูตามิก (Poly-γ-glutamic acid) ……. 3

2.2 การนำไปประยุกต์ใช้……... 5

2.3 ชนิดแบคทีเรียที่สังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก……..... 8

2.4 *Bacillus megaterium*…… 9

2.5 วิถีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก……..... 11

2.6 แหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อที่ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก……..... 13

2.7 แป้งมันสำปะหลัง……..... 15

2.8 กระบวนการผลิตทางชีวภาพ…… 16

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงาน…….. 20

3.1 วัตถุดิบ……..... 20

3.2 เชื้อจุลินทรีย์……..…..... 20

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี…… 20


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ..... 21
3.5 สถานที่ทำการทดลอง..... 22
3.6 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง..... 22
3.7 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 22
3.7.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ..... 22
3.7.2 การตรวจวิเคราะห์..... 25
3.7.3 การตรวจวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS..... 26
3.8 วิธีคำนวณค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์..... 26
3.8.1 อัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$)..... 26
3.8.2 อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$)..... 26
3.8.3 ผลได้ของเซลล์ (Biomass yield, $Y_{X/S}$)..... 26
3.8.4 ผลได้การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก (Product yield, $Y_{P/S}$)..... 27
3.8.5 อัตราผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Specific productivity) ..... 27
3.8.6 ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล ($k_L a$) ..... 27

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล..... 28
4.1 ศึกษาผลของกรดกลูตามิกที่มีต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02..... 28
4.2 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดพอลิแกมมา-กลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02..... 30
4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 โดยกระบวนการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 7 ลิตร..... 38
4.3.1 การเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02..... 38
4.3.2 การใช้น้ำตาลรีดิวซ์และการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก..... 41
4.3.3 การใช้ออกซิเจน..... 48

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

**หน้า**

5.1 สรุปผลการทดลอง…….. 51
5.2 ข้อเสนอแนะ……... 51

บรรณานุกรรม…….. 53

ภาคผนวก……..... 62
ภาคผนวก ก……..……. 63
ภาคผนวก ข.....…… 64
ภาคผนวก ค……..…… 67

ประวัติผู้เขียน…… 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**


3.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ……..... 22

4.1 การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดแอลกลูตามิกและไม่เติมกรดแอลกลูตามิก……..... 28

4.2 ตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *B. megaterium* SRU02……..... 37

4.3 ตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกในกระบวนการหมักแบบกะจากอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *B. megaterium* SRU02……..... 50

ค.1 สารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ …..……..... 69

ค.2 สารละลายมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิก ……..…….. 71


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ

**ภาพที่** **หน้า**


2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรดพอลิแกมมากลูตามิก (Poly-γ-glutamic acid)…….. 4

2.2 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของ *Bacillus megaterium* ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า…….... 10

2.3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ *Bacillus megaterium* (สีเหลือง) ที่กำลังขยาย 15,000 เท่า……...…….....…. 10

2.4 โคโลนีของเชื้อ *B. megaterium* SRU02……...……. 11

2.5 การสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิกของแบคทีเรียชนิดที่ต้องการกรดกลูตามิก…...……...……...…… 12

2.6 การสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิกของแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการกรดกลูตามิก……...……...…… 13

2.7 การหมักแบบกะ (Batch fermentation).....……...…… 16

2.8 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation).....……...…… 17

2.9 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)……..……..... 17

3.1 ถังหมักระดับห้องปฏิบัติการทดลอง ขนาด 7 ลิตร……..... 24

4.1 การเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลัง..... 33

4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลัง……...……...……. 34

4.3 ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลัง……...…….... 35

4.4 การเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ในระบบถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1 และ 2 vvm และอัตราการกวนของใบพัด 300 และ 500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง……..... 41

4.5 การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ในระบบถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1 และ 2 vvm และอัตราการกวนของใบพัด 300 และ 500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง…… 43


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**ภาพที่** **หน้า**


4.6 การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ในระบบถังหมัก ที่มีอัตราการให้อากาศ 1 และ 2 vvm และอัตราการกวนของใบพัด 300 และ 500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง……..……..…….. 45

4.7 ผลของการให้อากาศและการกวนต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร……..……..…… 46

4.8 ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอ-ไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ในระบบถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1 และ 2 vvm และอัตราการกวนของใบพัด 300 และ 500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง….. 49

ค.1 กราฟมาตรฐานกลูโคสโดยวิธี DNS method……..……..... 69

ค.2 กราฟมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิก……..……..…….. 71


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดพอลิแกมมากลูตามิก หรือแกมมา-พีจีเอ (Poly-γ-glutamic acid, γ-PGA) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพสามารถบริโภคได้ ละลายน้ำ และย่อยสลายได้ ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม สร้างขึ้นจากหน่วยย่อยของกรดกลูตามิกชนิด D- และ L- หรือทั้งสองชนิด และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแกมมาเอไมด์ เป็นสารที่ถูกขับออกมานอกเซลล์โดยเชื้อจุลินทรีย์ตระกูล *Bacillus* spp. คุณสมบัติของกรดพอลิแกมมากลูตามิกนี้เป็นที่ต้องการ เพราะสามารถนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย เป็นสารที่ย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ และสามารถรับประทานได้โดยไม่ก่อสารพิษต่อร่างกาย การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมในปัจจุบันมีต้นทุนในการผลิตที่สูง ดังนั้นนักวิจัยจึงให้ความสนใจกับกระบวนการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกเพื่อให้สามารถผลิตสารขึ้นมาได้มากที่สุดและมีต้นทุนการผลิตลดลง โดยการปรับปรุงกระบวนการผลิตได้จากการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ และอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อมาทดแทนอาหารสังเคราะห์ เพื่อลดต้นทุนการผลิต และหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02 ที่สามารถผลิตกรดพอลิแกมมา-กลูตามิกได้สูงสุด

แป้งมันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจผลิตได้จากหัวของมันสำปะหลัง หาง่าย ราคาถูก ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญนอกจากน้ำก็คือ คาร์โบไฮเดรต ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้เชื้อ *Bacillus* spp. ยังเป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งสามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลแล้วจึงนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้ในการเจริญและผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจึงเป็นข้อดีอีกอย่างคือไม่จำเป็นต้องทำการย่อยแป้งก่อนนำมาเป็นสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของกรดอะมิโนชนิดแอลกลูตามิกต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02

1.2.2 เพื่อศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02

1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 โดยกระบวนการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 7 ลิตร ที่มีปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาความต้องการกรดกลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมและไม่เติมกรดอะมิโนชนิดแอลกลูตามิก จากนั้นเมื่อทราบความต้องการกรดอะมิโนชนิดแอลกลูตามิกของเชื้อแล้วจึงทำการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมัน-สำปะหลังที่ 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร และระยะเวลาในการหมักเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ที่สามารถผลิตกรดกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงสุดโดยใช้เวลาในการศึกษากระบวนการหมักนาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดพอลิ-แกมมากลูตามิก โดยใช้เทคนิควิเคราะห์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) หลังทราบความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ที่ทำให้ผลได้กรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงสุด และระยะเวลาในการหมักแล้ว ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ ศึกษาปริมาณเซลล์ อัตราการใช้อากาศ อัตราการใช้ออกซิเจนจำเพาะ สัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวลออกซิเจน และอัตราการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ในการเลี้ยงเชื้อด้วยกระบวนการแบบกะในถังหมักขนาด 7 ลิตร ที่มีปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร โดยศึกษาอัตราการกวนที่ 300 และ 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1 และ 2 vvm

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* SRU02 จากแป้งมันสำปะหลังที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกให้ได้ผลผลิตมากที่สุด

1.4.2 ได้สภาวะที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02 ในแป้งมันสำปะหลังในระดับถังหมักโดยกระบวนการแบบกะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและงานวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 กรดพอลิแกมมากลูตามิก (Poly-γ-glutamic acid)

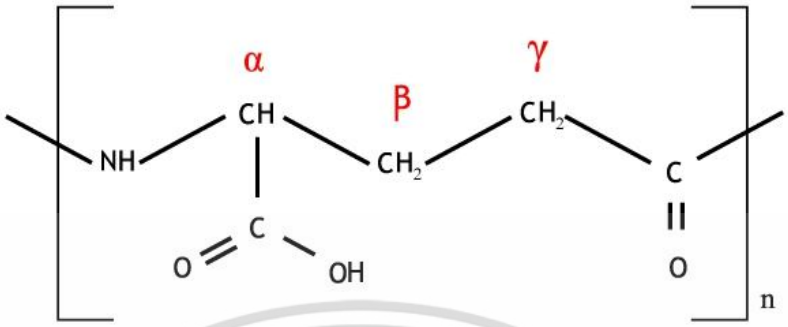
กรดพอลิแกมมากลูตามิกหรือแกมมา-พีจีเอ (Poly-γ-glutamic acid, γ-PGA) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (Biopolymer) ที่มีประจุลบ ถูกขับออกมานอกเซลล์โดยเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus subtillis Bacillus licheniformis Bacillus megaterium Staphylococcus epidermidis* เป็นต้น กรดพอลิ-แกมมากลูตามิกเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพสามารถบริโภคได้ ละลายน้ำ ย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradable) มีคุณสมบัติไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย และทางการแพทย์ (Moraes และคณะ, 2012)

Ivánovics และ Bruckner (1937) ได้ค้นพบกรดพอลิแกมมากลูตามิกครั้งแรกเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่ในแคปซูลของ *B. anthracis* มีลักษณะเหนียวหนืด และถูกปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารเหมือก เรียกกันว่า นัตโตะ (Natto) คือ ถั่วเหลืองหมัก ซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นบ้านในญี่ปุ่น เป็นสารผสมระหว่างกรดพอลิแกมมากลูตามิก และฟรุกแทน นอกจากนี้ Shih และVan (2001) รายงานว่า *Bacillus* หลายสายพันธุ์สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้โดยการปล่อยออกมานอกเซลล์ ได้แก่ *B. licheniformis* A35 *B. subtilis* (natto) *B. licheniformis* ATCC 9945 และ *B. subtilis* IFO3335 เป็นต้น

กรดพอลิแกมมากลูตามิกสร้างขึ้นจากหน่วยย่อยของกรดกลูตามิกชนิด D หรือ L หรือทั้งสองชนิดเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแกมมาเอไมด์ (γ-amide) ที่เป็นโฮโมพอลิเอไมด์ ระหว่างกรดแอลฟาอะมิโน (α-amino) และกรดแกมมาคาร์บอกซิลิก (γ-carboxylic) (Moraes และคณะ, 2012) ซึ่งแตกต่างจากโปรตีนทั่วไปตรงที่โปรตีนจะเกิดการเชื่อมต่อกันของแอลฟาอะมิโน (α-amino) ดังนั้นจึงทำให้กรดพอลิแกมมากลูตามิกจึงทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (Protease) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยได้เฉพาะพันธะแอลฟาอะมิโนเท่านั้น (สุขใจ, 2557) โครงสร้างของกรดพอลิแกมมา-กลูตามิก แสดงดังภาพที่ 2.1 กรดพอลิแกมมากลูตามิกแบ่งเป็น 3 แบบได้แก่ 1) สายพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยกรดกลูตามิกชนิด D อย่างเดียว (D-PGA) 2) สายพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยกรดกลูตา-มิกชนิด L อย่างเดียว (L-PGA) และ 3) สายพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยกรดกลูตามิกชนิด D และชนิด L (D-L-PGA) ซึ่งแต่ละแบบจะถูกผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ต่างกัน เช่น เชื้อ *B. anthracis* ผลิตชนิด D-PGA เป็นเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ชนิด L-PGA จะถูกผลิตโดยเชื้อที่เป็น Extreme halophilic bacteria ได้แก่ *Natrialba aegyptiaca* และ Halobacterium ได้แก่ *B. megaterium B. halodurans* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Natronococcus occultus* และชนิด D-L-PGA ผลิตได้จาก *B. subtilis* และ *B. licheniformis* และบางสายพันธุ์ของ *Staphylococcus epidermidis* (Najar และ Das, 2015)




**ภาพที่ 2.1** โครงสร้างทางเคมีของกรดพอลิแกมมากลูตามิก (Poly-γ-glutamic acid)

กรดพอลิแกมมากลูตามิกเป็นสารประเภทเมทาบอไลท์ขั้นทุติยภูมิ (Secondary meyabolite) สามารถสังเคราะห์ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* spp. โดยกระบวนการหมัก บางสายพันธุ์ไม่ได้สังเคราะห์แค่เพียงภายในเซลล์เท่านั้น แต่สามารถสังเคราะห์และปล่อยออกมาสู่นอกเซลล์ได้ด้วย ปริมาณการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกจากเชื้อ *Bacillus* spp. ขึ้นกับสภาวะในการเลี้ยงด้วย (Kongklom และคณะ, 2012) กรดพอลิแกมมากลูตามิกจะถูกผลิตที่ชั้นเปปติโดไกลแคนบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญหรืออยู่ในช่วงระยะคงที่ของการเจริญ (Stationary phase) และจะขับกรดพอลิแกมมากลูตามิกออกมาภายนอกเพื่อนำไปสร้างแคปซูลเพื่อช่วยรักษาสภาพของเซลล์ซึ่งจะทำหน้าที่เหมือนกับแอนติ้บอดี้ (Antibody) ช่วยรักษาเซลล์ป้องกันการติดไวรัส และบางครั้งเชื้อยังสามารถใช้กรดพอลิแกมมากลูตามิกเพื่อเป็นแหล่งกลูตาเมตในระยะคงที่ในสภาวะขาดแคลนอาหารได้ (Ogunleye และคณะ, 2015)

Liu และคณะ (2010) ศึกษาลักษณะเมือกที่เกิดจากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* C06 โดยใช้วิธีการกลายพันธุ์ พบว่าเมือกที่ถูกวิเคราะห์ประกอบด้วยกรดกลูตามิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และไม่ได้เชื่อมกันด้วยแอลฟาอะมิโนจึงระบุได้ว่าเป็นกรดพอลิแกมมากลูตามิก และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ถูกกลายพันธุ์พบว่ามีประสิทธิภาพในการสร้างฟิล์มชีวภาพ ความสามารถในการยึดติด และจับกลุ่มน้อยลง แสดงให้เห็นว่าเชื้อใช้กรดพอลิแกมมากลูตามิกเพื่อปรับปรุงความสามารถการสร้างฟิล์มชีวภาพ และการยึดติดกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ อย่างไรก็ตามฟิล์มชีวภาพเป็นโครงสร้างที่มีจุลินทรีย์ฝังตัวอยู่ภายใน กรดพอลิแกมมากลูตามิกมีความสำคัญในการสร้างฟิล์มชีวภาพในสายพันธุ์ *B. subtilis* และจะไม่สร้างฟิล์มชีวภาพหรือจะสร้างได้น้อยลงหากไม่มีการสร้างกรดพอลิ-แกมมากลูตามิก (Morikawa และคณะ, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Bacillus* spp. ส่วนมากผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยการปล่อยออกมานอกเซลล์ จะได้เส้นใยของกรดพอลิแกมมากลูตามิกชนิด L และชนิด D ซึ่งทั้งสองชนิดผสมกันจะเกิดการตกตะกอนในเอทานอล การจะทำให้กรดพอลิแกมมากลูตามิก บริสุทธิ์โดยมี 3 ขั้นตอนคือ ขั้นที่ 1 แยกเซลล์หรือสารอาหารที่อยู่ในรูปของแข็งออกจากของเหลวโดยการปั่นเหวี่ยง ขั้นที่ 2 การตกตะกอนกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยเอทานอลเย็น และขั้นที่ 3 วิธีไดอะไลซิส (Dialysis) ของสารปนเปื้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าที่กำหนด กรดพอลิแกมมากลูตามิกที่บริสุทธิ์สามารถถูกตรวจสอบด้วยวิธีการวิเคราะห์กรดอะมิโน และการวิเคราะห์ด้วย โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางหรือโครมาโทกราฟีแบบเหลวสมรรถนะสูง (สุขใจ, 2557)

Kongklom และคณะ (2012) ตรวจวัดขนาดโมเลกุลของกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ถูกผลิตโดยเชื้อ *B. licheniformis* ATCC 9945 โดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งขนาดของแถบจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกที่แตกต่างกันในช่วง 0-75 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่มีการเติมกรดกลูตามิกจะมีความเข้มข้นของกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ต่ำมากจนไม่สามารถแสดงแถบที่มองเห็นด้วยวิธี SDS-PAGE ส่วนที่สภาวะที่มีการเติมกรดกลูตามิก 15-75 กรัมต่อลิตร จะมีขนาดโมเลกุลมากกว่า 98 กิโลดาลตัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าหากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมกรดกลูตามิกจะไม่ปรากฏขนาดโมเลกุลของกรดพอลิแกมมากลูตามิก และในทางตรงกันข้ามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดกลูตามิกก็มีขนาดโมเลกุลไม่ต่างกันนักเพียงแต่ที่ความเข้มข้น 60-75 กรัมต่อลิตร จะมีแถบที่ยาวกว่าสภาวะอื่น

กรดพอลิแกมมากลูตามิกที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันจะถูกนำไปใช้งานต่างกัน Mitsuiki และคณะ (1998) ได้ศึกษาว่ากรดพอลิแกมมากลูตามิกที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 20 กิโลดาลตัน สามารถเป็นสารป้องกันการเยือกแข็งได้สูงกว่าสารป้องกันการเยือกแข็งทั่วไปที่ใช้ เช่น กลูโคส และจะไม่ส่งผลต่อรสชาติของอาหาร ส่วน Bhat และคณะ (2013) ทำการศึกษาว่ากรดพอลิแกมมากลูตามิกที่มีมวลโมเลกุล 257 กิโลดาลตัน ได้ถูกใช้เป็นสารป้องกันผลึกสำหรับการปรับปรุงการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกในระหว่างการผลิต

## 2.2 การนำไปประยุกต์ใช้

กรดพอลิแกมมากลูตามิกเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพสารสำคัญที่สามารถย่อยสลายได้ตามสภาพธรรมชาติ กรดพอลิแกมมากลูตามิกมีคุณสมบัติสามารถละลายน้ำได้ รับประทานได้ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย และไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษแก่สิ่งแวดล้อม จึงทำให้นักวิจัยหันมาให้ความสนใจที่จะศึกษา และนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้หลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ด้านการแพทย์ หรือด้านสิ่งแวดล้อม เป็นต้น

ในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำกรดพอลิแกมมากลูตามิกไปใช้ในหลายด้าน เช่น สารเพิ่มความเหนียว (Thickener) สารรักษาความชื้น (Humectant) สารป้องกันการเยือกแข็ง (Cryoprotectant) สารลดความขม (Bitterness-relieving agent) สารคงตัว (Stabilizer) สารลดการดูดซับน้ำมัน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการผลิตอาหารแช่แข็ง การหลอมละลายอาหารกลับไปมาหลายครั้งส่งผลทำให้สารอาหารมีประสิทธิภาพเสื่อมลง สามารถป้องกันการเสื่อมสภาพของอาหารแช่แข็งได้โดยการเติมสารป้องกันการเยือกแข็ง (Cryoprotectant) ซึ่งมีใช้กันอย่างแพร่หลาย มีการตรวจสอบโดยใช้ Differential scanning calorimetry (DSC) แสดงความหลากหลายของโอลิโกแซคคาไรด์และกรดพอลิแกมมา-กลูตามิกจากเชื้อ *B. licheniformis* ที่ใช้เป็นสารป้องกันการเยือกแข็ง (Mitsuiki และคณะ, 1998) ซึ่งกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลช่วงที่ต่ำกว่า 20 กิโลดาลตัน จะสามารถเป็นสารป้องกันการเยือกแข็งได้ดีกว่ากลูโคสซึ่งเป็นที่นิยมใช้เป็นสารป้องกันเยือกแข็ง กิจกรรมของสารป้องกันการเยือกแข็งจะมีผลขึ้นอยู่กับไอโซเมอร์ (อัตราส่วนของชนิด D ต่อชนิด L) ชนิดของพันธะเพปไทด์ (แอลฟา, $\alpha$ หรือแกมมา, $\gamma$) หรือขึ้นอยู่กับอิทธิพลของประจุบวกที่ใช้ เช่น เกลือโซเดียม (Na) = เกลือโพแทสเซียม (K) >> เกลือแคลเซียม (Ca) กรดพอลิแกมมากลูตามิกเป็นสารป้องกันการเยือกแข็งที่มีประสิทธิภาพมากและมีรสชาติที่อ่อนกว่าสารป้องกันการเยือกแข็งที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า เช่น แซคคาไรด์ เกลืออนินทรีย์ และกรดอะมิโน จึงทำให้สามารถใส่กรดพอลิ-แกมมากลูตามิกในอาหารได้ปริมาณมากกว่าโดยไม่ทำให้อาหารเสียรสชาติ (Tanimoto และคณะ, 1995) กรดพอลิแกมมากลูตามิกยังสามารถนำไปใช้เป็นสารลดความขม (Bitterness-relieving agent) (Sakai และคณะ, 2000) เกิดจากกรดอะมิโน เพปไทด์ ควินิน (Quinine) คาเฟอีน (Caffeine) หรือแร่ธาตุ จึงมักใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเบเกอรี่ อุตสาหกรรมอาหารจากแป้ง เส้นก๋วยเตี๋ยว เป็นต้น มีผลทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น ปรับปรุงเนื้อสัมผัสของอาหาร และยังใช้กรดพอลิ-แกมมากลูตามิกในไอศกรีมเพื่อเพิ่มความคงตัว (Daninippon, 1972) และช่วยเพิ่มความข้นหนืดของน้ำผลไม้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม (Yamanaka, 1991) ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เมื่อเติมกรด-พอลิแกมมากลูตามิกในส่วนผสมของอาหารสัตว์ เช่น อาหารสัตว์ปีก อาหารปลา หรืออาหารสัตว์เลี้ยง จะช่วยเสริมการดูดซึมของแร่ธาตุ เพิ่มความแข็งแรงของเปลือกไข่ และลดการสะสมไขมันในร่างกายสัตว์ (Tanimoto และคณะ, 2000)

Lim และคณะ (2012) ศึกษาผลการเติมกรดพอลิแกมมากลูตามิกลงในโดนัทต่อการดูดซับน้ำมันในระหว่างการทอด พบว่าเมื่อใช้เวลาทอดนาน 4 นาที จะทำให้โดนัทปกติมีการดูดซับน้ำมัน 0.7 กรัมต่อกรัมของแป้งโดนัท ในขณะที่เติมกรดพอลิแกมมากลูตามิกลงในสูตรของโดนัทจะทำให้มีการดูดซับน้ำมันเป็น 0.2 กรัมต่อกรัมของแป้งโดนัท และจะมีการลดการดูดซับน้ำมันเพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า เมื่อเติมกรดพอลิแกมมากลูตามิกเพิ่มจาก 0.25 เป็น 1 กรัมต่อ 100 กรัมของแป้งโดนัท จากผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) โดนัทที่มีการเติมกรดพอลิแกมมากลูตามิกจะมีช่องว่างระหว่างเนื้อแป้งน้อย และมีความหนาแน่นขึ้น เมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัสยอมรับโดยรวมของผู้บริโภคกับโดนัทที่มีการเติมกรดพอลิ-แกมมากลูตามิก 1 กรัมต่อ 100 กรัมแป้งโดนัท ดังนั้นกรดพอลิแกมมากลูตามิกสามารถใช้เป็นสารลดการดูดซับปริมาณน้ำมันได้เพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพของผลิตภัณฑ์ของทอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shyu และ Sung (2010) ได้ศึกษาความหนืด ความคงตัวของฟอง และอิมัลชั่นในแป้งเค้กที่เติมกรดพอลิแกมมากลูตามิกปริมาณ 0.05 0.1 และ 0.5 กรัมต่อกิโลกรัม พบว่ากรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อกิโลกรัม จะให้ความหนืด ความคงตัวของฟอง และอิมัลชั่นในแป้งเค้กเพิ่มขึ้น และผลระหว่างการเก็บรักษาแป้งเค้กที่เติมกรดพอลิแกมมากลูตามิกทำให้มีความแข็งและความต้านทานการเคี้ยวลดลง และเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าที่มีการเติมกรดพอลิแกมมากลูตามิกความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมจะทำให้แป้งเค้กมีรูที่แป้งเล็กลง และมีความเรียบเนียนมากกว่าแป้งเค้กที่ไม่เติมกรดพอลิแกมมากลูตามิก

Bhat และคณะ (2013) ศึกษาผลของกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยเชื้อ *B. subtilis* natto ATCC 15245 ที่มีต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็งของเชื้อ *Lactobacillus paracasei* NCIMB 8835 โดยเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของกรดพอลิแกมมา-กลูตามิก 5 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์พบว่ากรดพอลิ-แกมมากลูตามิก 10 เปอร์เซ็นต์จะช่วยให้เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. paracasei* รอดชีวิตดีกว่าใช้น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์

ด้านการแพทย์กรดพอลิแกมมากลูตามิกถูกใช้เป็นตัวขนส่งยา ยา Paclitaxel (Taxol, TXL) ใช้เป็นเคมีบำบัดที่ใช้รักษาเนื้องอกหรือเนื้อร้ายต่าง ๆ ในมนุษย์ (Rowinsky และ Donehower, 1995; Holmes และคณะ, 1995) ติดปัญหาคือ ยาไม่สามารถละลายน้ำได้จึงได้นำ Paclitaxel มารวมกับกรดพอลิแกมมากลูตามิกด้วยพันธะโควาเลนซ์ได้เป็น Polyglutamic acid paclitaxel (PG-TXL) อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ รู้จักกันทั่วไปคือยารักษาโรคมะเร็ง (Cancer drug) ยา PG-TXL สามารถต่อต้านเนื้องอกในหนูและในคนได้ดีกว่า TXL ซึ่ง PG-TXL ทำให้เนื้องอกขนาดใหญ่มีขนาดที่เล็กลงอย่างสมบูรณ์ได้ แต่ผลข้างเคียงคือจะมีไข้ (Li และคณะ, 1998)

การใช้ประโยชน์ด้านเครื่องสำอาง Shih และ Van (2001) การใช้ประโยชน์ของกรดพอลิ-แกมมากลูตามิกจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยการฉายรังสีแกมมาเพื่อให้เกิดเป็นการเชื่อมไขว้ (Cross-Linking) ระหว่างหน่วยมอนอเมอร์ เพื่อสร้างเป็นกรดพอลิแกมมากลูตามิกไฮโดรเจล ($\gamma$-PGA hydrogel) จากนั้นทำให้เจลอยู่ในรูปแบบแห้งเยือกแข็ง (Lyophilize) เพื่อคงความเสถียรทางเคมีและกายภาพของกรดพอลิแกมมากลูตามิก เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นโครงสร้างที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซับความชุ่มชื้น (Kunioka, 1993; Choi และ Kunioka, 1995; Choi และคณะ, 1995) ซึ่งสมบัติของกรดพอลิแกมมากลูตามิกมีความสามารถในการสร้างแผ่นฟิล์มที่เรียบ มีความยืดหยุ่น และกักเก็บความชุ่มชื้นได้ถึง 5,000 เท่าโดยน้ำหนัก มีผลในเรื่องของการรับรู้ความรู้สึกจากประสาทสัมผัสที่อ่อนนุ่ม และยังช่วยปกป้องชั้นของผิวภายนอก จึงนำไปประยุกต์ทำแผ่นมาร์กหน้า (Facial mask) เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวไม่ทำให้ผิวแห้งตึงและลดริ้วรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้า

ในอุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสียสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเป็นสารตกตะกอนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการบำบัดน้ำเสีย อุตสาหกรรมน้ำดื่ม ประปา โดยพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตกตะกอนชีวภาพเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตกตะกอน Bhattacharya และคณะ (1998) ได้ค้นพบนวัตกรรมใหม่ในการดูดซับโลหะหนักด้วยแผ่นกรองไมโครที่ราคาไม่แพง ประกอบด้วยกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่เชื่อมด้วยพันธะโควาเลนซ์ เช่น แผ่นกรองเซลลูโลสที่มีกรดพอลิแกมมากลูตามิกสามารถดูดซับตะกั่วได้ประมาณ 2.5 โมล และการดูดซับแคดเมียม และนิกเกิลได้ 0.8 โมล เช่นเดียวกับแผ่นกรองที่ทำจากซิลิกาที่มีกรดพอลิแกมมากลูตามิกมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแผ่นกรองเซลลูโลสแต่มีความคงตัวต่อกรดและตัวทำละลายดีขึ้นกว่า ได้ทำการทดสอบแผ่นกรองเซลลูโลสของกรดพอลิแกมมากลูตามิกกับเศษวัสดุเหลือใช้ที่มีสารตะกั่ว พบว่าเมื่อนำมาผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสสามารถลดปริมาณสารตะกั่วได้อย่างน้อย 380 เท่า แสดงให้เห็นว่ากลไกดูดซับของกรดพอลิแกมมากลูตามิกมีประสิทธิภาพสูงกว่าเรซินแลกเปลี่ยนไอออนทั่วไป กรดพอลิแกมมากลูตามิกมีประสิทธิภาพในการกำจัดไอออนตะกั่วมากกว่า 99.8 เปอร์เซ็นต์ด้วยเทคนิคการกรองด้วยความดันต่ำ (Hajdu และคณะ, 2012)

นอกจากนี้ยังมีการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อดัดแปลงโครงสร้างของกรดพอลิแกมมากลูตามิกทำให้กรดพอลิแกมมากลูตามิกมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น การใช้ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification) ตรงบริเวณหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group) ของกรดพอลิแกมมากลูตามิกทำให้เอสเทอร์ของกรดพอลิแกมมากลูตามิกสามารถแสดงคุณสมบัติเป็นพลาสติกทนร้อน (Thermoplastics) หรือ Poly-$\gamma$-glutamic acid $\alpha$-benzyl ester แสดงคุณสมบัติเป็นเส้นใยและแผ่นฟิล์ม (Choi และ Kunioka, 1995)

Ashiuchi และคณะ (2013) ได้พัฒนายาต้านจุลชีพจากเทอร์โมพลาสติกที่ทำจากกรดพอลิแกมมาแอลกลูตามิก โดยทำแผ่นฟิล์มจากกรดพอลิแกมมาแอลกลูตามิก(L-PGA) ผสมกับ Hexadecylpyridinium cation (HDP+) เป็น PGAIC โดยศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แล้ววางแผ่นฟิล์ม PGAIC รูปทรงต่าง ๆ เช่น สี่เหลี่ยม วงกลม สี่เหลี่ยมคางหมู ดูการเปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มกรดพอลิแกมมากลูตามิกปกติ พบว่าแผ่นฟิล์ม PGAIC สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองได้ดีกว่าแผ่นฟิล์มกรดพอลิแกมมากลูตามิกทั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสังเกตจากบริเวณใสที่มีวงใสรอบแผ่นฟิล์ม และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสังเกตจากการวัดความขุ่น และจะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้มากขึ้นหากแผ่นฟิล์มมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ HDP+ ที่เปลี่ยนแปลงกรดพอลิแกมมากลูตามิกให้มีคุณสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติกหรือวัสดุที่ทนความร้อน

## 2.3 ชนิดแบคทีเรียที่สังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก

ปัจจุบันพบสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ 3 ชนิด คือ 1) อาร์เคีย (Achaea) 2) แบคทีเรีย (Bacteria) และ 3) ยูคาริโอต (Eukaryotes) โดยอาร์เคียที่สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ คือเชื้อ *Natronococcus occultus* และเชื้อ *Natrialba aegyptiaca* ซึ่งจะใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดพอลิแกมมากลูตามิกลดความเข้มข้นของเกลือเพื่ออยู่รอดให้สภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ ส่วนพวกยูคาริโอตมีกลุ่มเดียวเท่านั้นที่สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ คือ ไฟลัม *Cnidaria* และกลุ่มของแบคทีเรียเป็นที่น่าสนใจทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะสกุล *Bacillus*

แบคทีเรียที่สังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก (Poly-γ-glutamic acid) สามารถจำแนกตามองค์ประกอบของสารอาหารในการเพาะเลี้ยงเชื้อได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Shih และ Van (2001)

1. กลุ่มที่ต้องเติมกรดแอลกลูตามิกในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (L-glutamic acid dependent bacteria) เพื่อกระตุ้นการสร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิกและการเจริญเติบโตของเซลล์ วิถีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มของการเติม L-glutamic acid เช่น วิถีการสร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิกของแบคทีเรีย *B. anthracis B. licheniformis* ATCC9945A *B. subtilis* IFO 3335 *B. subtilis* F-2-01 และ *B. Subtilis* NX-2 เป็นต้น แต่แบคทีเรียกลุ่มนี้ก็ยังสามารถสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมกรดแอลกลูตามิก

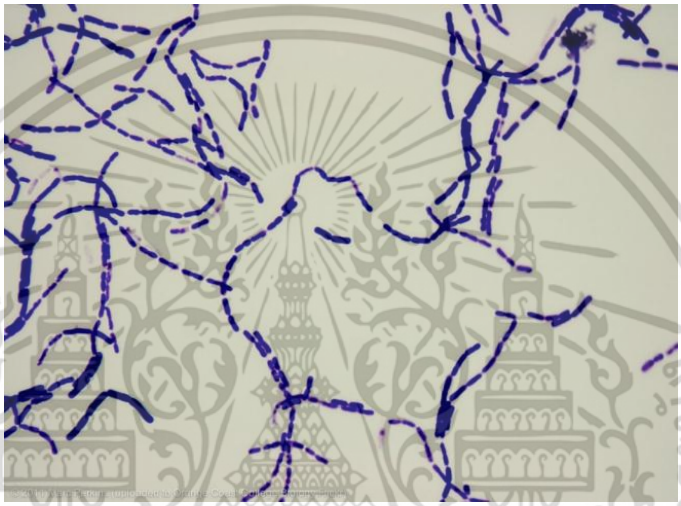
2. กลุ่มที่ไม่ต้องเติมกรดแอลกลูตามิกในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (L-glutamic acid- independent bacteria) แบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtilis* TAM-4 และ *B. licheniformis* A35 เป็นต้น โดยเชื้อ *B. licheniformis* A35 สามารถสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูมิกได้จากกลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์ภายใต้สภาวะเปลี่ยนสารประกอบไนเทรตให้เป็นไนไทรต์ แอมโมเนีย และไนโตรเจน นอกจากเชื้อต้องการแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนแล้วยังปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น ความแรงไอออน การให้อากาศ พีเอชของอาหารทั้งหมดมีผลต่อการสังเคราะห์ และคุณภาพของกรดพอลิ-แกมมากลูตามิก (สุขใจ, 2557)

## 2.4 *Bacillus megaterium*

จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการศึกษาของงานวิจัยนี้คือ *Bacillus megaterium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกสร้างสปอร์ และมีรูปร่างเป็นแท่ง แสดงดังภาพที่ 2.2 ไม่ก่อให้เกิดโรค ต้องการอากาศในการเจริญแต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบได้บริเวณพื้นดิน อากาศทั่วไป และยังสามารถพบได้ในน้ำผึ้งซึ่งแบคทีเรียปกติทั่วไปจะไม่พบ (De Vos และคณะ, 2009) สามารถเจริญได้จากแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย เช่น ของเสียจากอุตสาหกรรม กากน้ำตาล ซังข้าวโพด ธัญพืช เป็นต้น ที่มาของชื่อ megaterium เพราะมีขนาดใหญ่ถึง 4 ไมโครเมตรและเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ไมโครเมตร เซลล์จะอยู่เป็นคู่หรือโซ่ (ภาพที่ 2.3) (Bunk และคณะ, 2010) ซึ่งจะถูกรวมกันโดยพอลิแซคคาไรด์บนผนังเซลล์ที่เชื้อสร้าง (De Vos และคณะ, 2009) ผนังเซลล์ของ *B. megaterium* สามารถสังเคราะห์สารพวกพอลิแซคคาไรด์สะสมอยู่มาก จะถูกนำไปใช้สร้างเป็นแคปซูลจึงทำให้ *B. megaterium* สามารถมีชีวิตอยู่รอดกับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมแก่การเจริญได้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภาพที่ 2.4 โคโลนีมีลักษณะกลม มันวาว แผ่ขยายออกด้านข้าง สายพันธุ์นี้เป็นต้นแบบ

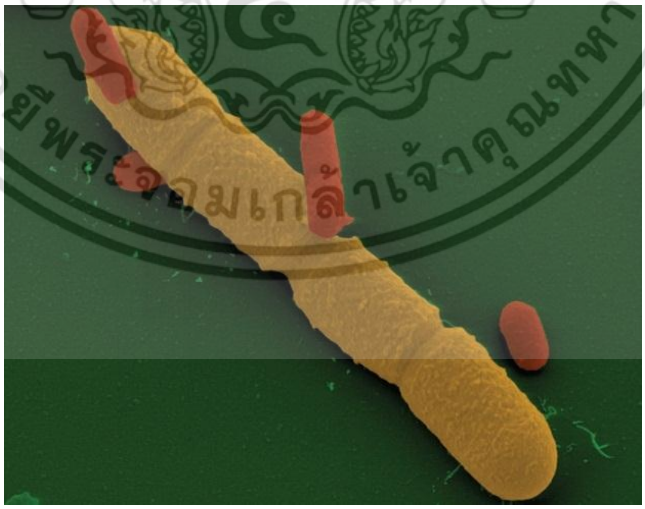
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การโคลนนิ่งที่ดีเนื่องจากสามารถสร้างพาหะพลาสมิดจำนวนมากได้ นักวิทยาศาสตร์ใช้ *B. megaterium* ในการพัฒนาโปรตีนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ (Vary, 1994; Vary และคณะ, 2007; Schulz และคณะ, 2014) *B. megaterium* ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย กรดกลูตามิกชนิด D ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และชนิด L ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ (Sung และคณะ, 2005) ในขณะเดียวกัน Ashiuchi และ Misono (2002) รายงานว่า *B. megaterium* สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตัน และประกอบด้วยหน่วยย่อยกรดกลูตามิกชนิด D และชนิด L อย่างละ 50 เปอร์เซ็นต์



**ภาพที่ 2.2** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของ *Bacillus megaterium* ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

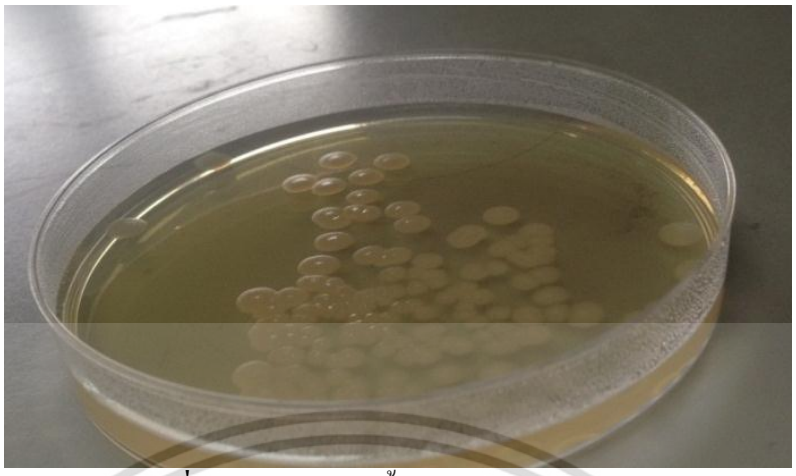
ที่มา: https://www.flickr.com/photos/occbio/6414376363



**ภาพที่ 2.3** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ *Bacillus megaterium* (สีเหลือง) ที่กำลังขยาย 15,000 เท่า

ที่มา : Bunk และคณะ (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพที่ 2.4** โคโลนีของเชื้อ *B. megaterium* SRU02

## 2.5 วิถีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก

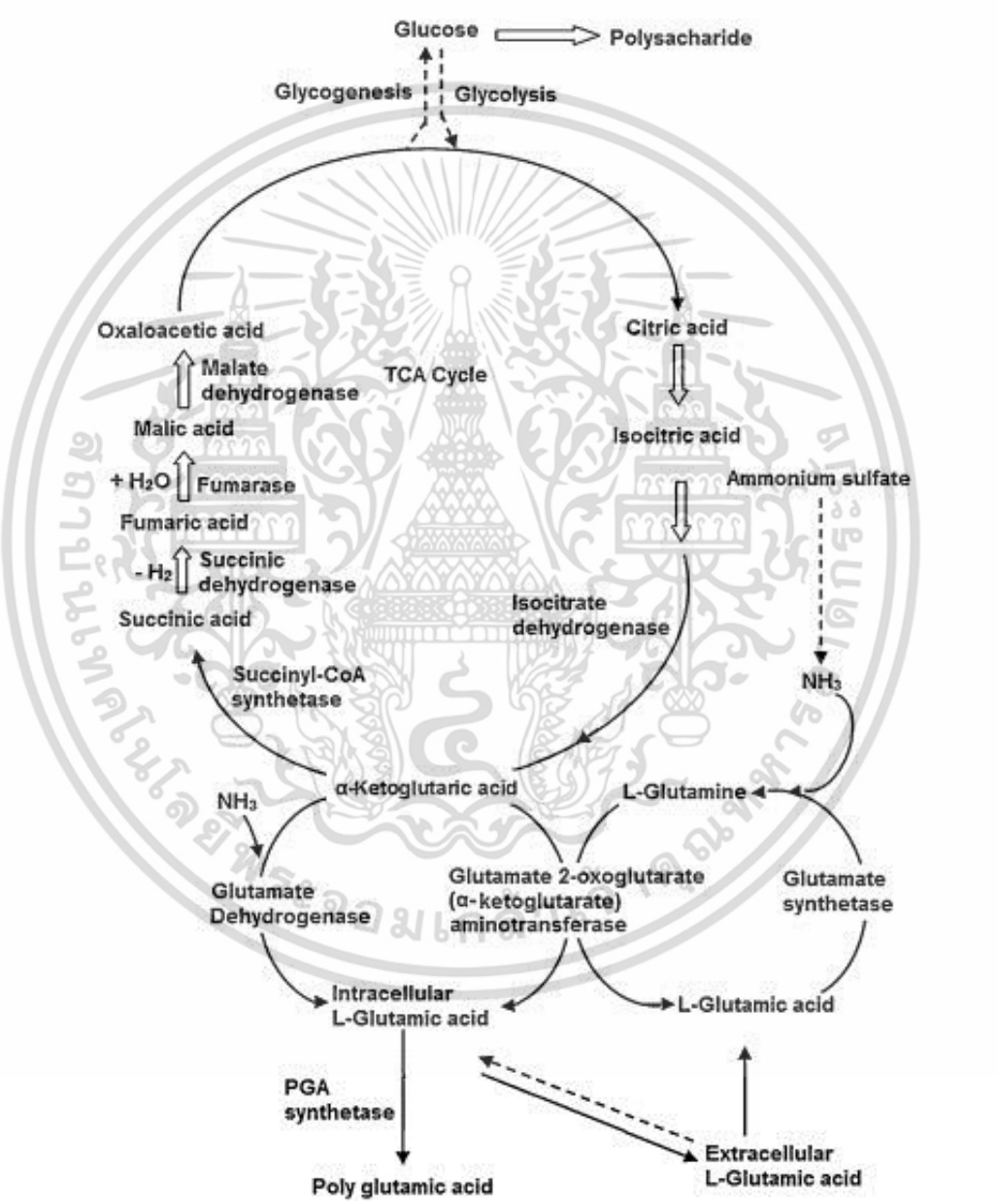
วิถีเมทาบอลิซึมของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก คือ วิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) และวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle, TCA) หรือวัฏจักรเครป (Kreb's cycle) โดยเชื้อจุลินทรีย์จะใช้อาหารเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วสลายเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นคาร์บอน 6 อะตอม (C6) ให้เป็นกรดไพรูวิก (Pyruvic acid) 2 โมเลกุล จากนั้นกรดไพรูวิกจะสลายตัวเป็นอะซิทิลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เข้าทำปฏิกิริยากับกรดออกซาลิก (Oxalic acid) ในวัฏจักรเครป เปลี่ยนเป็นสารตัวกลางที่สำคัญคือ กรดซิตริก (Citric acid)

จากภาพที่ 2.5 แสดงถึงวิถีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกของแบคทีเรีย โดยสามารถแบ่งวิถีการสร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิกหลักออกเป็น 4 ส่วนคือ

ส่วนที่ 1 ใช้กรดซิตริก (citric acid) เป็นซับสเตรตเพื่อสังเคราะห์แอลฟาคีโตกลูตาเรท (α-ketoglutarate, α-KG) ในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) จากนั้น α-KG จะเข้าสู่ส่วนที่ 2 เป็นการสร้างกรดแอลกลูตามิก (L-glutamic acid, L-Glu) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (Glutamate dehydrogenase, GD) ร่วมกับการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และมีการสร้าง L-Glu จาก L-glutamine (L-Gln) ร่วมด้วยโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutamate 2-oxoglutarate (α-ketoglutarate) aminotransferase (GOGAT) เอนไซม์ Glutamine synthetase (GS) และการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่ง L-Glu ที่สร้างได้ทั้งหมดนี้ส่วนหนึ่งจะเข้าสู่ส่วนที่ 4 โดยตรง และส่วนหนึ่งจะเข้า ส่วนที่ 3 เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นกรดดีกลูตามิก (D-glutamic acid, D-Glu) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutamic acid racemase (Glr) ก่อนเข้าสู่ส่วนที่ 4 เพื่อสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ polyglutamic acid

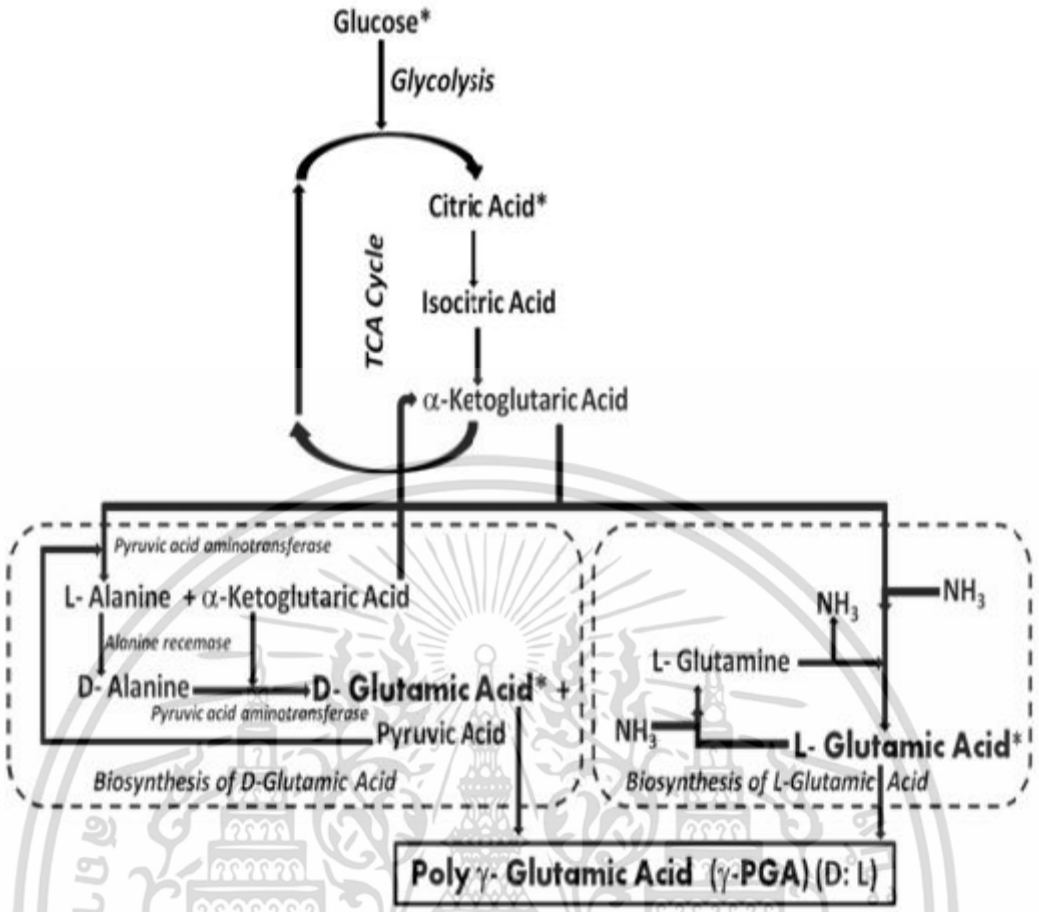
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

synthetase (PgsBCA) ร่วมกับใช้พลังงาน ATP และปลดปล่อยกรดพอลิแกมมากลูตามิกออกสู่ภายนอกเซลล์ต่อไป (ณัฐวุฒิ และคณะ, 2556) และในภาพที่ 2.6 เป็นการแสดงวิถีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกในแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการกรดกลูตามิกในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อก็สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้จากการสังเคราะห์กรดแอลกลูตามิกผ่านวิถี de novo ซึ่งเป็นการสังเคราะห์โมเลกุลที่ซับซ้อนจากโมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดอะมิโน เป็นต้น (Xu และคณะ, 2005)




**ภาพที่ 2.5** การสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิกของแบคทีเรียชนิดที่ต้องการกรดกลูตามิก
ที่มา: Kumar และคณะ (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 2.6** การสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิกของแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการกรดกลูตามิก

ที่มา: Najar และ Das (2015)

## 2.6 แหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อที่ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

แหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกมีความสำคัญอย่างมากในการใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่สังเคราะห์ขึ้นให้เชื้อจุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกออกมาในปริมาณมากเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง เพราะฉะนั้นในการศึกษางานวิจัยครั้งนี้จึงจะใช้แหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติเพื่อมาทดแทนเป็นสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้มีต้นทุนที่ถูกลง แหล่งคาร์บอนที่หาได้จากธรรมชาติ เช่น มันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง ซังข้าวโพด ของเสียจากอุตสาหกรรมผงชูรส หรือกากน้ำตาล เป็นต้น (Zhu และคณะ, 2013)

Moraes และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยดัดแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากน้ำตาลมาใช้ ด้วยการเติมกรดซิตริก และแอมโมเนียมซัลเฟต ในกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อ *B. velezensis* NRRL-23189 เพื่อใช้ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก และตรวจกากน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ซึ่งจะใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยหน่วยย่อยของกากน้ำตาลจะประกอบด้วย กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาล กรดซิตริก และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม ภายใต้สภาวะการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ 27 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง พีเอช 6.5 โดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดพอลิ-แกมมากลูตามิก และการใช้ของน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยกากน้ำตาล 200 กรัมต่อลิตร กรดซิตริก 12.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 8 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกมากที่สุดคือ 4.82 กรัมต่อลิตร และมีการใช้น้ำตาลสูงสุด

Zhang และคณะ (2012) ได้ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากเชื้อสายพันธุ์ใหม่ *B. subtilis* C10 ที่เป็นสายพันธุ์ไม่ต้องการกรดกลูตามิกจากภายนอกในการผลิตกรดพอลิแกมมา-กลูตามิก ทำการทดลองระดับฟลาสก์ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 80 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$) 10 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมฟอตเฟต ($K_2HPO_4$) 0.5 กรัมต่อลิตร เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 0.04 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot H_2O$) 0.104 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคลอไรด์($CaCl_2$) 0.11 กรัมต่อลิตร พีเอช 7.2 และบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เข้าเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง และเติมกรดอินทรีย์ 5 ชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิต ได้แก่ กรดออกซาลิก กรดอะซิติก กรดซักซินิก กรดมาลิก และกรดซิตริก ในปริมาณ 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ พบว่าการเติมกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกในปริมาณสูงกว่ากรดอินทรีย์ตัวอื่น ๆ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 27.7 กรัมต่อลิตร

Zhu และคณะ (2013) การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้ไซโลสและซังข้าวโพดที่ถูกย่อย โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* HB-1 เมื่อทำการย่อยซังข้าวโพดจะได้น้ำตาลรีดิวซ์มีความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ ซูโครส กลูโคส ไซโลส มอลโตสหรือแลคโตส ด้วยอาหารที่ประกอบด้วย กลูตาเมต 30 กรัมต่อลิตร ผงสกัดยีสต์ 40 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 1 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 1 กรัมต่อลิตร และไซโลส หรือน้ำตาลที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพด 50 กรัมต่อลิตร พบว่ากลูโคสและไซโลสให้ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงเคียงใกล้เคียงคือ 16.69 และ 17.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ดีกว่ากลูโคส ซังข้าวโพดถูกย่อยจะประกอบด้วย กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส จึงใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองโดยทำการย่อยซังข้าวโพดให้ได้น้ำตาลเริ่มต้น โดยน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นแตกต่าง ตั้งแต่ 20-70 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นจาก 20 เป็น 50 กรัมต่อลิตร จะเพิ่มการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก 9.92 เป็น 21.83 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับปริมาณของเซลล์ก็เพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นมากกว่า 50 กรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกค่อย ๆ ลดลงแต่ปริมาณเซลล์ยังคงที่ ในขณะที่น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตรจะทำให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกและปริมาณเซลล์ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นซังข้าวโพดจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและเหมาะแก่การผลิตกรดพอลิ-แกมมากลูตามิก

Tang และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาการใช้เศษวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรม ทั้งกากเห็ดแห้ง (Dry mushroom residues, DMR) และกากของเสียกลูตาเมต (Monosodium glutamate production residues, MGPR) เพื่อผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากเชื้อ *B. subtilis* NX-2 โดยทำการทดลองใน SSF (Solid-state fermentation) ซึ่งวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า มีน้ำตาล 1.3 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน 18.4 เปอร์เซ็นต์ และกรดกลูตามิก 4.8 เปอร์เซ็นต์ โดยเสริมแหล่งคาร์บอนต่างกัน 6 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กากน้ำตาลอ้อย ไซโลส แป้ง กลีเซอรอลจากอุตสาหกรรม และกรดซิตริก เพื่อให้เชื้อได้ใช้ในการเจริญและผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก พบว่ากลีเซอรอลให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงที่สุดถึง 115.6 กรัมต่อกิโลกรัม และยังศึกษาต่อโดยเติมกลูตาเมตและกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปกลูตาเมตและกลีเซอรอลลดลงให้ขณะที่ปริมาณกรดกลูตามิกเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. subtilis* NX-2 มีการนำกลีเซอรอลไปใช้ในการเจริญและสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกได้จริง จากงานวิจัยชี้ให้เห็นว่ากลีเซอรอลจากอุตสาหกรรมใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับเชื้อ *B. subtilis* NX-2

## 2.7 แป้งมันสำปะหลัง

แป้ง (Starch) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ในพืชชั้นสูง สะสมอยู่ในเมล็ด ราก หัว ลำต้น และใบของพืช เช่น ข้าว มัน เผือก ธัญพืช โมเลกุลของแป้งเกิดจากน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) เป็นจำนวนมากในรูปของพอลิเมอร์เชิงเส้นตรงหรืออะไมโลส (Amylose) และพอลิเมอร์เชิงกิ่งก้านหรืออะไมโลเพกทิน (amylopectin) เมื่อแป้งถูกย่อยถึงขั้นสุดท้ายจะได้น้ำตาลกลูโคส แป้งเป็นแหล่งพลังงานสูงของมนุษย์ (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2546)

แป้งมันสำปะหลัง (Cassave Starch / Tapioca starch) เป็นแป้งที่ได้จากหัวมันสำปะหลัง มีองค์ประกอบทางเคมีของมันสำปะหลังประกอบด้วย น้ำ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน โขมัน เถ้า และกากใย นอกจากน้ำจะพบปริมาณของคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด 70-80 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของแป้งมันสำปะหลังเป็นผงละเอียด สีขาว เนื้อเนียน สัมผัสก็จะลื่นมือ เมื่อทำให้สุกด้วยความร้อนแป้งจะละลายง่าย เหลวหนืดข้นขึ้นเรื่อย ๆ และเมื่อพอเย็นตัวลงจะติดกันเป็นก้อน นิยมผสมกับอาหารที่ต้องการความหนืดและใส หรือผสมกับแป้งชนิดอื่น ๆ เพื่อให้อาหารมีความเหนียวนุ่มกว่าใช้แป้งชนิดเดียว แป้งมันสำปะหลังเป็นสินค้าที่ได้จากพืชเกษตรที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจไทย ลักษณะเด่นของแป้งมันสำปะหลังคือมีความบริสุทธิ์ สิ่งปนเปื้อนต่ำ โดยจะมีสตาร์ชอยู่มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ และมีไขมัน โปรตีนน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (Davies และคณะ, 1980)

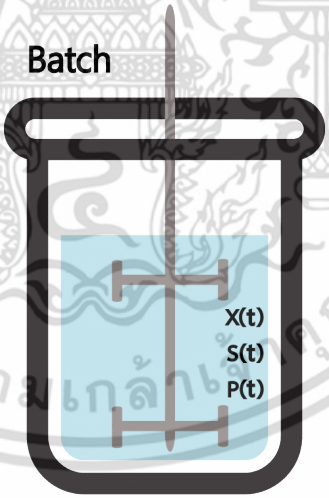
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peng และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยแบคทีเรีย *B. methylotrophicus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน ได้แก่ โซเดียมกลูตาเมต กลูโคส กลีเซอรอล แป้งที่ละลายได้ แลคโตส ซูโคส มอลโตส ฟรักโตส และกรดซิตริก ซึ่งผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญและสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. methylotrophicus* SK19.001 ประกอบด้วย กลีเซอรอล 30 กรัมต่อลิตร โซเดียมซิเตรท 15 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 50 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ 33.84 กรัมต่อลิตร ผลการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณใกล้เคียงกัน แต่แป้งมีความหนืดสูงกว่ากลีเซอรอล

## 2.8 กระบวนการหมักทางชีวภาพ

2.8.1 การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อระบบปิดซึ่งปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจะถูกกำหนดไว้ แสดงดังภาพที่ 2.7 และจะแปรผันตามระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ เมื่อถ่ายหัวเชื้อลงสู่ระบบเซลล์จะเพิ่มจำนวน และมีระยะการเจริญที่แตกต่างกัน การเพาะเลี้ยงแบบกะเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงที่ง่ายที่สุด มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนต่ำ แต่มีข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยง เช่น ไม่สามารถใช้ในกรณีผลิตภัณฑ์เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Product inhibition) (สุชาดา, 2559)



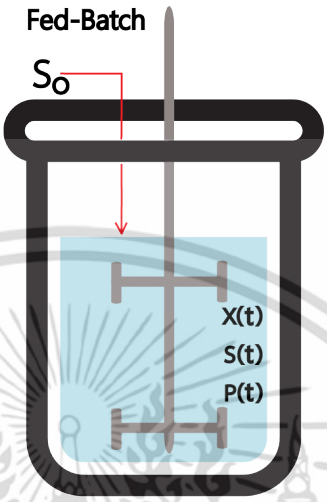

**ภาพที่ 2.7** การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

2.8.2 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)

เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมือนกับการเพาะเลี้ยงแบบกะ แต่มีการเติมสารอาหารเข้าไปใหม่เรื่อย ๆ หรือตามช่วงเวลาที่กำหนดเพื่อรักษาให้ปริมาณความเข้มข้นของสารตั้งต้นอยู่ในช่วงที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หรือการสร้างสารผลิตภัณฑ์ แสดงดังภาพที่ 2.8 โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบนี้จะไม่มีการนำของเหลวออกจากระบบ ทำให้ปริมาตรของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

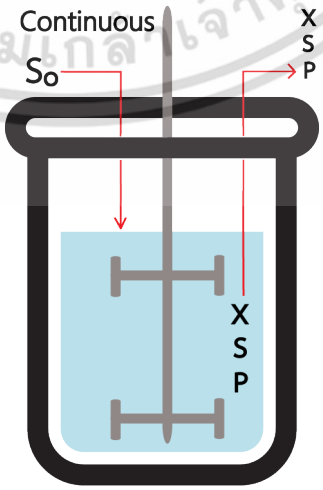
จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง ข้อจำกัดของการหมักแบบกึ่งกะ คือ ต้องอาศัยความชำนาญและมีทักษะในการใช้เครื่อง ควรระวังเรื่องสารพิษสะสมจนยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Yoshida และคณะ, 1973)




**ภาพที่ 2.8** การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)

2.8.3 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงที่มีปริมาณอาหารเริ่มต้นที่กำหนดไว้และมีการนำอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อออกอย่างต่อเนื่องพร้อมกับเติมอาหารใหม่เข้าไปอย่างต่อเนื่องในอัตราเร็วที่เท่ากัน แสดงดังภาพที่ 2.9 เพื่อรักษาความเข้มข้นของเซลล์ให้คงที่และสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์หรือผลิตภัณฑ์ได้ตลอดเวลา การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยใช้ระบบต่อเนื่องมีข้อดีกว่าการหมักแบบกะ คือ ให้ผลผลิตต่อหน่วยเวลาสูงกว่า มีความสม่ำเสมอในการดำเนินงาน และควบคุมโดยใช้ระบบอัตโนมัติได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือ มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายกว่าการหมักแบบกะ (สุชาดา, 2559)




**ภาพที่ 2.9** การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhang และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้กากน้ำตาลอ้อยและของเสียจากผงชูรสด้วยเชื้อ *B. subtilis* NX-2 จากการทดลองถังหมักขนาด 7.5 ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กลูตาเมต 50 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมฟอตเฟต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) 2 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.1 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) 0.03 กรัมต่อลิตร และแหล่งคาร์บอน 60 กรัมต่อลิตร ควบคุมพีเอชที่ 7.0±0.1 ในสภาวะที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศ 1.2 vvm และอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที พบว่าการหมักแบบกะใช้กากน้ำตาลที่ไม่ย่อยจะให้ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก 33.6±0.37 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการผลิต 0.46±0.006 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อทำการหมักแบบกึ่งกะโดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกากน้ำตาลอ้อยแบบไม่ย่อยและย่อยเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก คือ 50.2±0.53 และ 51.1±051 กรัมต่อลิตรที่ 96 ชั่วโมง ต่อมาทำการทดลองด้วยแหล่งคาร์บอนจากของเสียผงชูรส ให้ผลผลิต 52.1±0.52 กรัมต่อลิตร จากผลที่ได้นี้ทั้งกากน้ำตาลอ้อยและของเสียจากผงชูรสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ต้นทุนต่ำและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการผลิตกรดพอลิ-แกมมากลูตามิก

Zhu และคณะ (2013) ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้ไซโลสและเส้นใยซังข้าวโพดที่ถูกย่อยโดยใช้เชื้อ *B. subtilis* HB-1 ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูตาเมต 30 กรัมต่อลิตร ผงสกัดยีสต์ 40 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 1 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 1 กรัมต่อลิตร และไซโลส หรือน้ำตาลที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพด 50 กรัมต่อลิตร จากนั้นศึกษาด้วยกระบวนการหมักแบบกะ และแบบกึ่งกะในถังหมัก 10 ลิตร ด้วยอาหารเดิมแต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นไซโลส ด้วยพีเอช 6.5±0.1 ในสภาวะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 6 ลิตรต่อนาที และอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ จะให้มีการเติมอาหารไซโลสอัตโนมัติ 750 กรัมต่อลิตร พบว่าในกระบวนการหมักแบบกะสามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ 23.63 กรัมต่อลิตร ในอัตราการผลิต 0.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ 0.38 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และแบบกึ่งกะจะได้กรดพอลิ-แกมมากลูตามิก 28.15 กรัมต่อลิตร ในอัตราการผลิต 0.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ 0.26 กรัมต่อกรัมน้ำตาล เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนจากการย่อยซังข้าวโพดพบว่าจะได้ปริมาณกรดพอลิ-แกมมากลูตามิกถึง 24.92 กรัมต่อลิตร ถึงแม้แบบกึ่งกะจะให้ผลการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้สูงกว่า แต่อัตราการผลิตและผลได้ต่ำกว่าแบบกะ จึงมีการสนับสนุนให้ทำการทดลองแบบกะในงานทดลองต่อไป

Kongklom และคณะ (2015) ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยเชื้อ *B. licheniformis* TISTR 1010 เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องเติมกรดกลูตามิก ในอาหาร B medium ที่มีการดัดแปลงสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร ประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร กรดซิตริก 30 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$) 7 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 0.04 กรัมต่อลิตรแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 0.15 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot H_2O$) 0.104 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.5 กรัมต่อลิตร Tween-80 0.3 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) และ MS vitamin 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) พีเอช 7.4 ปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดำเนินการหมักแบบกึ่งกะแบ่งเป็น 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 ในฟลาสก์จะเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2 ในถังหมักขนาด 7 ลิตรที่มีอัตรการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เติมกลูโคส 137.58 กรัม และครั้งที่ 3 เติมกลูโคส 158.82 กรัม กรดซิตริก 4.62 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ 4.62 กรัม พบว่าใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ B ดัดแปลง และเติมกลูโคสกับแอมโมเนียมคลอไรด์อย่างต่อเนื่องในระหว่างการหมัก ควบคุมความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ และพีเอช ประมาณ 7.4 ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ได้คือ 27.5±0.2 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิต 0.29±0.059 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงาน

## 3.1 วัตถุดิบ

แป้งมันสำปะหลัง ยี่ห้อ ปลามังกร

## 3.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus megaterium* SRU02

## 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

**3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (Pre-inoculated)**

อาหารเหลวแอลบี (Luria-Bertani Broth, LB) (Himedia, India)

**3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ**

Plate Count Agar (PCA) (Difco, USA)

**3.3.3 การวิเคราะห์ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก**

3.3.3.1 กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS) (Carlo Erba, Italy)

3.3.3.2 ฟีนอล (Phenol, $C_6H_5OH$) (Merck, Germany)

3.3.3.3 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate, $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.3.3.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) (Carlo Erba, Italy)

**3.3.4 สำหรับการวิเคราะห์ค่ากรดพอลิแกมมากลูตามิกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง**

3.3.4.1 เมทานอล (Methanol HPLC grade, $CH_3OH$) (Sigma Aldrich, China)

3.3.4.2 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate, $Na_2HPO_4$) (Carlo Erba, Italy)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.5 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ทั่วไป

3.3.5.1 เกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$) (Difco, USA)

3.3.5.2 วุ้นแข็ง (Agar) (Difco, USA)

3.3.5.3 เอทานอล (Ethanol 95%)

3.3.5.4 กลีเซอรอล (Glycerol, $C_3H_8O_3$) (Carlo Erba, Italy)

3.3.5.5 เปปโตน (Peptone) (Rajasthan, India)

## 3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance) (Mettler Toledo, Germany)

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance) (Mettler Toledo, Germany)

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Heraeus, Germany)

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Heraeus, Germany) อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

ตู้แช่แข็ง (Freezer) (Sanyo, Japan) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตู้ดูดควัน (Fume hood) (Heraeus, Germany)

ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) : ABS1200 (Bosstech, Thailand)

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) (Tommy, Japan)

ไมโครเวฟ (Microwave) (Electrolux, China)

ไมโครปิเปต (Micropipette) (Mettler Toledo, Germany)

จานเพาะเชื้อพลาสติก (Petri dish) ขนาด 15x90 มิลลิลิตร (MedEx, USA)

เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer) (Scientific Industries, USA)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) (InoLab, Germany)

เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง High speed Centrifuge : 5804R (Eppendorf, Germany)

เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน (Hettich, Norway)

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, HPLC) Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, USA)

- Gel filtration column : Zorbax C8 (4.6 mm ID × 25 cm) (Hichrom, UK)
- DAD detector : Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, USA)

เครื่องเขย่าบ่มเชื้อ (Incubator shaker) : NB-205VL (Innova lab, India )

ถังหมักขนาด 7 ลิตร (รุ่น BioFlo® 310 Fermentor พร้อมชุดควบคุม) (Eppendorf, USA)

เครื่องล้างทำความสะอาดคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic) (GT sunic, China)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Thermo scientific, USA)

ชุดกรองแก้วสูญญากาศ (Filtration system)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.5 สถานที่ทำการทดลอง

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 3.6 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เดือนสิงหาคม 2559 ถึง เดือนเมษายน 2561

## 3.7 วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.7.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

3.7.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น

เตรียมอาหารเหลว LB และอาหารวุ้นแข็ง LB (ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากมีองค์ประกอบ คือ เปปโตน สารสกัดยีสต์ และโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งจะเป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับเชื้อ) โดยชั่งอาหาร LB สำเร็จรูป 25 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปปรับพีเอชให้ได้ 7.0±0.2 และแบ่งออกมาทำอาหารวุ้นแข็ง LB โดยเติมวุ้น Agar เป็น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตรของอาหารเหลว LB นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (Cesaro และคณะ, 2014)

3.7.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ E

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ตามตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Leonared และคณะ, 1958)

| สารอาหาร | ปริมาณ (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| กรดแอลกลูตามิก | 20 |
| กลูโคส | 20 |
| แอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$) | 7 |
| แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0.5 |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอตเฟส ($KH_2PO_4$) | 0.2 |
| ไดโพแทสเซียมฟอส ($K_2HPO_4$) | 0.81 |
| แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) | 0.15 |
| แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 2H_2O$) | 0.04 |

3.7.1.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งมันสำปะหลังในระดับฟลาสก์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 20 40 60 และ 80 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ลงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.7.1.4 การเก็บหัวเชื้อจุลินทรีย์

นำหัวเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกอาหารเหลวออกจากตะกอนเซลล์ ปิเปตต์อาหารเหลว LB ที่ผสมกับกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วใส่หลอดเก็บเชื้อเก็บควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.7.1.5 การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ

นำหัวเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ที่เก็บควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสมาแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวด้วยเทคนิค streak plate บนอาหารวุ้นแข็ง LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0±0.2 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการทดลอง

3.7.1.6 การเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014)

เพาะเลี้ยงหัวเชื้อตามข้อ 3.7.1.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่น Optical density (OD) ได้ 1.0±0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วใส่หัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ 1) อาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงมาจาก Cesaro และคณะ (2014) และ 2) อาหารเลี้ยงเชื้อ E ที่ไม่เติมกรดกลูตามิก ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0±0.2 และเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง และตรวจวัดปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกในตัวอย่าง

3.7.1.7 การเลี้ยงเชื้อโดยกระบวนการหมักแบบกะในระดับฟลาสก์

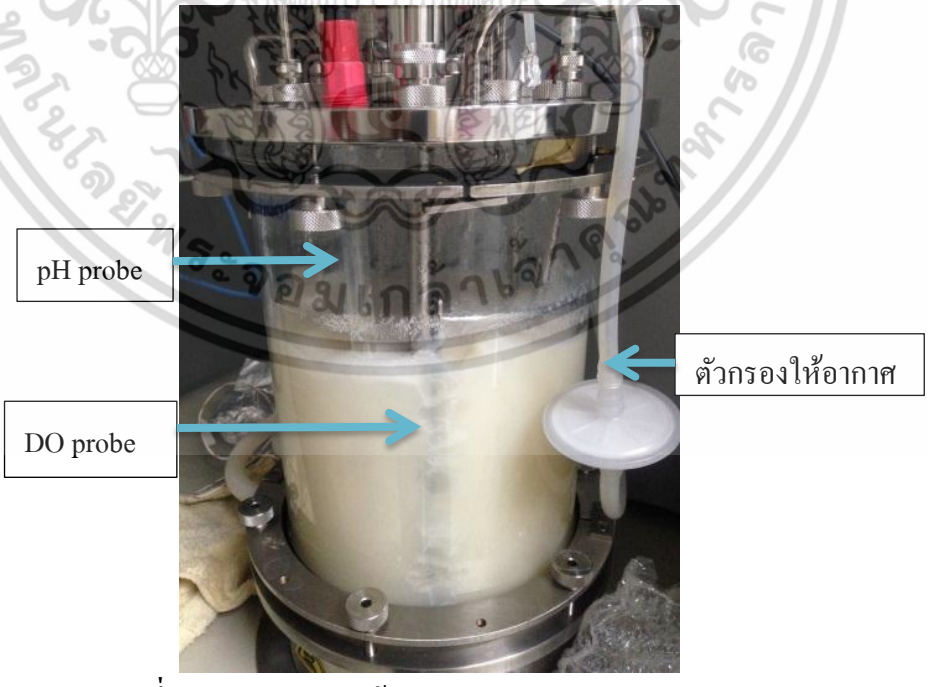
เพาะเลี้ยงหัวเชื้อตามข้อ 3.7.1.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่น Optical density (OD) ได้ 1.0±0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วใส่หัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งมันสำปะหลังตามความเข้มข้นข้อ 3.7.1.3 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0±0.2 และเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 4 8 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.1.8 การเลี้ยงเชื้อโดยกระบวนการหมักแบบกะในถังหมัก ขนาด 7 ลิตร

หลังจากได้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ทำให้เชื้อสามารถผลิตกรดพอลิ-แกมมากลูตามิกได้สูงที่สุด แล้วนำมาขยายระดับการผลิตในถังหมักขนาด 7 ลิตร ที่มีปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร มีแผ่นกั้น 4 แผ่น และใบพัด (Rushton turbine) 6 แฉก เตรียมถังหมักโดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นที่ต้องการปริมาตร 4.5 ลิตร ต่อสายอุปกรณ์ถังหมักแล้วทำการแคลิเบรทค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังก่อนนำถังหมักไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที นำถังหมักต่อเข้าระบบทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง จึงทำการปรับค่าการละลายของออกซิเจนก่อนจะตั้งค่าระบบตามสภาวะที่ต้องการศึกษา แล้วจึงนำหัวเชื้อที่เลี้ยงเพิ่มจำนวนไว้ปริมาตร 500 มิลลิลิตรลงในถังด้วยวิธีปลอดเชื้อ

เพาะเลี้ยงหัวเชื้อตามข้อ 3.7.1.5 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่น Optical density (OD) ได้ 1.0±0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใส่หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในถังหมักโดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.1.7 ในถังหมัก กำหนดอัตราการให้อากาศ 1.0 และ 2.0 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที (vvm) และอัตราการกวนของใบพัด 300 และ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่ 0 2 4 6 12 16 20 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ อัตราการใช้อากาศ อัตราการใช้ออกซิเจนจำเพาะ สัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวลออกซิเจน และอัตราการผลิตกรดพอลิ-แกมมากลูตามิก




**ภาพที่ 3.1** ถังหมักระดับห้องปฏิบัติการทดลอง ขนาด 7 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.7.2 การตรวจวิเคราะห์**

3.7.2.1 การตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์

การตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีสเปรดเพลท โดยปิเปตต์ตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตรทำการเจือจางที่ระดับ 1:10 แล้วปิเปตต์ตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารวุ้นแข็ง PCA และเกลี่ยด้วยแท่งแก้วให้กระจายตัวทั่วผิวหน้าอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.7.2.2 การสกัดกรดพอลิแกมมากลูตามิก (Kumar และ Pal, 2015)

นำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนแป้งมันสำปะหลังและเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนสารละลายใสมาตกตะกอนกรดพอลิ-แกมมากลูตามิกด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์แช่เย็น โดยใส่เอทานอล 3 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง เขย่าตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้กรดพอลิแกมมากลูตามิกตกตะกอน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเอทานอลออก นำตะกอนไปละลายด้วยน้ำ 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีลักษณะใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.7.2.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี 3,5-dinitrosali-cylic acid method (DNS method) (Miller, 1959)

ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนแป้งมันสำปะหลังและเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์ แล้วปิเปตต์ตัวอย่างสารละลายใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา 10 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเป็นสีส้ม-เหลือง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน

3.7.2.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, HPLC) (Kumar และ Pal, 2015)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก ใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รุ่น Agillent 1100 series และใช้ Diode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร แยกกรดพอลิแกมมากลูตามิกด้วยคอลัมน์ Zorbax gel filtration column (Zorbax C8, 4.6 mm ID × 25 cm) โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (20 mM $Na_2HPO_4$) ที่มีอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.7.3 การตรวจวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS**

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 23 ตามแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลองเป็นจำนวน 2 ซ้ำ สิ่งทดลองถูกจัดสุ่มลงในหน่วยทดลอง เป็นการวางแผนแบบทดสอบทางเดียว (One way ANOVA) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

## 3.8 วิธีคำนวณค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์

**3.8.1 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)**

จากสมการ $\ln X_t = \ln X_o + \mu t$

$$\mu = \frac{(\ln X_t - \ln X_o)}{t}$$

เมื่อ $X_t$ เป็นปริมาณเซลล์ช่วงที่อยู่ในระยะเพิ่มจำนวน

$X_o$ เป็นปริมาณเซลล์เมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน

$t$ เป็นเวลาใด ๆ

**3.8.2 อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$)**

จากสมการ $\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{max}}\frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}}$

เมื่อ $\mu$ เป็นอัตราการเจริญจำเพาะ

$\mu_{max}$ เป็นอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด

$S$ เป็นความเข้มข้นของสับสเตรตที่ใช้

$K_S$ เป็นค่าคงที่ของโมนอก หรือความเข้มข้นของสับสเตรตที่ทำให้อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ มีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของเชื้อนั้น

เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/S$ กับ $1/\mu$ จะได้ความชันเท่ากับ $K_S/\mu_{max}$ และค่าที่ตัดแกน $1/\mu$ เท่ากับ $1/\mu_{max}$

**3.8.3 ผลได้ของเซลล์ (Biomass yield, $Y_{X/S}$)**

จากสมการ $Y_{X/S} = \frac{dX}{dS}$

เมื่อ $dX$ เป็นความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น

$dS$ เป็นความเข้มข้นของสับสเตรตที่ถูกใช้ไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.8.4 ผลได้การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก (Product yield, $Y_{P/S}$)**

จากสมการ $Y_{P/S} = \frac{dP}{dS}$

เมื่อ $dP$ เป็นความเข้มข้นของกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่เพิ่มขึ้น

$dS$ เป็นความเข้มข้นของสับสเตรตที่ถูกใช้ไป

**3.8.5 อัตราผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Specific productivity)**

จากสมการ Productivity $= \frac{1}{X}\frac{dP}{dt}$

$$= \frac{(P_t - P_o)}{\frac{(X_t - X_o)\cdot t}{In\frac{X_t}{X_o}}}$$

เมื่อ $P_t$ เป็นความเข้มข้นของกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ชั่วโมงนั้น ๆ

$P_o$ เป็นความเข้มข้นของกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ชั่วโมงเริ่มต้น

$X_t$ เป็นความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ที่ชั่วโมงนั้น ๆ

$X_o$ เป็นความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ที่ชั่วโมงเริ่มต้น

$t$ เป็นเวลาใด ๆ

**3.8.6 ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล ($k_L a$)**

หาอัตราการลดลงของความเข้มข้นของออกซิเจนในของเหลว

จากสมการ $\frac{dC_L}{dt} = r_{O_2}X$

เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $C_L$(%DO) กับเวลา จะได้ความชันเป็น $r_{O_2}X$

ซึ่งค่า $r_{O_2}X$ จะเป็นอัตราการการใช้ออกซิเจน (Oxygen uptake rate, OUR)

หาอัตราการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของออกซิเจนในของเหลว

จากสมการ $C_L = C_L^* - \frac{1}{k_L a}\left(\frac{dC_L}{dt} + r_{O_2}X\right)$

เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $C_L$ กับ $\left(\frac{dC_L}{dt} + r_{O_2}X\right)$

จะได้ความชันเป็น $-1/k_L a$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและอภิปรายผล

ผลการศึกษาของงานวิจัยนี้จะบอกลักษณะความต้องการกรดแอลกลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 และศึกษาแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ในระดับฟลาสก์ จากนั้นนำความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมเพื่อศึกษาผลของอัตราการให้อากาศที่ 1 และ 2 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที (vvm) และอัตราการกวนของใบพัดที่ 300 และ 500 รอบต่อนาที เพื่อหาสภาวะของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกใน ระดับถังหมักขนาด 7 ลิตร

## 4.1 ศึกษาผลของกรดแอลกลูตามิกที่มีต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02

ผลของกรดแอลกลูตามิกต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหาร 2 ชนิดคือ 1) อาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงมาจาก Cesaro และคณะ (2014) และ 2) อาหารเลี้ยงเชื้อ E ที่ไม่เติมกรดกลูตามิก ที่สภาวะพีเอช 7.00±0.2 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ที่ไม่เติมกรดแอลกลูตามิกจะมีการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกเท่ากับ 0.069 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ที่มีองค์ประกอบของกรดแอลกลูตามิก จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. megaterium* SRU02 เป็นเชื้อจำพวกกลุ่มที่ไม่ต้องเติมกรดแอลกลูตามิกจากภายนอกลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (L-glutamic acid- independent bacteria) สามารถสารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ E ในการเจริญและสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกได้โดยที่ไม่ต้องมีกรดแอลกลูตามิก ซึ่งให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกมากกว่าในอาหารที่มีกรดแอลกลูตามิก

**ตารางที่ 4.1** การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ที่เติมกรดแอลกลูตามิกและไม่เติมกรดแอลกลูตามิก

| อาหารเลี้ยงเชื้อ | กรดพอลิแกมมากลูตามิก (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| เติมกรดแอลกลูตามิก | 0.041±0.01 |
| ไม่เติมกรดแอลกลูตามิก | 0.069±0.01 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Bacillus* spp. ที่ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ถูกแบ่งเป็น 2 จำพวกได้แก่ 1) แบคทีเรียที่ต้องเติมกรดแอลกลูตามิกในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ และ 2) แบคทีเรียที่ไม่ต้องเติมกรดแอลกลูตามิกในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อก็สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้จากการสังเคราะห์กรดแอลกลูตามิกผ่านวิถี de novo (Xu และคณะ, 2005) ดังภาพที่ 2.6 ซึ่งในวิถีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกผ่านวิถี de novo นี้จะมีเอนไซม์ Pyruvic acid aminotransferase ซึ่งจะเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนกรดไพรูวิกและกรดแอลฟาคีโตกลูตาริกให้เป็นแอลอะลานีนก่อนเปลี่ยนรูปเป็นกรดกลูตามิกเพื่อสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกออกนอกเซลล์ Kambourova และคณะ (2001) กล่าวไว้ในงานของเขาว่ากรดแอลกลูตามิกจะเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองที่แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ โดยอาจจะข่มการแสดงออกของยีนเอนไซม์สังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก หรืออาจจะกระตุ้นการแสดงออกของยีน บางสายพันธุ์กรดแอลกลูตามิกจากภายนอกยังยับยั้งการแสดงออกของยีนถ้าในอาหารนั้นมีแหล่งไนโตรเจนหรือไม่ได้ใช้กรดแอลกลูตามิกเป็นแหล่งไนโตรเจน

งานวิจัยของ Tork และคณะ (2015) ได้ศึกษาลักษณะของเชื้อ *B. licheniformis* NRC20 ในอาหาร Nutrient broth และเปรียบเทียบการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยเติมกรดแอลกลูตามิกและไม่เติมกรดแอลกลูตามิกในอาหาร Nutrient broth พบว่าสามารถสร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดแอลกลูตามิกจากภายนอก แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่มีกรดแอลกลูตามิกเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวจะสามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ Kubota และคณะ (1993) ศึกษาผลของการเติมกรดอะมิโนที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่ประกอบด้วย Veal infusion broth 2 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากเชื้อ *B. subtilis* F-2-01 ที่เลี้ยงในสภาวะบ่มเขย่า 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าเมื่อไม่เติมกรดอะมิโนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะได้กรดพอลิแกมมากลูตามิก 0.7 กรัมต่อลิตร และเมื่อเติมกรดแอลกลูตามิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 1 3 5 7 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ จะพบว่าการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 48 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดแอลกลูตามิก 7 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มกรดแอลกลูตามิกเป็น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เชื้อ *B. subtilis* F-2-01 ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกน้อยลง

ในทางกลับกันจากการศึกษาของ Xu และคณะ (2005) เกี่ยวกับประสิทธิภาพการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อสายพันธุ์ที่ค้นพบใหม่ *B. subtilis* NX-2 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Basal medium ประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.1 กรัมต่อลิตร และกรดแอลกลูตามิก 30 กรัมต่อลิตร ศึกษาความเข้มข้นของกรดแอลกลูตามิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0-70 กรัมต่อลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ผลของความเข้มข้นของกรดแอลกลูตามิกพบว่าเมื่อไม่เติมกรดแอลกลูตามิกเลยเชื้อจะไม่ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก จึงชี้ให้เห็นว่ากรดแอล-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูตามิกจากภายนอกสำคัญสำหรับเชื้อ *B. subtilis* NX-2 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแอลกลูตามิกจะทำให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกเพิ่มขึ้นด้วยโดยที่ความเข้มข้นกรดแอลกลูตามิก 70 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงสุดเป็น 41.2 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อสังเกตอัตราการเปลี่ยนรูปจากกรดแอลกลูตามิกเป็นกรดพอลิแกมมากลูตามิก ที่ความเข้มข้นกรดแอลกลูตามิก 70 กรัมต่อลิตร จะมีอัตราเปลี่ยน 58.8 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ความเข้มข้นกรดแอลกลูตามิก 10-30 กรัมต่อลิตร จะมีอัตราเปลี่ยนถึง 101-105 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นความเข้มข้นของกรดกลูตามิกที่เหมาะสมที่สุดคือ 30 กรัมต่อลิตร จะผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงสุดคือ 30.2 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ Goto และ Kunioka (1992) ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากเชื้อ *B. subtilis* IFO3335 ในอาหาร 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) 0.1 กรัม ไดโซเดียมฟอสเฟต($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 0.1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.05 กรัม แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot nH_2O$) 0.002 กรัม เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 0.005 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ $(CaCl)_2$ 0.02 กรัม และไบโอติน 50 ไมโครกรัม แล้วศึกษาระดับความเข้มข้นของกรดแอลกลูตามิก 0-5 กรัม พบว่าเชื้อ *B. subtilis* IFO3335 จะสามารถผลิตกรดพอลิแกมมา- กลูตามิกได้สูงสุด 0.96 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรในอาหารที่เติมกรดแอล-กลูตามิก 3 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม และกรดซิตริก 2 กรัม พีเอช 7.5 ที่สภาวะการบ่มบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่เชื้อจะไม่ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกในอาหารที่ไม่มีการเติมกรดแอลกลูตามิก

## 4.2 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02

การศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของ *B. megaterium* SRU02 เพื่อให้ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงสุด โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร และเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลัง นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลการเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 แสดงดังภาพที่ 4.1 พบว่าการเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่แตกต่างกัน จะมีการเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์สูงสุดในชั่วโมงที่ 8 เหมือนกัน โดยมีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6.2 Log CFU/mL และมีจำนวนเชื้อสูงสุดอยู่ในช่วง 8.1–8.5 Log CFU/mL ในชั่วโมงที่ 8 เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) ของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังแตกต่างกัน ดังแสดงตารางที่ 4.2 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังมากขึ้นอัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) จะเพิ่มขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร จะมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่สูงสุดเท่ากับ 1.124 ต่อชั่วโมง แต่เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) ที่ใช้เป็นตัวแปรทางจลนพลศาสตร์อธิบายความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญจำเพาะกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น พบว่าแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จะมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) ที่สูงสุดเป็น 0.1081 ต่อชั่วโมง

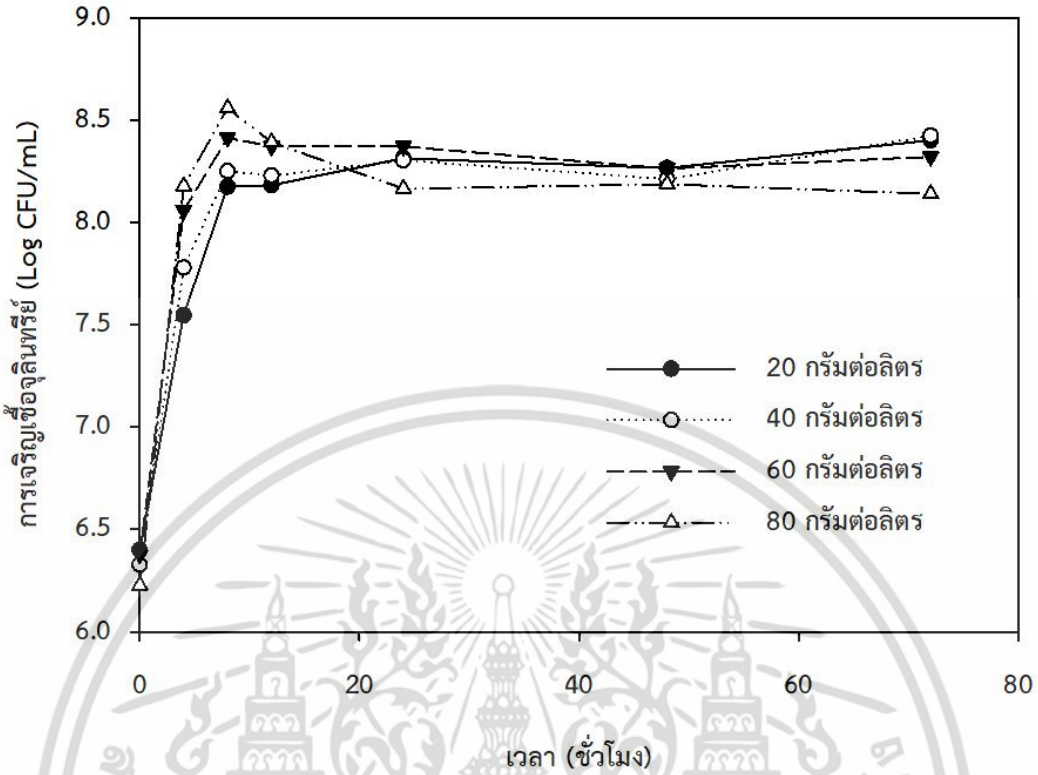
ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เปลี่ยนแปลง แสดงดังภาพที่ 4.2 จะพบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญสูงขึ้นปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลง ในช่วงแรกของการเจริญเชื้อจะทำการย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนจะเห็นว่าน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 4-8 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เชื้อกำลังเจริญแบบทวีคูณ เมื่อมีการเจริญขึ้นเรื่อย ๆ ปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจึงมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญและผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 4 มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.152 และ 0.193 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 8 ในขณะที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 80 กรัมต่อลิตร จะพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 0.092 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 8 แล้วลดลงในชั่วโมงที่ 12 และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 24 และหลังจากนั้นก็ลดลง แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นช้ากว่า เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร มีความเข้มข้นสูงกว่าทำให้มีความหนืดสูงกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ และมีลักษณะเป็นของแข็งมากกว่าจึงทำให้เชื้อย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ช้ากว่า จากตารางที่ 4.2 แสดงค่าผลได้ของเซลล์ ($Y_{X/S}$) พบว่าที่แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ $6.81\times10^{3}$ และ $4.48\times10^{3}$ Log CFU/ g glucose ซึ่งสูงกว่าแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งค่าผลได้ของเซลล์ ($Y_{X/S}$) จะบ่งบอกปริมาณของเซลล์สูงสุดในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด

จากผลการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในระหว่างการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร แสดงดังภาพที่ 4.3 จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก จนถึงชั่วโมงที่ 48 แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร จะผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ 0.080, 0.082, 0.087 และ 0.089 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นกรดพอลิแกมมากลูตามิกจะลดลง มีผลได้ของกรดพอลิแกมมา-กลูตามิก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.325, 0.335, 0.183 และ 0.268 g PGA/g glucose ตามลำดับ เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร เชื้อ *B. megaterium* SRU02 มีการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกและการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไปในทางเดียวกัน จึงเห็นได้ว่าที่แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรมีค่าผลได้ของกรดพอลิแกมมากลูตามิกมากที่สุดคือ 0.335 กรัมต่อลิตร เป็นค่าผลได้ของการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มากที่สุดในช่วงของการใช้น้ำตาลรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

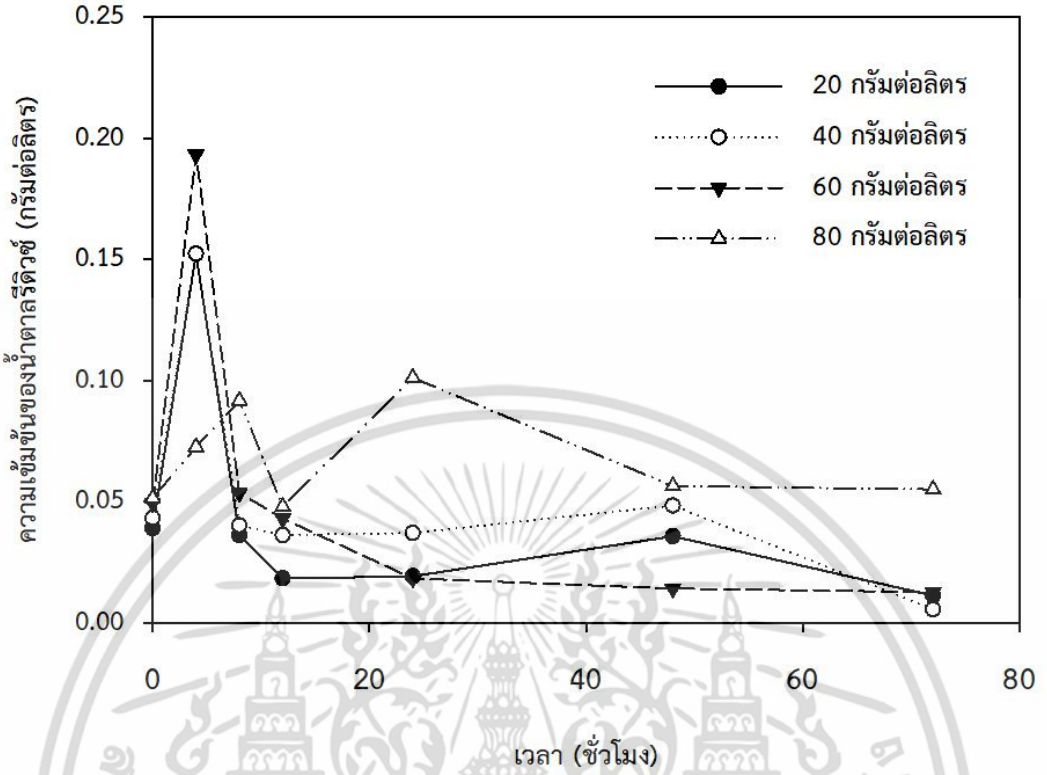
จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นเชื้อ *B. megaterium* SRU02 สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังที่เป็นพอลิแซคคาไรด์เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนโดยสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังที่เป็นโมเลกุลใหญ่ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ เชื้อ *B. megaterium* SRU02 มีสมบัติสามารถสร้างและปล่อยเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bajpai และ Bajpai (1989) ที่ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อสายพันธุ์ *Bacillus* spp. พบว่า *B. licheniformis* TCRDC-B13 สามารถสังเคราะห์เอนไซม์อะไมเลสได้ดี ที่พีเอช 6-9 และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีแหล่งคาร์บอนคือ แป้งข้าวโพด และแหล่งไนโตรเจน คือ เปปโตน ดังนั้น *B. megaterium* SRU02 จึงสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นแหล่งอาหารสำคัญในการเจริญและผลิตกรดพอลิ-แกมมากลูตามิก จะเห็นได้จากความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นในช่วงแรกและลดลงอย่างรวดเร็ว และพบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและคงที่ ทางเดียวกันนั้นปริมาณกรดพอลิ-แกมมากลูตามิกก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่ในช่วงท้ายของการหมักจะพบว่าปริมาณกรดพอลิแกมมา-กลูตามิกจะมีการลดลงเนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือน้อยมากอาจไม่เพียงพอสำหรับการเจริญของเชื้อจึงมีการใช้กรดพอลิแกมมากลูตามิกที่เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนแทน บางครั้งเชื้อยังสามารถใช้กรดพอลิแกมมากลูตามิกเป็นแหล่งกลูตาเมตในระยะคงที่ในสภาวะขาดแคลนอาหาร (Ogunleye และคณะ, 2015) แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารสำรองจากแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยที่เป็นส่วนประกอบของการสร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิก (สุพัฒน์ และรสมันต์, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



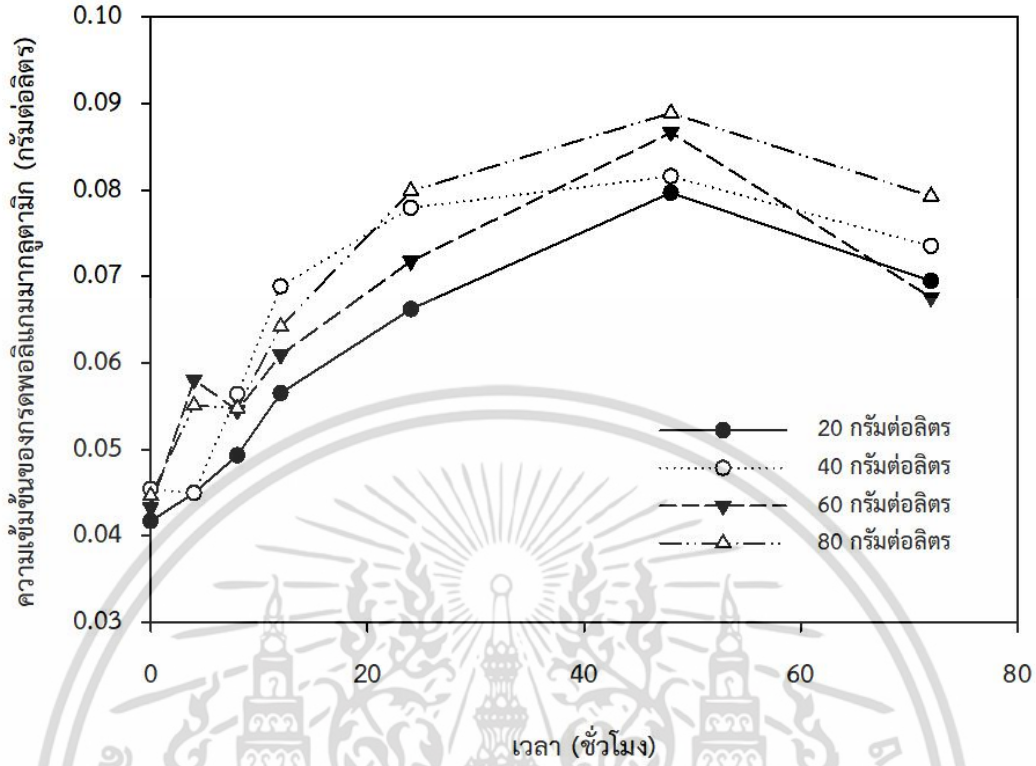

**ภาพที่ 4.1** การเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.2** การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.3** การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Moraes และคณะ (2012) ที่ศึกษาสภาวะการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่เหมาะสม โดยดัดแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากน้ำตาล (ที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส) และเติมกรดซิตริก และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 200 12.5 และ 8 กรัมต่อลิตร ในกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อ *B. velezensis* NRRL-23189 จะผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ 4.82 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนจะทำให้เพิ่มปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกด้วย แต่ถ้าปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินก็จะทำให้การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกลดลงด้วย และงานวิจัยของ Ju และคณะ (2014) ที่ศึกษาสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. subtilis* MJ80 โดยศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอน 7 ชนิดได้แก่ ฟรุกโตส กาแลกโตส แลกโตส กลูโคส มอลโตส ซูโครส และแป้ง ปริมาตร 2 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร เมื่อทดสอบแหล่งคาร์บอนพบว่า เชื้อ *B. subtilis* MJ80 ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จะสามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้สูงสุด ซึ่งเมื่อทดสอบความเข้มข้นของแป้งที่ความเข้มข้น 0-50 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นแป้งที่เพิ่มขึ้นจะให้กรดพอลิแกมมากลูตามิกเพิ่มขึ้นด้วยโดยที่แป้งความเข้มข้นที่ 30 กรัมต่อลิตร จะให้กรดพอลิแกมมา-กลูตามิกสูงสุดเท่ากับ 48.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งงานวิจัยนี้ช่วยสนับสนุนในการศึกษาว่า เมื่อความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เป็นแหล่งคาร์บอนมากขึ้นเชื้อสามารถผลิตกรดพอลิแกมมา-กลูตามิกเพิ่มขึ้นด้วย

เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) ของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ดังตารางที่ 4.2 พบว่าที่แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จะมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) คือ 0.1081±0.02 ต่อชั่วโมง ซึ่งอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) เป็นค่าที่บ่งบอกความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญจำเพาะกับปริมาณสารตั้งต้น ซึ่งอัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) เป็นค่าที่บอกความเร็วของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ยิ่งมีค่ามาก ยิ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เร็ว หมายความว่าที่แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จะใช้ปริมาณสารตั้งต้นในการเจริญของเซลล์ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณได้อย่างคุ้มค่า ดังนั้นจึงเลือกแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ในการขยายระดับการหมักในถังหมักในหัวข้อต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.2** ตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *B. megaterium* SRU02

| ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร) | อัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) (ต่อชั่วโมง) | อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) (ต่อชั่วโมง) | ค่าผลได้ของเซลล์ ($Y_{X/S}$) (Log CFU/ g glucose) | ค่าผลได้ของกรดพอลิแกมมากลูตามิก ($Y_{P/S}$) (g PGA/ g glucose) | อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Productivity) (g/ Log CFU /h) | อัตราการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ($Q_p$) (g/ L/ h) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 20 | $0.6611\pm0.05^{c}$ | $0.0285\pm0.01^{c}$ | $6.81\times10^{3}\pm2.26\times10^{2\ a}$ | $0.3248\pm0.01^{a}$ | $3.82\times10^{-8}\pm6.22\times10^{-3\ a}$ | $0.00079\pm0.0001^{a}$ |
| 40 | $0.8363\pm0.06^{b}$ | $0.1081\pm0.02^{a}$ | $4.48\times10^{3}\pm6.20\times10^{1\ b}$ | $0.3350\pm0.07^{a}$ | $5.78\times10^{-8}\pm6.64\times10^{-2\ a}$ | $0.00110\pm0.0000^{a}$ |
| 60 | $0.9695\pm0.14^{b}$ | $0.0545\pm0.02^{b}$ | $1.12\times10^{3}\pm1.97\times10^{2\ c}$ | $0.1829\pm0.08^{a}$ | $5.10\times10^{-8}\pm8.30\times10^{-2\ a}$ | $0.00093\pm0.0004^{a}$ |
| 80 | $1.1237\pm0.04^{a}$ | $0.0485\pm0.02^{b}$ | $2.11\times10^{3}\pm8.83\times10^{2\ c}$ | $0.2679\pm0.01^{a}$ | $4.88\times10^{-8}\pm2.17\times10^{-1\ a}$ | $0.00093\pm0.0005^{a}$ |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างของค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อความมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)

**4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 โดยกระบวนการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 7 ลิตร**

เลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร และเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร พีเอช 7.00±0.2 ในถังหมักขนาด 7 ลิตร โดยปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร โดยความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นประมาณ $10^6$ CFU/mL ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 37 องศาเซลเซียส โดยศึกษาอัตราการกวน 2 ระดับได้แก่ 300 และ 500 รอบต่อนาที และศึกษาอัตราการให้อากาศ 2 ระดับได้แก่ 1 และ 2 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที (vvm) แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง โดยจะวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณกรดพอลิแกมมา-กลูตามิก

**4.3.1 การเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02**

ปริมาณเชื้อ *B. megaterium* SRU02 แสดงดังภาพที่ 4.4 และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงดังภาพที่ 4.5 พบว่าช่วงแรกของแต่ละสภาวะจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง สูงสุดถึงประมาณ 8.4 Log CFU/mL และน้ำตาลรีดิวซ์จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพราะเชื้อย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเนื่องจากเซลล์นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ โดยความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที จะมีความเข้มข้นสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 0.0473 กรัมต่อลิตร แล้วหลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 12 ทุกสภาวะจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว จากภาพที่ 4.4 จะเห็นการเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในช่วงแรกที่มีการเจริญแบบทวีคูณอย่างรวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมงแรก และหลังจากนั้นในสภาวะที่การให้อากาศ 2 vvm ทั้งการกวนที่ 300 และ 500 รอบต่อนาที จะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลดลงเนื่องจากการให้อากาศที่มากขึ้นจะทำให้ฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเยอะขึ้นด้วย ส่งผลให้เซลล์ได้รับอากาศมากไปซึ่งไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ทำให้เซลล์ตายปริมาณของเชื้อจึงลดลงในช่วง 16-20 ชั่วโมง แล้วหลังจากนั้นก็จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นมาอีกได้ เนื่องจากเชื้อตระกูล *Bacillus* มีสปอร์จึงอาจมีการงอกของสปอร์ได้อีกในสภาวะที่ปรับตัวได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ผลได้ของเซลล์ ($Y_{X/S}$) พบว่าที่สภาวะการให้อากาศ 2 vvm และการกวน 300 รอบต่อนาที มีค่าผลได้ของเซลล์มากที่สุดคือ $1.28\times10^{5}$ Log CFU/g glucose บ่งบอกถึงชีวมวลที่ผลิตขึ้นต่อปริมาณอาหารที่ถูกใช้ไป ซึ่งที่สภาวะการให้อากาศ 2 vvm และการกวน 300 รอบต่อนาที จะได้มวลเซลล์มากที่สุดในหนึ่งหน่วยของสารอาหารที่ถูกใช้ของการหมัก ในอัตราการให้อากาศที่เท่ากันจะมีแนวโน้มที่เหมือนกัน ที่การให้อากาศปริมาตร 1 vvm และการกวน 500 รอบต่อนาที จะมีปริมาณเชื้อที่มากกว่าการกวน 300 รอบต่อนาทีเพียงเล็กน้อย ในขณะที่เมื่อให้อากาศมากขึ้นจาก 1 เป็น 2 vvm ปริมาณเชื้อในช่วงระยะหนึ่งจะลดลงไปเนื่องจากการให้อากาศสูงเกินความต้องการของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ส่งผลให้อากาศยับยั้งการเจริญของเชื้อ เช่นเดียวกับ Palma และคณะ (1996) เมื่อเพิ่มการให้อากาศทำให้ปริมาตรอากาศภายในระบบสูงขึ้นจะทำให้ออกซิเจนไปยับยั้งการเจริญของเซลล์

เมื่อพิจารณาการถ่ายเทออกซิเจนที่เกิดขึ้นสังเกตจากค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล ($k_L$a) ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่แสดงความสามารถในการถ่ายเทออกซิเจนจากในฟองอากาศไปสู่ตัวเซลล์ ถ้าค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล ($k_L$a) มีค่าน้อยแสดงว่าในระบบนั้นมีความสามารถในถ่ายการเทออกซิเจนลงสู่น้ำหมักได้อย่างจำกัด โดยการให้อากาศปริมาตร 1 vvm จะมีค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล 8.19 และ 2.34 ต่อชั่วโมง ในอัตราการกวน 300 และ 500 รอบต่อนาที ซึ่งเมื่อให้อากาศเป็น 2 vvm จะมีค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลน้อยลงเป็น 6.17 และ 1.31 ต่อชั่วโมง ในอัตราการกวน 300 และ 500 รอบต่อนาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่อัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที จะมีการถ่ายเทมวลมากกว่าที่การกวน 500 รอบต่อนาที มีผลมาจากความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากการกวน อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นแป้งมันสำปะหลังซึ่งมีความหนืดทำให้มีข้อจำกัดในการส่งผ่านออกซิเจน เป็นผลทำให้เชื้อมีจำนวนลดลงอีกทั้งยังต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมเพื่อให้เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ ในกระบวนการหมักแบบใช้อากาศโมเลกุลของออกซิเจนจะต้องเอาชนะความต้านทานระหว่างเฟสของก๊าซกับเฟสของเหลวก่อนที่เชื้อจะนำไปใช้ โดยการถ่ายเทออกซิเจนจากภายในฟองก๊าซไปยังบริเวณของเหลวแล้วเข้าสู่เซลล์จะเกิดปฏิกิริยาขึ้นระหว่างเฟสของก๊าซ-ของเหลว และเฟสของเหลว-ของแข็งหรือตัวเซลล์ (วรนารถ, 2554) ซึ่งในการถ่ายเทมวลออกซิเจนนี้จะต้องใช้ระยะในการให้ออกซิเจนได้เข้าถึงตัวเซลล์ จากผลการทดลองที่อัตราการกวนที่เพิ่มขึ้นจาก 300 เป็น 500 รอบต่อนาที จะทำให้มีค่าการถ่ายเทมวลลดลงเนื่องจากเมื่อการกวนของใบพัดยิ่งเร็วขึ้นจะยิ่งกวนอากาศได้เร็วทำให้ระยะเวลาการสัมผัสระหว่างอากาศและตัวเซลล์น้อยลงจึงทำให้ค่าการถ่ายเทมวลและอัตราการใช้ออกซิเจนต่ำกว่าที่การ

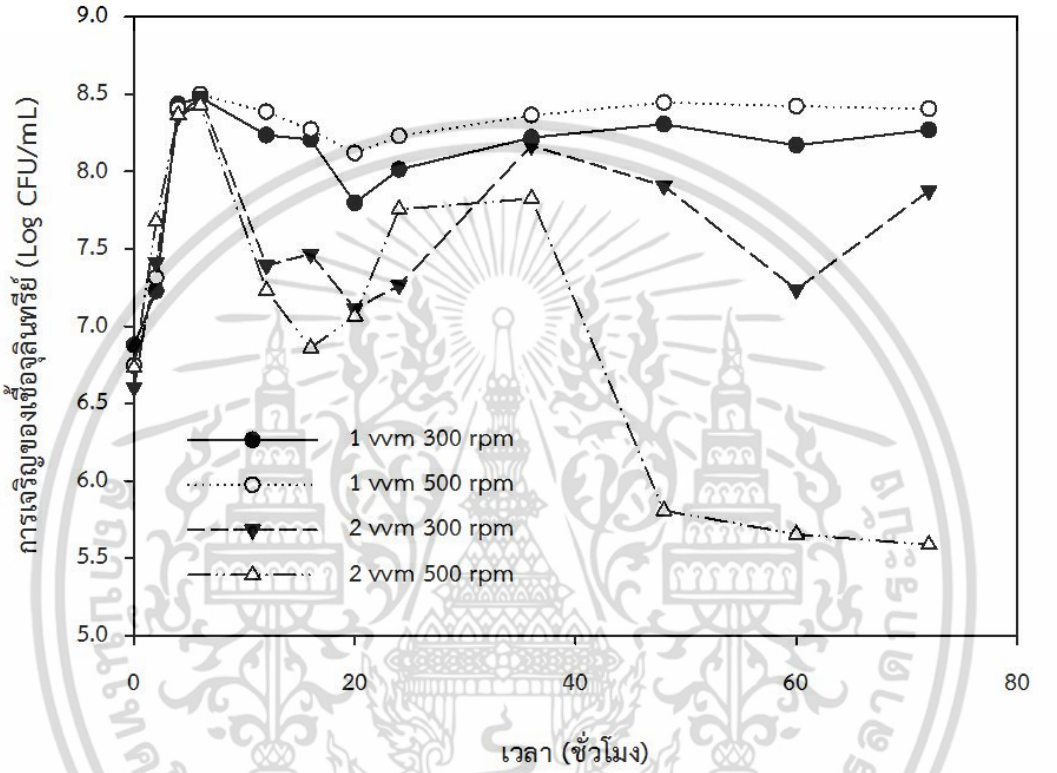
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กวน 300 รอบต่อนาที ในขณะที่สภาวะการให้อากาศ 1 vvm ที่การกวน 500 รอบต่อนาที ถึงแม้จะมีค่าการถ่ายเทมวลอากาศและค่าการใช้อากาศน้อยแต่ยังสามารถเจริญได้อยู่เนื่องจากเชื้อตระกูล *Bacillus* เป็นเชื้อที่มีลักษณะ Facultative anaerobe ที่สามารถเจริญอยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เพราะฉะนั้นในการให้อากาศที่ปริมาตร 1 vvm เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 มากกว่าการให้อากาศที่ปริมาตร 2 vvm และจากตารางที่ 4.3 จะพบว่าอัตราการให้อากาศสูงขึ้นอัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) มีค่าน้อยลง โดยที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที จะให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เป็น 1.3091 และ 0.0350 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเพิ่มการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที จะมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 1.2599 และ 0.0283 ต่อชั่วโมง และเมื่อให้อัตราการให้อากาศเป็น 2 vvm และการกวน 300 และ 500 รอบต่อนาที ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 1.09 และ 1.12 ต่อชั่วโมง และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด จะมีค่าเท่ากับ 0.0232 และ 0.0260 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทั้งอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนของใบพัดส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 โดยเมื่อให้อัตราการให้อากาศปริมาตร 1 vvm จะทำให้เชื้อมีการเจริญที่ดีกว่าการให้อากาศปริมาตร 2 vvm แต่เมื่อเปรียบเทียบอัตราการกวนจาก 300 รอบต่อนาที เป็น 500 รอบต่อนาที จะไม่ค่อยมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 มากนัก ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Bajaj และ Singhal (2011) เมื่อเพิ่มอัตราการกวนมากขึ้น จะช่วยให้การเจริญของ *B. licheniformis* NCIM2324 มีมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นด้วย และจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดถึง 4.21 กรัมต่อลิตร ที่การให้อากาศ 1 vvm และการกวน 1000 รอบต่อนาที และเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1 เป็น 3 vvm ก็จะยิ่งช่วยการเจริญของเซลล์ เนื่องจาก *B. licheniformis* NCIM2324 เป็นเชื้อต้องการอากาศในการเจริญ เมื่อเติมอากาศเพิ่มขึ้นก็จะช่วยให้ออกซิเจนเพียงพอแก่การเจริญของเชื้อสายพันธุ์นี้ และงานวิจัยของ Cromwick และคณะ (1996) ที่สนับสนุนเกี่ยวกับการเพิ่มอัตราการให้อากาศและเพิ่มอัตราการกวนทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีขึ้น โดยพบว่าเมื่อให้อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที ที่การให้อากาศ 1 vvm จะทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 2 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 800 รอบต่อนาที และเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 2 vvm จะยิ่งทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 4 กรัมต่อลิตร ในการศึกษาหลายกรณีการถ่ายเทออกซิเจนจะควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ และส่งผลทางกระบวนการชีวภาพ (García-Ochoa และคณะ, 2010) Silva และคณะ (2014) ในงานวิจัยของเขาเมื่อเพิ่มอัตราการกวนจะส่งผลต่อปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เพียงเล็กน้อย แต่จะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในงานวิจัยนี้เชื้อ *B. megaterium* SRU02 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ตามการเพิ่มของอัตราการให้อากาศได้ ซึ่งในอัตราการให้อากาศปริมาตร 1 vvm จะให้ปริมาณเซลล์สูงกว่าการให้อากาศปริมาตร 2 vvm เนื่องมาจากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจมีออกซิเจนมากเกินส่งผลให้อากาศยับยั้งการเจริญของเชื้อในสภาวะที่มีอากาศ 2 vvm




**ภาพที่ 4.4** การเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ในระบบถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1 และ 2 vvm และอัตราการกวนของใบพัด 300 และ 500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

### 4.3.2 การใช้น้ำตาลรีดิวซ์และการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

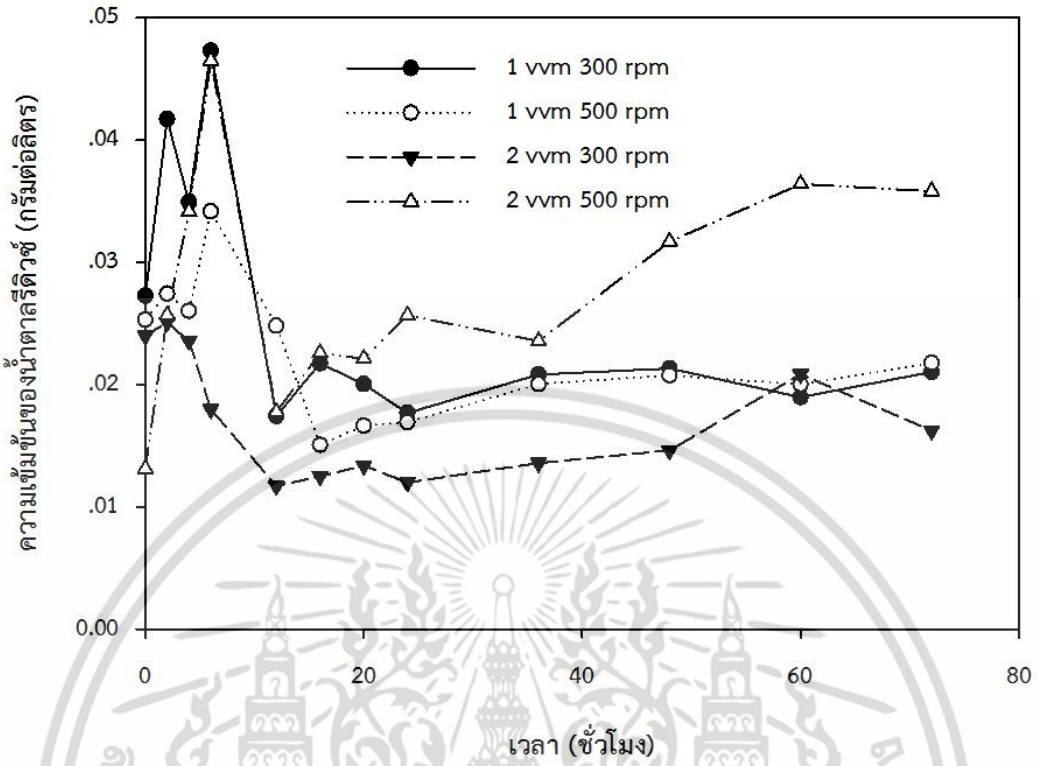
ผลการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์จากภาพที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าเมื่อแป้งมันสำปะหลังถูกย่อยจะได้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อ *B. megaterium* SRU02 จะเพิ่มปริมาณขึ้นสูงที่สุดในช่วงประมาณชั่วโมงที่ 2-6 โดยที่สภาวะการให้อากาศ 1 vvm และการกวน 300 รอบต่อนาที จะให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นสูงที่สุดถึง 0.0473 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที จะมีความเข้มข้นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลรีดิวซ์เป็น 0.0342 กรัมต่อลิตร และที่สภาวะการให้อากาศ 2 vvm การกวนที่ 300 และ 500 รอบต่อนาที จะให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้น 0.0251 และ 0.0465 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทุก ๆ สภาวะที่ศึกษาเมื่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงสุดแล้วความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ก็จะลดลง เนื่องจากเชื้อจะนำน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้ในการเจริญและมีการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในสภาวะที่การให้อากาศ 2 vvm ทั้งการกวนที่ 300 และ 500 รอบต่อนาที หลังชั่วโมงที่ 48 จะมีการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์เป็นช่วงเดียวกับเชื้อที่มีจำนวนลดลง อาจเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสที่ยังทำงานอยู่จึงมีการย่อยแป้งมันสำปะหลังเพื่อเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป ผลของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนของใบพัดต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก พบว่าปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกแปรผกผันกับอัตราการให้อากาศ ที่ปริมาตร 1 vvm จะมีกรดพอลิแกมมา-กลูตามิกสูงกว่าอัตราการให้อากาศที่ปริมาตร 2 vvm จากภาพที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าอัตราการให้อากาศมีผลต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยที่อัตราการให้อากาศเป็น 1 vvm ที่อัตราการกวน 300 และ 500 รอบต่อนาที จะผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้สูงขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 48 จะให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก 0.059 และ 0.046 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และหลังจากนั้นปริมาณจะลดลง ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาตรการให้อากาศเป็น 2 vvm จะพบว่ามีการผลิตกรดพอลิแกมมา-กลูตามิกสูงขึ้นถึงแค่ชั่วโมงที่ 12 แล้วมีการลดลง เนื่องจากมีปริมาตรอากาศที่สูงขึ้นจึงทำให้เซลล์ตาย ทำให้การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกมีปริมาณน้อยไปด้วย

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมแก่การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอ-ไรด์ 10 กรัมต่อลิตร คือให้อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนของใบพัด 300 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 0.059 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล 8.19 ต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ $7.37\times10^{-8}$ g/ Log CFU/ h

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.5** การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ในระบบถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1 และ 2 vvm และอัตราการกวนของใบพัด 300 และ 500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

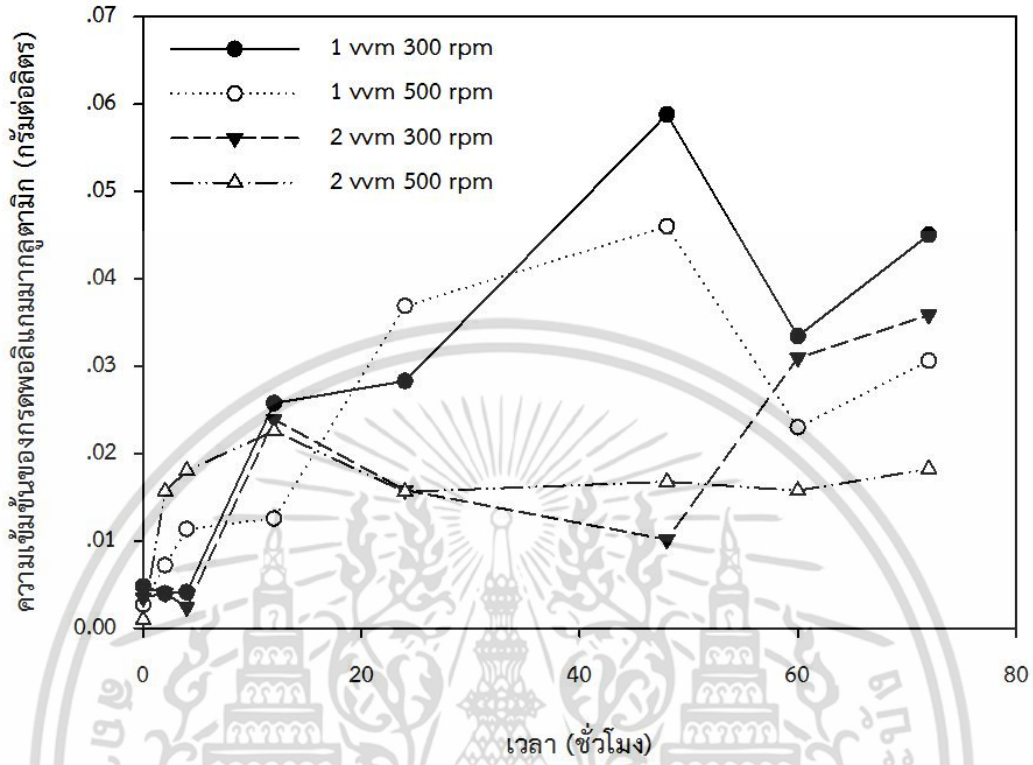
ผลการทดลองจากข้อ 4.3.2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Giavasis และคณะ (2006) ที่กล่าวไว้ว่าภายใต้สภาวะที่มีอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนสูงมากจะมีการลดลงของพอลิเมอร์ชีวภาพ เช่น Gellan gum นอกจากนี้ Techapun และคณะ (2003) ทำการวิจัยพบว่าเมื่อให้อากาศเป็น 1 vvm จะทำให้การผลิตเอนไซม์ ไซลาเนสเพิ่มขึ้น แต่ถ้าเพิ่มจาก 1 เป็น 2 vvm จะผลิตเอนไซม์ได้ลดลง อัตราการกวนก็เช่นกัน ถ้าเพิ่มระดับจนถึง 150 รอบต่อนาที จะทำให้ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด แต่ถ้าเพิ่มระดับการกวนมากกว่านั้นการผลิตเอนไซม์จะลดลง เช่นเดียวกับงานของ Palma และคณะ (1996) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนของใบพัดจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสลดลง เนื่องจากผลของแรงเฉือนของใบพัดทำลายเซลล์ทำให้อัตราการผลิตเอนไซม์ลดลงไปด้วย และจากการให้อากาศปริมาตรสูงขึ้นจะทำให้ออกซิเจนไปยับยั้งการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญของเซลล์ แต่ยังไม่พบการศึกษาที่มีการลดลงของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกภายใต้สภาวะดังกล่าว

ในขณะที่งานวิจัยของ Bajaj และ Singhal (2011) ที่ได้ทำการศึกษาผลของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนของใบพัดสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกในกระบวนการหมักแบบกะ โดยเชื้อ *B. licheniformis* NCIM 2324 พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการกวนจาก 250 เป็น 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศจาก 1 เป็น 3 vvm และการผลิตกรดพอลิ-แกมมากลูตามิกจะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เมื่ออัตราการให้อากาศและอัตราการกวนเพิ่มขึ้นถึงระดับที่เหมาะสม แต่ถ้าเพิ่มอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนมากเกินไปก็จะทำให้การผลิตกรดพอลิ-แกมมากลูตามิกลดลงได้ โดยจะมีการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงที่สุด 46.34 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการให้อากาศ 1 vmm และอัตราการกวน 750 รอบต่อนาที แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 1000 รอบต่อนาที และเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 3 vvm จะได้กรดพอลิแกมมากลูตามิกเท่ากับ 22.28 และ 25.93 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในงานวิจัยที่ได้ศึกษาเป็นช่วงของการให้อากาศและการกวนในช่วงนึงเท่านั้น ซึ่งสำหรับเชื้อ *B. megaterium* SRU02 อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนที่เหมาะสมอาจจะอยู่ในช่วงที่ค่าต่ำกว่านี้ก็ได้ จากการทดลองจะเห็นว่าเมื่อเพิ่มอากาศจาก 1 เป็น 2 vvm จะทำให้จำนวนของเชื้อลดลง Cromwick และคณะ (1996) ศึกษาผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยเชื้อ *B. licheniformis* ATCC 9945A ที่สภาวะการเพิ่มอัตราการกวน จาก 250 เป็น 800 รอบต่อนาที และเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0.5 เป็น 2.0 ลิตรต่อนาที จะเพิ่มผลได้การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจาก 6.3 เป็น 23 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการเจริญของมวลชีวภาพและการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนที่สูงขึ้นกว่านี้จะช่วยเสริมการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* NCIM 2324 แต่ไม่ช่วยเพิ่มการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก Silva และคณะ (2014) ได้ศึกษาลักษณะของเชื้อ *B. subtilis* BL-53 สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ โดยที่สภาวะอัตราการให้อากาศ 2 vvm และการกวนที่ 1000 รอบต่อนาที จะมีอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุดของกรดพอลิแกมมากลูตามิก 0.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่า *B. licheniformis* ATCC 9945A ที่มีการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะเท่ากับ 0.113 ต่อชั่วโมง (Cromwick และคณะ, 1996) และ *B. licheniformis* NCIM 2324 ที่มีการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด 0.17 g PGA/ g biomass/ h (Bajaj และ Singhal, 2010) และ Silva และคณะ (2014) ยังพบว่า *B. subtilis* BL-53 เมื่อเพิ่มอัตราการกวนให้แก่อาหารเลี้ยงเชื้อ จะเพิ่มค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล ($k_L a$) ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

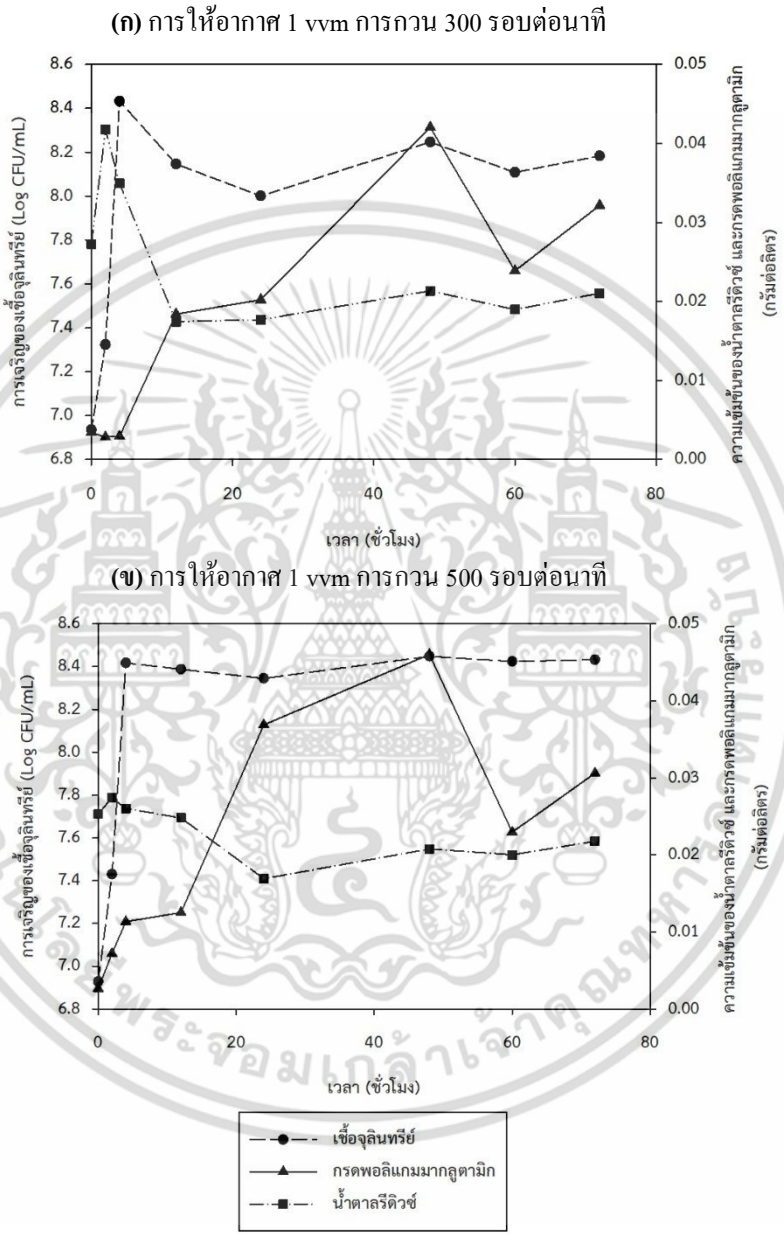



**ภาพที่ 4.6** การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ในระบบถังหมัก ที่มีอัตราการให้อากาศ 1 และ 2 vvm และอัตราการกวนของใบพัด 300 และ 500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบจากภาพที่ 4.7 ที่อัตราการให้อากาศที่ 1 vvm ทั้งการกวน 300 รอบต่อนาที (ก) และการกวน 500 รอบต่อนาที (ข) จะเห็นว่าแนวโน้มของการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไปในทางทิศเดียวกัน คือ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นสูงสุดภายในชั่วโมงที่ 4 และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง ในช่วงเดียวกันปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกก็จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 แล้วถูกใช้ไปเป็นแหล่งไนโตรเจนเหมือนกันที่ชั่วโมงที่ 60 แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 2 vvm ที่การกวน 300 รอบต่อนาที (ค) ในช่วงแรกจะมีการเจริญของเชื้อสูงสุดในชั่วโมงที่ 4 แล้วหลังจากนั้นเชื้อลดลงช่วงนึง แต่การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกยังเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 12 แล้วปริมาณของกรดพอลิแกมมากลูตามิกจะลดลงอาจเพราะเชื้อสามารถกลับมาเจริญได้อีกครั้งจึงใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน และเมื่อเพิ่มการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที ภาพที่ 4.7 (ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

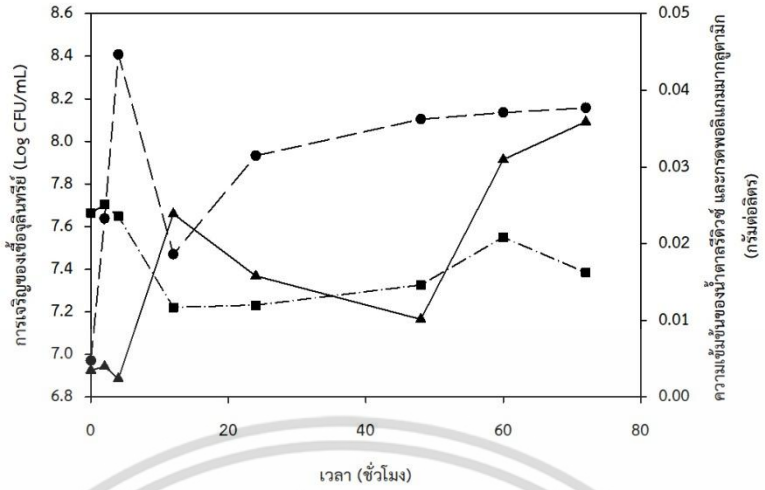
แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการเจริญพร้อมกับย่อยแป้ง ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นในช่วงแรกด้วย จากนั้นปริมาณเชื้อจะเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 24 และทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น เนื่องจากไม่ถูกนำไปใช้ และปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกก็ไม่เพิ่มเช่นกัน



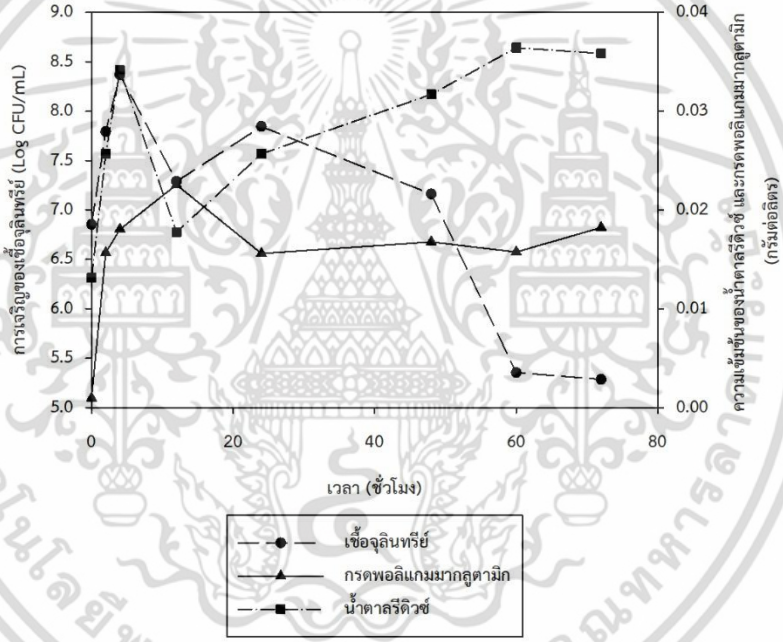

**ภาพที่ 4.7** ผลของการให้อากาศและการกวนต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ที่มีสภาวะอัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที (ก), อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที (ข), อัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที (ค) และอัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที (ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**(ค)** การให้อากาศ 2 vvm การกวน 300 รอบต่อนาที




**(ง)** การให้อากาศ 2 vvm การกวน 500 รอบต่อนาที



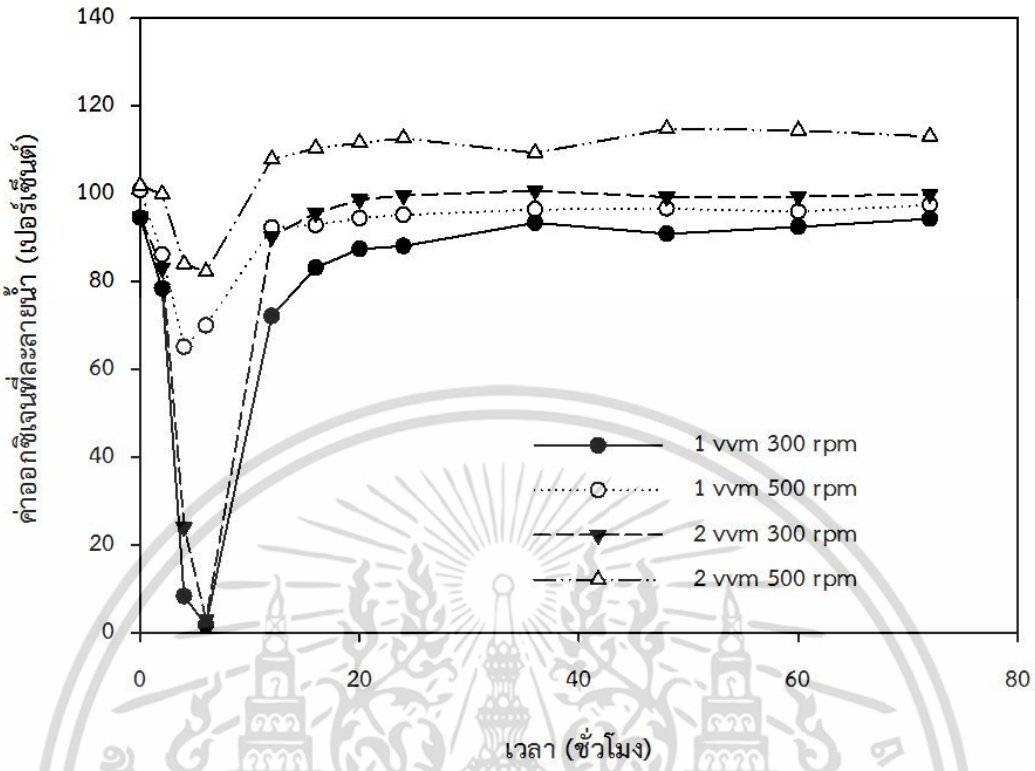

**(ต่อ) ภาพที่ 4.7** ผลของการให้อากาศและการกวนต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ที่มีสภาวะอัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที (ก), อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที (ข), อัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที (ค) และอัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที (ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.3.3 การใช้ออกซิเจน**

ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในน้ำในภาพที่ 4.8 ที่เก็บผลได้ในระหว่างทำการหมักเพื่อผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก จะเห็นได้ว่าที่สภาวะอัตราการกวนความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่การให้อากาศปริมาตร 1 และ 2 vvm จะมีความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายได้ลดลงภายในชั่วโมงที่ 6 อย่างรวดเร็วจนถึง 1.75 และ 2.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในที่สภาวะอัตราการกวนความเร็ว 500 รอบต่อนาที จะมีการลดลงของความเข้มข้นออกซิเจนในน้ำเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นถึงความต้องการอากาศของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ว่าปริมาณออกซิเจนที่อยู่ในน้ำถูกเชื้อจุลินทรีย์ใช้ไปน้อยกว่า เมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายน้ำลดลงจะสังเกตได้ว่าเป็นช่วงเวลาเดียวกันกับการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นกรดพอลิแกมมากลูตามิก ที่ชั่วโมง 4-6 แสดงว่าการถ่ายเทออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลโดยตรงกับเชื้อ จากความต้องการออกซิเจนของเชื้อหรืออัตราการใช้ออกซิเจน (Oxygen uptake rate, OUR) ดังตารางที่ 4.3 ที่ 2-6 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศทั้ง 1 และ 2 vvm จะมีค่าสูงสุดคือ 23 และ 25.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยทั่วไปอัตราการใช้ออกซิเจนของแบคทีเรียจะมีค่าเพิ่มขึ้นในช่วงระยะเพิ่มจำนวนทวีคูณ เนื่องจากเซลล์ต้องการใช้ออกซิเจนเพื่อเจริญเพิ่มจำนวน และระยะต่อมาจะมีค่าอัตราการใช้ออกซิเจนน้อยลงเนื่องจากกิจกรรมเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะคงที่ (Garcia-Ochoa และคณะ, 2010) เมื่อดูค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล ($k_La$) ดังในตาราง 4.3 เปรียบเทียบการกวนที่ 300 และ 500 รอบต่อนาที จะเห็นว่าที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที จะมีการถ่ายเทมวลที่ดีกว่า และที่ให้อากาศ 1 vvm การกวน 300 รอบต่อนาทีจะให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสูงที่สุด 8.19 ต่อชั่วโมง Silva และคณะ (2014) รายงานไว้ในงานวิจัยของเขาว่าที่การหมัก 3 ชั่วโมงของเชื้อ *B. subtilis* BL-53 เพื่อผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก เมื่อทำการเพิ่มอัตราการกวนจาก 500 เป็น 1000 รอบต่อนาที ที่อัตราการให้อากาศปริมาตร 2 vvm จะทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลเพิ่มเป็น 4 เท่า จาก 55 เป็น 210 ต่อชั่วโมง และเมื่อค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสูงขึ้นจะยิ่งทำให้การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงตาม และ Bandaiphet และ Prasertsan (2006) ยังสนับสนุนอีกว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนจาก 500 เป็น 1200 รอบต่อนาที มีผลต่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ โดย *Enterobacter cloacae* WD7 จะสามารถช่วยเพิ่มค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลได้ถึง 9 เท่า แต่การเพิ่มอัตราการให้อากาศจะส่งผลเพียงเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.8** ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำของเชื้อ *B. megaterium* SRU02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ในระบบถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1 และ 2 vvm และอัตราการกวนของใบพัด 300 และ 500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** ตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกในกระบวนการหมักแบบกะจากอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *B. megaterium* SRU02

| อัตราการให้อากาศและการกวนของใบพัด | อัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) (ต่อชั่วโมง) | อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) (ต่อชั่วโมง) | ค่าผลได้ของเซลล์ ($Y_{X/S}$) (Log CFU/ g glucose) | ค่าผลได้ของกรดพอลิแกมมากลูตามิก ($Y_{P/S}$) (g PGA/ g glucose) | อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Productivity) (g/ Log CFU/ h) | ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล ($k_La$) (ต่อชั่วโมง) | ค่าอัตราการใช้ออกซิเจน (Oxygen Uptake Rate, OUR) (เปอร์เซ็นต์) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 vvm 300 รอบต่อนาที | 1.3901±0.402 [a] | 0.0359±0.007 [a] | $1.25\times10^{5}\pm3.00\times10^{4}$ [a] | 0.5455±0.307 [a] | $7.38\times10^{-8}$ [a] | 8.1900±0.332 [a] | 23±0.460 [a] |
| 1 vvm 500 รอบต่อนาที | 1.2599±0.393 [a] | 0.0283±0.012 [a] | $1.21\times10^{5}\pm4.24\times10^{4}$ [a] | 0.4340±0.149 [a] | $5.13\times10^{-8}$ [b] | 2.3390±0.203 [b] | 8.3875±5.073 [b] |
| 2 vvm 300 รอบต่อนาที | 1.0901±0.444 [a] | 0.0275±0.005 [a] | $1.28\times10^{5}\pm3.79\times10^{4}$ [a] | 0.9719±0.088 [a] | $5.75\times10^{-8}$ [b] | 6.1650±1.619 [a] | 25.4625±1.962 [a] |
| 2 vvm 500 รอบต่อนาที | 1.1164±0.057 [a] | 0.0260±0.000 [a] | $7.53\times10^{4}\pm3.61\times10^{3}$ [a] | 0.7136±0.743 [a] | $4.00\times10^{-8}$ [c] | 1.3052±0.169 [b] | 7.2625±0.407 [b] |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างของค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อความมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$) และค่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะตรวจวัดที่ชั่วโมง 0-6

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของกรดแอลกลูตามิกต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU02 โดยการเลี้ยง *B. megaterium* SRU02 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ที่มีกรดแอลกลูตามิกและไม่มีกรดแอลกลูตามิก พบว่ากรดแอลกลูตามิกที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ไม่ได้ส่งผลต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกให้มากขึ้น จากผลการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ที่ไม่มีกรดแอลกลูตามิกจะผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้มากกว่า จึงแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. megaterium* SRU02 เป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการกรดแอลกลูตามิกในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

จากการศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของ *B. megaterium* SRU02 พบว่าแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุด เพราะอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) เป็น 0.1081 ต่อชั่วโมง มีค่าผลได้ของกรดพอลิแกมมากลูตามิก ($Y_{P/S}$) 0.3350 g PGA/g glucose และมีค่าอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Productivity) สูงที่สุด $5.78\times10^{-8}$ g/Log CFU/h จึงเลือกแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ไปขยายระดับการหมักในถังหมัก

เมื่อได้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมคือ 40 กรัมต่อลิตร แล้วศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกด้วยเชื้อ *B. megaterium* SRU02 โดยกระบวนการหมักแบบกะ ในถังหมักขนาด 7 ลิตร ที่มีปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร พบว่าที่สภาวะอัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมแก่การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกมากที่สุด ซึ่งสามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้สูงที่สุดคือ 0.0589 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Productivity) สูงที่สุด $7.37\times10^{-8}$ g/Log CFU/h และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล ($k_La$) สูงสุดถึง 8.19 ต่อชั่วโมง ยังมีอัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{max}$) ถึง 1.3901 และ 0.0359 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1. ศึกษาสภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกด้วยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2.2. ควรศึกษาอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนที่มีช่วงกว้างมากขึ้น

5.2.3. ในการศึกษาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความหนืด เช่น แป้งมันสำปะหลัง ควรมีการตรวจวัดความหนืดร่วมด้วย เนื่องจากอาหารที่มีความหนืดจะเป็นข้อจำกัดของการถ่ายเทออกซิเจนในกระบวนการหมักที่ใช้อากาศ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บรรณานุกรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546. เทคโนโลยีของแป้ง. หน้า 1-12. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณัฐวุฒิ คงกล่อม, ชนิกา ชื่นแสงจันทร์ และสาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2556. วิถีการสังเคราะห์แกมมา-พอลิกลูตามิกแอสิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ Bacilli. หน้า 9. ในสรรสาระเทคโนโลยีชีวภาพ ปีที่3. กรุงเทพฯ: ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการหมัก

นวลฉวี เวชประสิทธิ์. 2556. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

นับเชื้อด้วย วิธีการspread plate. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetworksolution .com /wiki/word/4006/spread-plate-technique. 2 มิถุนายน 2561.

วรนารถ จงเลิศจรรยา. 2554. วิศวกรรมเคมีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: อำนวยเวบพริ้นติ้ง.

สุขใจ ชูจันทร์. 2557. พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร. 2559. หลักการเบื้องต้นของเทคโนโลยีกระบวนการผลิตทางชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพัฒน์ ชมใจ และรสมันต์ จงเจริญ. 2551. อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *Alcaligenes latus* ATCC 29714. ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ กรุงเทพฯ.

องค์ประกอบหัวมันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.tapiocathai.org/D.html. 25 เมษายน 2561.

Asaoka, M., Blanshard, J. M. V. and Rickard, J. E. 1991. Seasonal Effects on the Physico-chemical Properties of Starch from Four Cultivars of Cassava. Wiley VCH. 43(12): 455-459.

Ashiuchi, M. and Misono, H. 2002. Biochemistry and molecular genetics of poly-γ-glutamate synthesis. Applied Microbiology and Biotechnology. 59: 9-14.

Ashiuchi, M., Fukushima, K., Oya, H., Hiraoki, T., Shibatani, S., Oka, N., Nishimura, H., Hakuba, H. Nakamori, M. and Kitagawa, M. 2013. Development of Antimicrobial Thermoplastic Material from Archaeal Poly-γ-L-Glutamate and Its Nanofabrication. ACS Applied Materials & Interfaces. 5(5): 1619-1624.

Bajaj, I. and Singhal, R. 2011. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial Interest. Bioresource Technology. 102(10): 5551–5561.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bajpai, P. and Bajpai, P.K. 1989. High-temperature alkaline alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. Biotechnology and Bioengineering. 33(1): 72-78.

Bandaiphet, C. and Prasertsan, P. 2006. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, $k_L$a in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. Carbohydrate Polymers. 66(2): 216-228.

Bhat, A. R., Irorere, V. U., Bartlett, T., Hill, D., Kedia, G., Morris, M. R., Charalampopoulos, D. and Radecka, I. 2013. *Bacillus subtilis* natto: a non-toxic source of poly-γ-glutamic acid that could be used as a cryoprotectant for probiotic bacteria. AMB Express. 3: 36-44.

Bhattacharryya, D., Hestekin, J. A., Brushaber, P., Cullen, L., Bachas, L. G. and Sikdar, S. K. 1998. Novel poly- glutamic acid functionalized microfiltration membranes for sorption of heavy metals at high capacity. Journal of Membrane Science. 141: 121-135.

Bunk, B., Schulz, A., Stammen, S., Münch, R. Warren, M. J., Rohde, M., Jahn, D. and Biedendieck, R. 2010. A short story about a big magic bug. Bioengineered Bugs. 1(2): 85–91.

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. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 41: 1375-1382.

Célia, M. L., Franco, M. S., Ciacco, C. F. and Tavares, D. Q. 1988. Studies on the Susceptibility of Granular Cassava and Corn Starches to Enzymatic Attack. Part 2: Study of the Granular Structure of Starch. Wiley VCH. 40(1): 29-32.

Choi, H. J. and Kunioka, M. 1995. Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by γ-irradiation from microbial poly-γ-glutamic acid. Radiation Physics and Chemistry. 46(2): 175-179.

Choi, H. J., Yang, R., Kunioka, M., 1995. Synthesis and characterization of pH-sensitive and biodegradable hydarogels prepared by γ-irradiation using microbial poly(γ-glutamic acid) and poly(ε-lysine). Journal of Applied Polymer Science. 58: 807-814.

Cromwick, A. M., Birrer, G. A., Gross, R. A., 1996. Effects of pH and aeration on γ-poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. Biotechnology and Bioengineering. 50: 222–227.

Daninippon Parmaceutical Co, Ltd., 1972. Ice cream stabilizer, Japan Patent 19735/72.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Davies, T., Miller, D. C. and Procter, A. A. 1980. Inclusion Complexes of Free Fatty Acids with Amylose. Starch. 32(5): 149-1583.

De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H. and Whitman, W. B. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Springer.

Defloor, I., Dehing, I. and Delcour, J. A. 1998. Physico-Chemical Properties of Cassava Starch. Starch. 50(2-3): 58-64.

Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E. and Merchuk, J. C. 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. Biochemical Engineering Journal. 49: 289-307.

Giavasis, I., Harvey, L. M. and McNeil, B. 2006. The effect of agitation and aeration on the synthesis and molecular weight of gellan in batch cultures of Sphingomonas paucimobilis. Enzyme and Microbial Technology. 38: 101-108.

Gomes, E., Souza, S.R., Grandi, R. P., Silva, R. D. 2005. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* A1.1 and *Thermomyces Lanuginosus* A 13.37. Brazilian Journal of Microbiology. 36: 75-82.

Goto, A. and Kunioka, M. 1992. Biosynthesis and Hydrolysis of Poly(γ-glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IF03335. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 56(7): 1031-1035.

Hajdu, I., Bodnár, M., Csikós, Z., Wei, S., Daróczi, L., Kovács, B., Györi, Z., Tamás, J. and Borbérly, J. 2012. Combined nano - membrane technology for removal of lead ions. Journal of Membrane Science. 409-410: 44-53.

Holmes, F. A., Kudelka, A. P., Kavanagh, J. J., Huber, M. H., Ajani, J. A. and Valero, V. 1995. Current status of clinical trials with Paclitaxol and docetaxel ACS Symposium Series. 583: 31-57.

ITO, Y., Tanaka, T., Ohmachi, T. and Asada, Y. 1996. Glutamic Acid Independent Production of Poly(y-glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 60(8): 1239-1242.

Ivánovics, G. and Bruckner, V. 1937. Chemische und immunologische Studien über den Mechanismus der Milzbrandinfektion und Immunität; die chemische Struktur der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus und der serologisch identischen spezifischen Substanz des *Bacillus mesentericus*. Z Immunitätsforsch. 90: 304-318.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ju, W. T., Song, Y. S., Jung, W. J. and Park, R. D. 2014. Enhanced production of poly-γ-glutamic acid by a newlyisolated *Bacillus subtilis*. Biotechnology Letters. 36: 2319-2324.

Kambourova, M., Tangney, M. and Priest, F. G. 2001. Regulation of Polyglutamic Acid Synthesis by Glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. Applied and environmental microbiology. 67(2): 1004-1007.

Kawabata, A., Takase, N., Miyoshi, E., Sawayama, S., Kimura, T. and Kudo, K. 1994. Microscopic Observation and X-Ray Diffractometry of Heat/Moisture-Treated Starch Granules. Starch. 46(12): 463-469.

Kongklom, N., Chuensangjun, Ch., Pechyen, Ch., and Sirisansaneeyakul, S. 2012. Production of Poly-γ-glutamic acid by *Bacillus licheniformis*: Synthesis and Characterization. Journal of Metals, Materials and Minerals. 22(2): 7-11.

Kongklom, N., Luo, H., Shi, Zh., Pechyen, Ch., Chisti, Y. and Sirisansaneeyakul, S. 2015. Production of poly-γ-glutamic acid by glutamic acid - independent *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 using different feeding strategies. Biochemical Engineering Journal. 100: 67-75.

Kubota, H., Matsunobu, T., Uotani, K., Takebe, H., Satoh, A., Tanaka, T. and Taniguchi, M. 1993. Production of Poly(γ-glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 57(7): 1212-1213.

Kumar, R. and Pal, P. 2015. Fermentative production of poly (γ-glutamic acid) from renewable carbon source and downstream purification through a continuous membrane-integrated hybrid process. Bioresource Technology. 177: 141-148.

Kumar, R., Vikramachakravarthi, D. and Pal, P. 2014. Production and purification of glutamic acid: A critical review towards process intensification. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 81: 59-71.

Kunioka, M. 1993. Properties of hydrogels prepared by γ -irradiation in microbial poly(γ-glutamic acid) aqueous solutions. Japanese Journal of Polymer Science and Technology. 50(10): 755-760.

Li, C., Yu, D.F., Newman, A., Cabral, F., Stephens, C., Hunter, N., Milas, L., Wallace, S., 1998. Complete regression of well-established tumors using novel water-soluble poly(γ -glutamic acid) paclitaxel conjugate. Cancer Research. 58: 2404-2409.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lim, S. M., Kim, J., Shim, J. Y., Imm, B. Y., Sung, M. H. and Imm, J. Y. 2012. Effect of Poly-γ-glutamic Acids (PGA) on Oil Uptake and Sensory Quality in Doughnuts. Food Science and Biotechnology. 21: 247-252.

Liu, J., He, D., Li, X. Zh., Gao, Sh., Wu, H., Liu, W., Gao, X. and Zhou, T. 2010. γ-Polyglutamic acid (γ-PGA) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* C06 promoting its colonization on fruit surface. International Journal of Food Microbiology. 142(1-2): 190–197.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31(3): 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(glutamic acid)s. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46(3): 891-895.

Moraes, L. P., Alegre, R. M. and Brito, P. N. 2012. Optimisation of Poly (γ-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.

Morgan, N. K. and Choct, M. 2016. Cassava: Nutrient composition and nutritive value in poultry diets. Animal Nutrition. 2(4): 253-261.

Morikawa, M., Ito, M. and Imanaka, T. 1992. Isolation of a new surfactin producer Bacillus pumilus A-1 and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1. Journal of Fermentation and Bioengineering. 74(5): 255-261.

Najar, I. N. and Das, S. 2015. Poly-glutamic acid (PGA) - Structure, Synthesis, Genomic organization and its application: A review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 6(6): 2258-2280.

Ogunleye, A., Bhat, A., Irorere, V. U., Hill, D., Williams, C. and Radecka, I. 2015. Poly-γ-glutamic acid: production, properties and applications. Microbiology. 161: 1-17.

Palma, M. B., Milagres, A. M. F., Prata, A. M. R. and De-Mancilha, I. M. 1996. Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from Penicillium janthinellum. Process Biochemistry. 31(2): 141-145.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peng, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., Miao, M. and Hua, Y. 2015. High-level production of poly(γ-glutamic acid) by a newly isolated glutamate-independent strain, *Bacillus methylotrophicus*. Process Biochemistry. 50(3): 329-335.

Promthong, S., Kanto, U., TIrawattanawanich, C., Tongyai, S., Isariyodom, S., Markvichitr, K. and Engkagul, A. 2005. Comparison of nutrient compositions and carbohydrate fractions of corn, cassava chip and cassava pellet ingredients: animals. In: Proceedings of 43rd Kasetsart University Annual Conference; p. 211-220. Thailand. Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference, Thailand.

Rickard, J. E., Asaoka, M. and Blanshard, J. M. V. 1991. The physicochemical properties of cassava starch. Tropical Science. 31: 189-207.

Rowinsky, K. E. and Donehower, R. C. 1995. Paclitaxel (Taxol). The New England Journal of Medicine. 332: 1004-1014.

Sakai, K., Sonoda, C., Murase, K., 2000. Bitterness relieving agent. Japan Patent W00021390.

Schulz, A., Frager, M., Holtkamp, L., Ronnenberg, J. and Biedendieck, R. 2014. *Bacillus megaterium* - ein Produktionssystem für rekombinante Proteine. BIOspektrum. 20(6): 650-651

Shih, I. L. And Van, Y. T. 2001. The production of poly-(γ-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. Bioresource Technology. 79(3): 207-225.

Shyu, Y. S. and Sung, W. C. 2010. Improving the emulsion stability of sponge cake by the addition of γ-Polyglutamic acid. Journal of Marine Science and Technology. 18(6): 895-900.

Silva, S. B., Cantarelli, V. V. and Ayub, M. A. 2014. Production and optimization of poly-γ-glutamic acid by Bacillus subtilis BL53 isolated from the Amazonian environment. Bioprocess and Biosystems Engineering. 37(3): 469-479.

Sung, M. H., Park, C., Kim, C. J., Poo, H., Soda, K. and Ashiuchi, M. 2005. Natural and edible biopolymer poly-γ-glutamic acid: synthesis, production, and applications. Chemical Record. 5(6): 352–366.

Tang, B., Xu, H., Xu, Z., Xu, C., Xu, Z., Lei, P., Qiu, Y., Liang, X. and Feng, X. 2015. Conversion of agroindustrial residues for high poly(γ-glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2 via solid-state fermentation. Bioresource Technology. 181: 351–354.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tanimoto, H., Sato, H., Karasawa, M., Iwasaki, K., Oshima, A. and Adachi, S., 2000. Feed composition containing poly-y-glutamic acid. Japan Patent WO9635339.

Tanimoto, H., Sato, H., Kuraishi, C., Kido, K. and Seguto, K., 1995. High absorption mineral-containing composition and foods. US patent US 5447,732.

Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M. and Sasaki, Ken. 2003. Optimization of Aeration and Agitation Rates to Improve Cellulase-Free Xylanase Production by Thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab 106 and Repeated Fed-Batch Cultivation Using Agricultural Waste. Journal of bioscience and bioengineering. 95(3): 298-301.

Tork, S. E., Aly, M. M., Alakilli, S. Y. and Al-Seeni, M. N. 2015. Purification and characterization of gamma poly glutamic acid from newly Bacillus licheniformis NRC20. International Journal of Biological Macromolecules. 74: 382–391.

Vary, P. S. 1994. Prime time for Bacillus megaterium. Microbiology. 140(5): 1001-1013.

Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W. and Jahn, D. 2007. *Bacillus megaterium*-from simple soil bacterium to industrial protein production host. Applied Microbiology and Biotechnology. 76(5): 957-967.

Xu, H., Jiang, M., Li, H., Lu, D. and Ouyang, P. 2005. Efficient production of poly(γ-glutamic acid) by newly isolated Bacillus subtilis NX-2. Process Biochemistry. 40(2): 519-523.

Yamanaka, S., 1991. New gamma-polyglutamic acid, production therefore and drinking agent containing the same. Japan Patent 3047087.

Yoshida, F., Yamane, T. and Nakamoto, K. I. 1973. Fed-batch hydrocarbon fermentations with colloidal emulsion feed. Biotechnology and Bioengineering. 15: 257-270.

Zhang, D., Feng, X., Zhou, Zh., Zhang, Y. and Xu, H. 2012. Economical production of poly (γ-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. 2012. High level exogenous glutamic acid-independent production of poly- (γ-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, Zh. 2013. A novel approach for poly-glutamic acid production using xylose and corncob fibres hydrolysate in *Bacillus subtillis* HB-1. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 89(4): 616-622.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zobel, H. F. 1988. Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review. Starch. 40(2): 44-50.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก
# การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## ก.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (Luria-Bertani broth)

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB เป็นอาหารเหลวที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยอาหารสำเร็จรูป LB จะประกอบด้วย

| | |
|---|---|
| ทริปโตน (Tryptone) | 10 กรัม |
| สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) | 5 กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 5 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 มิลลิลิตร |

เตรียมโดยชั่งอาหารสำเร็จรูป LB 25 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำปรับพีเอชให้ได้ 7.0±0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (LB agar) จะเติมผงวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสำเร็จรูป

## ก.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแข็ง PCA (Plate count agar)

อาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแข็งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปสำหรับใช้ตรวจวัดปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง โดยอาหารสำเร็จรูป PCA จะประกอบด้วย

| | |
|---|---|
| ทริปโตน (Tryptone) | 5 กรัม |
| สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) | 2.5 กรัม |
| เด็กโตรส (Dextrose) | 1 กรัม |
| วุ้น (Agar) | 15 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 มิลลิลิตร |

เตรียมโดยชั่งอาหารสำเร็จรูป PCA 23.5 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำปรับพีเอชให้ได้ 7.0±0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข
# การเตรียมสารเคมีและการคำนวณ

## ข.1 การเตรียมสารละลายไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) ความเข้มข้น 2 โมลาร์

สารละลายไฮโดรคลอริกจะมีความเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) มีความหนาแน่น 1.19 กรัมต่อมิลลิลิตร และมวลโมเลกุล 36.5 กรัมต่อโมล

จากสูตร $C = \frac{10dx}{MW}$

โดย C = ความเข้มข้น หน่วยเป็น โมลาร์

d = ความหนาแน่นของสารละลาย (density) หน่วยเป็น กรัมต่อมิลลิลิตร

x = เปอร์เซ็นต์ปริมาณเนื้อกรด

จะได้ $C = \frac{(10 \times 1.19 \times 37)}{36.5}$

$= 12.06$ โมลาร์

ดังนั้น สารละลายไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ จะมีความเข้มข้น 12.06 โมลาร์ ถ้าต้องการเตรียมสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 12.06 โมลาร์ จะทำการเจือจางความเข้มข้นดังกล่าวโดยคำนวณปริมาตรที่ต้องเจือจาง

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$12.06 \times V_1 = 2 \times 250$

$V_1 = 41.46$ มิลลิลิตร

**วิธีเตรียม**

ปิเปตสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 41.46 มิลลิลิตรแล้วเจือจางเป็น 250 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

ข้อควรระวัง : เพื่อความปลอดภัยให้เทกรดลงในน้ำ อย่าเทน้ำใส่กรดเด็ดขาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ข.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) ความเข้มข้น 2 โมลาร์**

เมื่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีความหนาแน่น 2.13 กรัมต่อมิลลิลิตร และมวลโมเลกุล 39.99 กรัมต่อโมล

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

โดย g = น้ำหนักของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ หน่วยเป็น กรัม

MW = มวลโมเลกุลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ หน่วยเป็น กรัมต่อโมล

C = ความเข้มข้นที่ต้องการ หน่วยเป็น โมลาร์

V = ปริมาตรที่ต้องการ หน่วยเป็น มิลลิลิตร

ถ้าต้องการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยต้องคำนวณน้ำหนักของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ละลาย

จะได้ $g = \frac{(2 \times 250 \times 39.99)}{1000}$

$= 20$ กรัม

**วิธีเตรียม**

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์มา 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

**ข.3 การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3, 5-Dinitrosalicylic acid, DNS)**

| | | |
|---|---|---|
| กรดไดไนโตรซาลิไซลิก | 10 | กรัมต่อลิตร |
| โซเดียมไฮดรอกไซด์ | 16 | กรัมต่อลิตร |
| โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต | 300 | กรัมต่อลิตร |

**วิธีเตรียม**

ชั่งสารกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม ลงในบีกเกอร์ ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมสารละลายด่างทีละน้อยลงไปในกรดไดไนโตรซาลิไซลิก คนให้เข้ากันนำไปอังบนอ่างควบคุมอุณหภูมิจนสารละลายใส เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรตลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม วางไว้จนสารละลายเย็นตัว ปรับในขวดปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นและเก็บสารละลายในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ข.4 การเตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$)**

เมื่อสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต มีมวลโมเลกุล 141.96 กรัมต่อโมล

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

โดย g = น้ำหนักของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ หน่วยเป็น กรัม

MW = มวลโมเลกุลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ หน่วยเป็น กรัมต่อโมล

C = ความเข้มข้นที่ต้องการ หน่วยเป็น โมลาร์

V = ปริมาตรที่ต้องการ หน่วยเป็น มิลลิลิตร

ถ้าต้องการเตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น $20 \times 10^{-3}$ โมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยต้องคำนวณน้ำหนักของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ใช้ละลาย

จะได้ $g = \frac{(20 \times 10^{-3} \times 1000 \times 141.96)}{1000}$

= 2.84 กรัม

**วิธีเตรียม**

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.84 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค
# วิธีวิเคราะห์ และการเตรียมกราฟมาตรฐาน

## ค.1 นับเชื้อด้วย วิธีการสเปรดเพลท (Spread plate)

เทคนิคการแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ที่สามารถตรวจนับปริมาณ (Microbial population count) ได้โดยมีการเจือจางเป็นลำดับส่วน (Serial dilution) จากนั้นปิเปตต์ตัวอย่างที่มีความเจือจางตามต้องการโดยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างลงบนอาหารวุ้นแข็ง และทำการเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารด้วย Sterile spreader รูปตัวแอลที่ทำจากแท่งแก้ว โคโลนี (Colony) ของจุลินทรีย์จะเจริญบนอาหารวุ้นแข็งเท่านั้น วิธีการ Spread plate นี้ง่ายและสะดวกกว่าวิธี Pour plate technique แต่ไม่เหมาะสำหรับจุลินทรีย์ที่ไวต่อออกซิเจน

**วิธีวิเคราะห์**

1. นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยเปปโตน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ประมาณ $10^{-4}$ -$10^{-6}$
2. ปิเปตต์ตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแข็ง
3. เกลี่ยตัวอย่างด้วยแท่งแก้ว Spreader รูปตัวแอล จนผิวหน้าแห้ง
4. คว่ำหน้าอาหารบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง
5. นับโคโลนีของแบคทีเรีย *B. megaterium* SRU02
6. บันทึกผล

## ค.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid method (DNS method) (Miller 1959)

เป็นวิธีใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5–500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส โดยการต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายด่างที่มีกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (3, 5-dinitrosalicylic acid) ปฏิกิริยาดังกล่าวจะทำให้สารละลายมีสีเข้มขึ้น และสามารถดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 500–550 นาโนเมตร น้ำตาลจะทำปฏิกิริยารีดักชันกับ 3, 5-dinitrosalicylic acid ได้เป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาลแดง

**วิธีวิเคราะห์**

1. นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นตามความต้องการ
2. ปิเปตต์ตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. นำสารละลายที่ได้ไปต้มน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที พร้อมวางลูกแก้วบนปากหลอดทดลองเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำสารละลายที่ต้มจนครบเวลาแล้วแช่ในน้ำเย็นทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา 5 นาที
5. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีส้ม-เหลือง
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
7. นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 0.1 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank

## ค.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคสสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายสารมาตรฐานกลูโคส 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานกลูโคสเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

**วิธีวิเคราะห์**

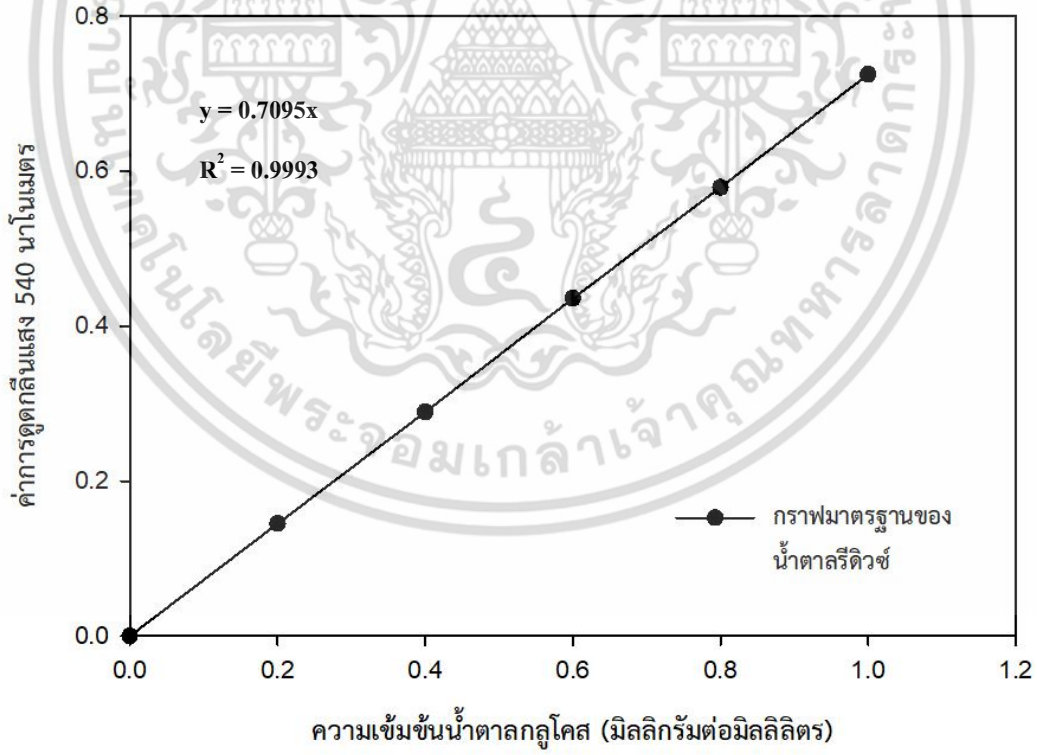
1. เจือจางสารละลายมาตรฐานกลูโคสให้มีระดับความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ปิเปตต์สารละลายที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. นำสารละลายที่ได้ไปต้มน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที พร้อมวางลูกแก้วบนปากหลอดทดลองเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย
4. นำสารละลายที่ต้มจนครบเวลาแล้วแช่ในน้ำเย็นทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา 5 นาที
5. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีส้ม-เหลือง
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค.1** การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| หลอดที่ | ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | การเจือจาง | | ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 นาโนเมตร |
|---|---|---|---|---|
| | | สารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร) | น้ำกลั่น (มิลลิลิตร) | |
| 1 | 0.2 | 0.2 | 0.8 | 0.145 |
| 2 | 0.4 | 0.4 | 0.6 | 0.293 |
| 3 | 0.6 | 0.6 | 0.4 | 0.432 |
| 4 | 0.8 | 0.8 | 0.2 | 0.570 |
| 5 | 1.0 | 1.0 | 0 | 0.700 |
| 6 | Blank | 0 | 1.0 | 0 |

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตราการเจือจาง})}{\text{ความชัน}}$$




**ภาพที่ ค.1** กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ค.4 การทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างบางส่วนทำให้บริสุทธิ์โดยเหวี่ยงเอาตะกอนแป้งมันสำปะหลังและเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ออกก่อน จึงใช้วิธีตกตะกอนกรดพอลิแกมมากลูตามิกด้วยเอทานอลบริสุทธิ์แช่เย็น ปิเปตต์เอทานอลลงในตัวอย่าง 3 เท่า แกว่งฟลาสก์ให้ตัวอย่างและเอทานอลเข้ากัน ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้กรดพอลิแกมมากลูตามิกตกตะกอนติดอยู่ก้นฟลาสก์ จากนั้นเทเอทานอลออกเหลือไว้เพียงตะกอนแล้วใส่น้ำกลับเท่าปริมาตรเดิมของตัวอย่างจะได้สารละลายที่มีลักษณะใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก

## ค.5 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยเครื่องโครมาโทกราฟี (High-performance liquid chromatography, HPLC)

การแยกสารของสารผสมให้บริสุทธิ์ขึ้น วิธีการแยกสารที่นิยมใช้แพร่หลายมาก คือ วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง วิธีนี้สามารถแยกสารที่ผสมกันอยู่โดยอาศัยหลักการคือ สารต่างชนิดกันจะกระจายตัวได้ไม่เท่ากัน สารของเหลวเคลื่อนที่ด้วยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลาย ด้วยแรงดันพาสารต่าง ๆ ในสารตัวอย่างผ่านไปบนเฟสนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ ซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปร่าง ประจุ ความจำเพาะ (specificity) การดูดซับ (adsorption) การละลาย (solubility) ดังนั้นความแตกต่างกันของแรงหน่วง จึงทำให้โมเลกุลของสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ซึ่งบรรจุเฟสนิ่ง ในเวลาหน่วง (retention time) ที่แตกต่างกัน

## ค.6 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิก

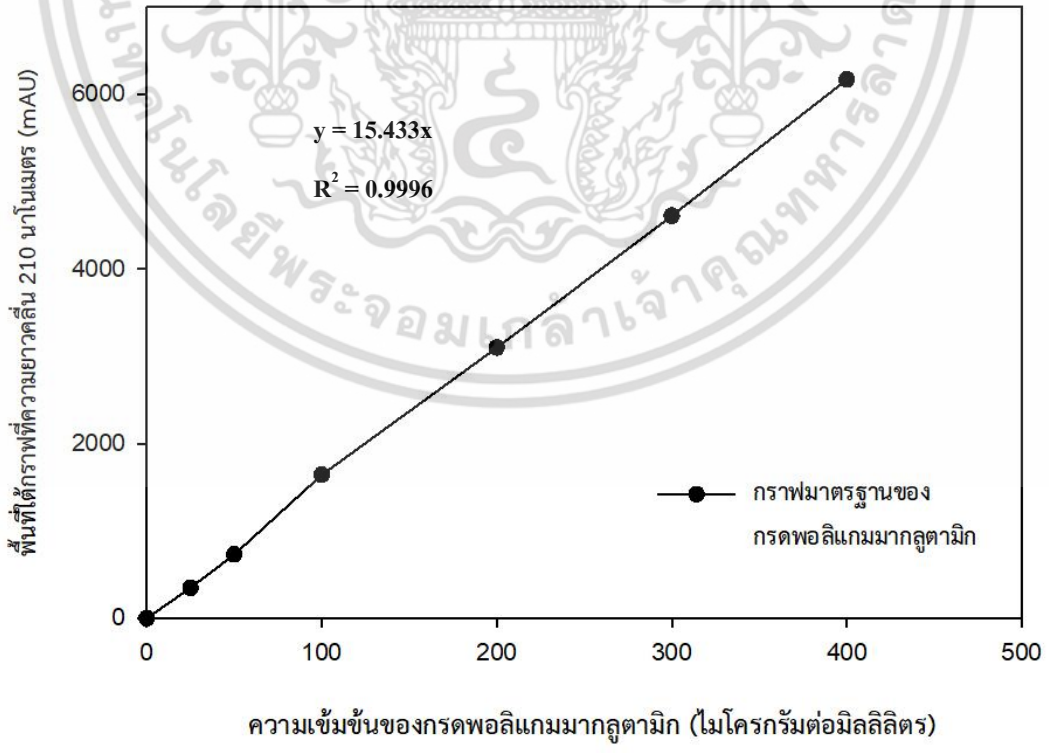
เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิกความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายสารมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิก 0.02 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์สูง (Ultrapure water) 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิกเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 25 50 100 200 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค.2** การเจือจางสารละลายมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิก และค่าพื้นที่ใต้กราฟจากเครื่องโครมาโทรกราฟีเหลวสมรรถนะสูงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| หลอดที่ | ความเข้มข้นกรดพอลิแกมมากลูตามิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | การเจือจาง | | พื้นที่ใต้กราฟจากเครื่อง HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร |
|---|---|---|---|---|
| | | สารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร) | น้ำบริสุทธิ์สูง (มิลลิลิตร) | |
| 1 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| 2 | 25 | 0.25 | 3.75 | 346.182 |
| 3 | 50 | 0.5 | 3.5 | 728.422 |
| 4 | 100 | 1 | 3 | 1641.053 |
| 5 | 200 | 2 | 2 | 3099.044 |
| 6 | 300 | 3 | 1 | 4609.380 |
| 7 | 400 | 4 | 0 | 6166.008 |

ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $\frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟ}}{\text{ความชัน}}$




**ภาพที่ ค.2** กราฟมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ประวัติผู้เขียน

| | |
|---|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นางสาว อิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงศ์ |
| วัน เดือน ปีเกิด | 9 กรกฎาคม 2537 |
| ที่อยู่ | 61/828 บงกช 14 หมู่บ้านโรยัลปาร์ควิลล์ ซอยสุวินทวงศ์ 44 ถนนสุวินทวงศ์ แขวงลำผักชี เขตหนองจอก จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10530 |
| ที่อยู่อีเมล์ | issarasauce@gmail.com |
| ประวัติการศึกษา | - ปี 2559 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง<br>- ปี 2561 จบการศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |
| ประสบการณ์การทำงาน | นักศึกษาฝึกงาน บริษัท ส.ขอนแก่น ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน) |
| การนำเสนอผลงาน | - นำเสนอโปสเตอร์ เรื่อง The Study of Poly -γ- Glutamic Acid Production from Cassava Starch by *Bacillus Megaterium* SRU02 ในงานประชุมวิชาการ Food Innovation Asia Conference ครั้งที่ 19 วันที่ 15-17 มิถุนายน 2560 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพมหานคร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้