

ผลของการเติมสารตัวกลางในวิถีเมทาบอลิซึมต่อการผลิต
กรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01

Effect of metabolic pathway intermediates on poly- γ -glutamic
acid production by *Bacillus licheniformis* SRU 01



ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

ผลของการเติมสารตัวกลางในวิถีเมทาบอลิซึมต่อการผลิต
กรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01

Effect of metabolic pathway intermediates on poly- γ -glutamic
acid production by *Bacillus licheniformis* SRU 01



T148851



เลขหมู่ 148851
ลงทะเบียน 30 พ.ย. 2559
วันเดือนปี

b. 12876628
f.

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2559



ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ผลของการเติมสารตัวกลางในวิถีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก
โดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01

Effect of metabolic pathway intermediates on poly- γ -glutamic acid
production by *Bacillus licheniformis* SRU 01

จัดทำโดย

นางสาวพรสุดา สระจิตร รหัสนักศึกษา 55080107
นางสาวศิรินทิพย์ ธงถาวรสุวรรณ รหัสนักศึกษา 55080122

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

วิรามศรี ศรีพจนารถ

12 / 7.1. / 59

ดร. วิรามศรี ศรีพจนารถ

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ผลของการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01		
ชื่อนักศึกษา	พรสุดา สระจิตร	รหัสนักศึกษา	55080107
	ศรินทิพย์ ธงถาวรสุวรรณ	รหัสนักศึกษา	55080122
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม		
พ.ศ.	2559		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. วิรามศรี ศรีพจนารถ		

บทคัดย่อ

กรดแกมมาโพลีกลูตามิกส่วนมากได้จากเชื้อการผลิตของ *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ ละลายน้ำได้ และไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมเชื้อสามารถผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกนั้นมี 2 ชนิด คือแบบที่ไม่เป็นอิสระจากกรดกลูตามิก (Glutamic acid-dependent) และแบบที่เป็นอิสระจากกรดกลูตามิก (Glutamic acid-independent) การศึกษานี้มีจุดประสงค์จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาหาชนิดของ *Bacillus licheniformis* SRU 01 และศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นในการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก จากการทดลองพบว่า *Bacillus licheniformis* SRU 01 เป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid-dependent ที่ต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก และการศึกษาหาความเข้มข้นในการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 โดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนองที่มีการวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) เพื่อศึกษาผลของปัจจัย 3 ปัจจัย คือ กรดแอลฟาดีโตกลูตาริก (X_1) แอลกลูตามีน (X_2) และกรดซिटริก (X_3) จากการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก คือ แอลฟาดีโตกลูตาริกความเข้มข้น 1.59 มิลลิโมลาร์ กลูตามิก 0.92 มิลลิโมลาร์ และกรดซिटริก 19.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 0.171 กรัมต่อลิตร และสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง คือการใช้แอลฟาดีโตกลูตาริกความเข้มข้น 18.41 มิลลิโมลาร์ กลูตามิก 0.08 มิลลิโมลาร์ และกรดซिटริก 28.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 1.31 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ: กรดแกมมาโพลีกลูตามิก, *Bacillus licheniformis* SRU 01, วิธีพื้นผิวตอบสนอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Effect of metabolic pathway intermediates on poly- γ -glutamic acid production by <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01
Student name	Pronsuda Sarjid Student ID 55080107 Sirinthip Thongtharvonsuwan Student ID 55080122
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology
Year	2016
Advisor	Dr. Wiramsri Sripochanart

ABSTRACT

Poly- γ -glutamic acid is an extracellular biopolymer produced by *Bacillus* sp. It is water-soluble, biodegradable, non toxic to humans and environment. γ -PGA producing bacteria are classified into two groups including glutamic acid-dependent and glutamic acid-independent. This work studied the type of *Bacillus licheniformis* SRU 01 on the production of poly- γ -glutamic acid, and studied the optimum concentration of addition of L-glutamine, α -ketoglutaric acid, and citric acid on the production of poly- γ -glutamic acid. Central composite design (CCD) was used for experimental design. Three factor including α -ketoglutaric (X_1), L-glutamine (X_2) and citric acid (X_3) were investigated. The result showed that *Bacillus licheniformis* SRU 01 was a glutamic acid-dependent bacteria. The optimum condition for producing poly- γ -glutamic acid by *Bacillus licheniformis* SRU01 was α -ketoglutaric 1.59 mM, glutamine 0.92 mM and citric acid 19.41g/l. The highest concentration of poly- γ -glutamic acid was at 0.17 g/l. The optimum condition for producing cell dry weight by *Bacillus licheniformis* SRU 01 was α -ketoglutaric 18.41 mM, glutamine 0.08 mM and citric acid 28.41 g/l. The highest concentration of cell dry weight was at 1.3134 g/l.

Keywords: poly- γ -glutamic acid, *Bacillus licheniformis* SRU 01, Response surface

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการทำปัญหาพิเศษในหัวข้อเรื่อง ผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สำเร็จลงได้ด้วยดีทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ดร. วิรามศรี ศรีพจนารถ เป็นอย่างสูงที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ คอยให้คำปรึกษาแนะนำติชมต่างๆ และดูแลเอาใจใส่ รวมทั้งตรวจทานแก้ไขการทำปัญหาพิเศษนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่กรุณาเป็นคณะกรรมการ และคอยให้คำแนะนำช่วยเหลือในด้านการศึกษาเป็นอย่างดีมาตลอด

ขอขอบคุณพี่นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในระหว่างปฏิบัติงาน ทำให้การดำเนินงานสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่เป็นอย่างสูงที่ช่วยส่งเสริมด้านกำลังใจจนทำให้ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้านและให้กำลังใจตลอดมา จนทำให้ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้หากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วยและหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้คงเป็นประโยชน์แก่ผู้ศึกษาได้เป็นอย่างดี

พรสุดา สระจิตร
 ศรินทิพย์ ังถาวรสุวรรณ
 13 มิถุนายน 2559

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	IV
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญภาพ.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
2.1 Poly- γ -glutamic acid คือ.....	2
2.2 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแกลมมาโพลีกลูตามิก.....	3
2.3 วิธีการผลิตกรดแกลมมาโพลีกลูตามิก.....	3
2.4 การประยุกต์ใช้กรดแกลมมาโพลีกลูตามิก	5
2.5 การผลิตกรดแกลมมาโพลีกลูตามิก โดยกระบวนการหมัก.....	6
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	8
3.1 วัสดุดิบและสารเคมี.....	8
3.2 อุปกรณ์.....	9
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง.....	10
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	18
4.1 ศึกษาหาชนิดของ <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01 ที่ผลิตกรดแกลมมาโพลีกลูตามิก เป็นชนิด Glutamic acid-dependent หรือ Glutamic acid-independent	18
4.2 ศึกษาผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีหมักบอติซิมต่อการผลิตกรดแกลมาโพลี- กลูตามิกโดยใช้เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01	19
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....	34
บรรณานุกรม.....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก.....	37
ภาคผนวก ก. การเตรียมสารเคมีและการคำนวณ.....	38
ภาคผนวก ข. การเตรียมกราฟมาตรฐาน.....	42
ภาคผนวก ค. รูปภาพประกอบปัญหาพิเศษ.....	45
ประวัติผู้เขียน.....	47



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Leonarde และคณะ, 1958)	11
3.2 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้การทดลอง	12
3.3 ลำดับการทดลองของการออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ที่มี 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับและมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 6 ครั้ง	13
4.1 ปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกของแบคทีเรีย <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่เติมกรดแอลกลูตามิก และไม่เติมกรดแอลกลูตามิก	18
4.2 ค่าการทดลองของผลการเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01	20
4.3 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก	25
4.4 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองขอปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง	25
4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก	26
4.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง	27
ข-1 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานและค่า OD ₅₄₀ ที่กลูโคสความเข้มข้นต่างๆ	42
ข-2 การเจือจางสารละลายกรดแกมมาโพลีกลูตามิกมาตรฐานและค่า OD ₄₀₀ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	43
ข-3 การเจือจางสารละลายกรดกลูตามิกมาตรฐานและค่า OD ₃₅₆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	44

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของกรดแอมมาโพลีกลูตามิก โดยแบคทีเรีย <i>Bacillus subtilis</i>	2
2.2 วิธีการผลิตกรดแอมมาโพลีกลูตามิก โดยแบคทีเรีย <i>Bacillus</i>	4
4.1 กราฟแสดงปริมาณกรดแอมมาโพลีกลูตามิกของแบคทีเรีย <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ตัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่เติมกรดแอลกลูตามิกและไม่เติมกรดแอลกลูตามิก	19
4.2 กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณกรดแอมมาโพลีกลูตามิก	21
4.3 กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง	22
4.4 แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณกรดแอมมาโพลีกลูตามิก	22
4.5 แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง	23
4.6 แผนภูมิการกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณกรดแอมมาโพลีกลูตามิก	23
4.7 แผนภูมิการกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง	24
4.8 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณแอมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาดีโตกลูตามิกและกลูตามีน	29
4.9 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณแอมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างระหว่างแอลฟาดีโตกลูตามิกและกรดซิตริก	29
4.10 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณกรดแอมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างกรดกลูตามีนและกรดซิตริก	29
4.11 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาดีโตกลูตามิกและกลูตามีน	30
4.12 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาดีโตกลูตามิกและกรดซิตริก	31
4.13 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีนและกรดซิตริก	31
4.14 กราฟการวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการผลิตกรดแอมมาโพลีกลูตามิก	32
4.15 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการผลิตน้ำหนักรเซลล์แห้ง	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ข-1 กราฟมาตรฐานกลุโคสที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร	42
ข-2 กราฟมาตรฐานกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่ค่าการดูดกลืนแสง 400 นาโนเมตร	43
ข-3 กราฟมาตรฐานกรดกลูตามิกที่ค่าการดูดกลืนแสง 356 นาโนเมตร	44
ค-1 การเลี้ยงเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01 โดยอาหารที่ไม่มีการเติมกลูตามิก	45
ค-2 การเลี้ยงเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01 โดยอาหารที่มีการเติมกลูตามิก	45
ค-3 การเลี้ยงเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01 โดยอาหารที่มีการเติม กรดซิทริกแอลกลูตมีน และกรดแอลฟาซีโตกลูตาริก	46
ค-4 ลักษณะของตะกอนกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่เกิดขึ้น	46



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Poly- γ -glutamic acid (กรดแกมมาโพลีกลูตามิก) เป็นสารพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. และขับสารนี้ออกมานอกเซลล์ซึ่งมีลักษณะข้นและเหนียว โครงสร้างของกรดแกมมาโพลีกลูตามิกเป็นโฮโมพอลิเมอร์ของกรดกลูตามิกที่มี พันธะเอไมด์เป็นตัวเชื่อมระหว่างกรดแอลฟาอะมิโนและกรดแกมมา-คาร์บอกซิลิก ซึ่งประกอบด้วยกรดดีกลูตามิก และ กรดแอลกลูตามิก โดยพื้นฐานสำคัญที่เป็นแรงกระตุ้นให้มีการผลิตสารพอลิเมอร์ชนิดนี้ คือ สามารถย่อยสลายได้โดยชีววิธี (Biodegradable) ละลายน้ำได้และสามารถรับประทานได้จึงเป็นที่น่าสนใจเพื่อใช้พัฒนาในอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอางในการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก ของแบคทีเรีย มีความต้องการอาหารในการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก ที่แตกต่างกันหลายชนิด คือบางชนิดต้องการกรดแอลกลูตามิกในการผลิตแต่บางชนิดไม่ต้องการกรดแอลกลูตามิก

งานวิจัยนี้ต้องการที่จะศึกษาถึงผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึมเพื่อการเพิ่มผลผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้กระบวนการหมักจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาหาชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* SRU 01 ที่ผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกเป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid-dependent หรือ Glutamic acid-independent

1.2.2 เพื่อศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นในการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึม ได้แก่ กรดแอลฟาดีโตลคาร์บอริก แอลกลูตามีน และ กรดซิทริกต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกโดยใช้กระบวนการหมักจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทำให้ทราบชนิดของสารตัวกลางที่มีความสามารถที่ช่วยในการส่งเสริมการผลิตของกรดแกมมาโพลีกลูตามิก

1.3.2 เป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก

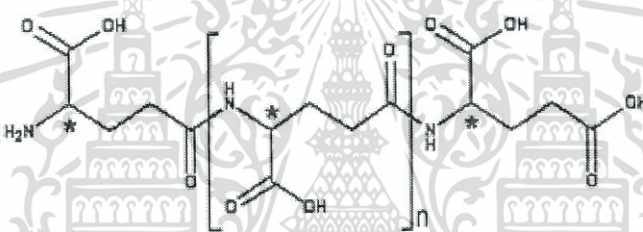
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดแกมมาโพลีกลูตามิก (Poly- γ -glutamic acid)

กรดแกมมาโพลีกลูตามิก (Poly- γ -glutamic acid, γ -PGA) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ ที่ได้รับความสนใจอย่างสูงในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถบริโภคได้ ละลายน้ำได้ และย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) โครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อยของกรดกลูตามิกชนิด ดี และ แอล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอไมด์ระหว่างกรดแอลฟาอะมิโน (Alpha-amino acid) และกรดแกมมาคาร์บอกซิลิก (Gamma-carboxylic acid) แสดงดังภาพที่ 2.1 โครงสร้างของกรดกลูตามิกโดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

ที่มา: Huei Ho และคณะ (2008)

โดยทั่วไปแล้วพบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกซึ่งเป็นสารเหนียวโดยขับออกมานอกเซลล์ในระยะ Stationary phase Ivanovics และคณะ (1937) ได้ค้นพบกรดแกมมาโพลีกลูตามิกเป็นครั้งแรกพบว่าเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่ในแคปซูลของ *B. anthracis* ซึ่งมีลักษณะเหนียวหนืดและจะปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเซลล์แก่หรือเซลล์แตกกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่พบเห็นได้ง่ายเป็นสารเหนียวที่อยู่ในถั่วเน่าญี่ปุ่น (Natto) ซึ่งเป็นถั่วเหลืองหมักของประเทศญี่ปุ่นเป็นสารผสมระหว่าง กรดโพลีกลูตามิก และ ฟรุคแทน ซึ่งถูกผลิตโดย *B. subtilis natto* Bovarnick (1942) พบว่าในการหมักโดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ของ *B. subtilis* จะสามารถปล่อยกรดแกมมาโพลีกลูตามิกออกมาได้อย่างอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า *Bacillus* หลายสายพันธุ์สามารถผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกได้โดยการปล่อยออกมานอกเซลล์ (Shih และ Van, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแกลูตามาโพลีกลูตามิก

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแกลูตามาโพลีกลูตามิก แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (Shih และ Van, 2001) คือ

2.2.1 Glutamic acid-dependent

เป็นกลุ่มที่ต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแกลูตามาโพลีกลูตามิก เช่น *B. subtilis chungkookjang* *B. licheniformis* *B. subtilis* CGMCC 0833

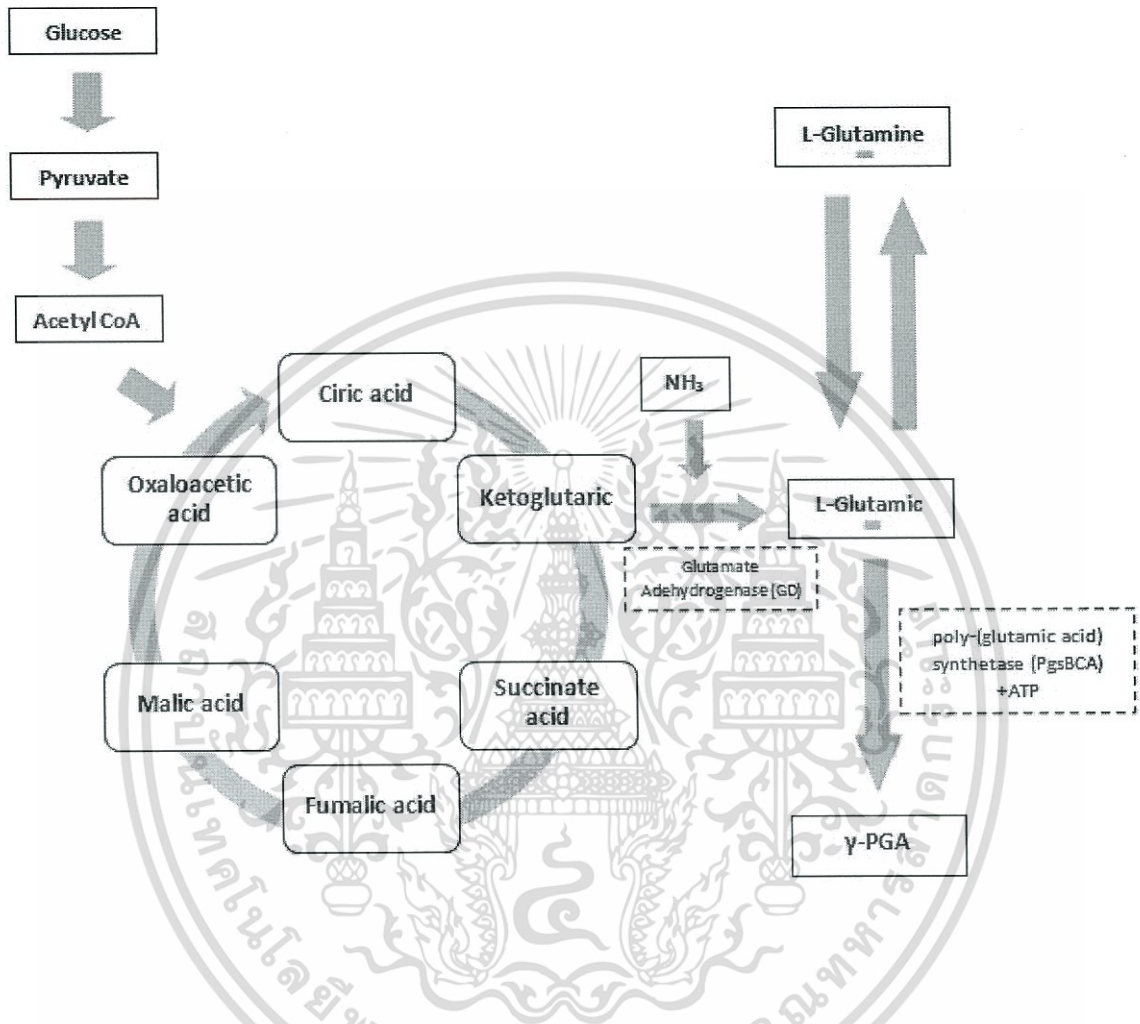
2.2.2 Glutamic acid-independent

เป็นกลุ่มที่ไม่ต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอก เช่น *B. subtilis* C1 *B. subtilis* C10 *B. amyloliquefaciens* LL3

2.3 วิธีการผลิตกรดแกลูตามาโพลีกลูตามิก

การผลิตกรดแกลูตามาโพลีกลูตามิกขั้นตอนแรกเริ่มจากการสลายกลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซิสซึ่งจะได้เป็นกรดไพรูวิก ถ้าในเซลล์มีออกซิเจน ไพรูเวตก็จะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ ซึ่งไพรูเวตจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอสिटิลโคเอนไซม์ เอ หรือ แอสिटิลโคเอ (Acetyl CoA) มารวมตัวกับออกซาโลแอสिटเตต (Oxaloacetate) ได้เป็นซิเตรต (Citrate) และโคเอนไซม์ เอ (CoA-SH) ซึ่งซิเตรตจะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นไอโซซิเตรต (Isocitrate) ซึ่งจะสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์กลายเป็นแอลฟาคีโตกลูตาเรต (α -ketoglutarate) และมีการสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์อีกตัวหนึ่งกลายเป็นซัคซินิลโคเอ (Succinyl CoA) จากนั้นก็จะมีการเปลี่ยนเป็นซัคซิเนต (Succinate) ฟูมาเลต (Fumalate) และมาเลต (Malate) ตามลำดับ (ภิญโญ และคณะ, 2558)

การเกิดกรดแกลูตามาโพลีกลูตามิกจะต้องใช้สารตัวกลางจากวัฏจักรเครบส์ คือ แอลฟาคีโตกลูตาเรต (α -ketoglutarate) ซึ่งแอลฟาคีโตกลูตาเรตจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูตามิกโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutamate dehydrogenase (GD) ร่วมกับการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และอีกกรณีหนึ่งคือการสร้างกรดแอลกลูตามิก (L-glutamic acid) จาก L-glutamine โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutamate 2-oxoglutarate (α -ketoglutarate) aminotransferase (GOGAT) เอนไซม์ Glutamine synthetase (GS) และการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ได้เป็นกรดกลูตามิกสองรูปแบบ คือ ดีและแอลกลูตามิก ซึ่งกรดแอลกลูตามิก (L-glutamic acid) ที่สร้างได้ส่วนหนึ่งจะเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็น (D-glutamic acid) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutamic acid racemase (Glr) (ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการหมัก, 2558) และกรดแอลกลูตามิก (L-glutamic acid) อีกส่วนหนึ่งจะถูกสังเคราะห์เป็นกรดแกลูตามาโพลีกลูตามิกโดยการทำงานของเอนไซม์ poly-(glutamic acid) synthetase (PgsBCA) ร่วมกับ ATP และจะปล่อยกรดแกลูตามาโพลีกลูตามิกออกสู่ภายนอกเซลล์ต่อไป (Shih และ Van, 2001)



ภาพที่ 2.2 วิธีการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยแบคทีเรีย *Bacillus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การประยุกต์ใช้กรดแกมมาโพลีกลูตามิก

เนื่องจากกรดแกมมาโพลีกลูตามิกมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ จึงมีศักยภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เช่น ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียและการผลิตน้ำดื่ม การใช้กรดแกมมาโพลีกลูตามิกในการดูดซับสารที่มีประจุ เช่น เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวเป็นอนุภาคขนาดเล็กทำให้เกิดการตกตะกอน การใช้กรดแกมมาโพลีกลูตามิกเป็นสารเพิ่มความเหนียวและสารรักษาความชื้นในผลิตภัณฑ์อาหาร สำหรับการทางการแพทย์การใช้กรดแกมมาโพลีกลูตามิกเป็นวัสดุควบคุมการปลดปล่อยตัวยาในการผลิตยาเม็ด มีการดัดแปลงโครงสร้างของกรดแกมมาโพลีกลูตามิกให้เป็นไฮโดรเจล (Hydrogel) ที่สามารถอุ้มน้ำและย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของวัสดุชีวภาพบางชนิด นอกจากนี้ยังมีการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีในการดัดแปลงโครงสร้างของกรดแกมมาโพลีกลูตามิกเพื่อเพิ่มเติมคุณสมบัติ ได้แก่ การเหนี่ยวนำหมู่คาร์บอกซิลของกรดแกมมาโพลีกลูตามิกให้เกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ทำให้ได้สารประกอบเอสเทอร์ของกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่มีคุณสมบัติเป็นพลาสติกทนร้อน หรือ Poly (Alphaglutamic acid gamma-benzyl ester) ที่แสดงคุณสมบัติ เป็นเส้นใยและแผ่นฟิล์ม (Bajaj และ Singhal, 2011)

ในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง การหลอมละลายอาหารส่งผลต่อเนื้อเยื่อและสภาพของอาหาร ถ้าไม่มีสารป้องกันการทำลายของผลึกน้ำแข็งที่ใช้ในการแช่แข็ง สารป้องกันการทำลายของผลึกน้ำแข็งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น antifreeze protein ส่วนใหญ่ผลิตจากกรดอะมิโนที่มีเกลือโซเดียมเป็นองค์ประกอบหลักของพันธะเปปไทด์ เช่น oligopeptide และกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตจาก *B. licheniformis* SRU 01 การใช้กรดแกมมาโพลีกลูตามิกเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ในการแช่แข็งอาหารจะส่งผลต่อรสชาติอาหารน้อยกว่าสารที่ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้มีงานวิจัยที่นำกรดแกมมาโพลีกลูตามิกมาใช้ในอุตสาหกรรมเบเกอรี่ ได้แก่ Yokoigawa และคณะ (2006) เติมกรดแกมมาโพลีกลูตามิกในผลิตภัณฑ์โดแช่แข็งที่หมักด้วยยีสต์ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ กรดแกมมาโพลีกลูตามิก ทำให้ค่าร้อยละของ freeze tolerance ratio ในโดแช่แข็งสูงขึ้น ในขณะที่เดียวกันกรดแกมมาโพลีกลูตามิกยังมีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์และลดการดูดซับน้ำมันในเบเกอรี่ เช่น การศึกษาของ Shyuand Sung (2010) โดยศึกษาการเติมกรดแกมมาโพลีกลูตามิกในแป้งเค้กพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแกมมาโพลีกลูตามิกส่งผลให้ความคงตัวในการขึ้นโฟมและค่าความหนืดของแป้งเค้กสูงขึ้น นอกจากนี้ Lim และคณะ (2012) ศึกษาว่าผลของการเติมกรดแกมมาโพลีกลูตามิกในโดเน้ททอดพบว่าเมื่อเติมกรดแกมมาโพลีกลูตามิกปริมาณ 1 กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักริมาณโดเน้ททอดจะทำให้ลดการดูดซับน้ำมันและทำให้มีการยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยรวมของผู้บริโภคดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโดเน้ททอดที่ไม่มีการเติมกรดแกมมาโพลีกลูตามิก

2.5 การผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยกระบวนการหมัก

Ito และคณะ (1996) ได้ศึกษาการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกจากกรดกลูตามิกอิสระ หรือ เป็นกลุ่มที่ไม่ต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอก โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TAM-4 ซึ่งแยกได้จากดิน พบว่าสามารถผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกได้ปริมาณสูงสุดที่ 22.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วย 1.8% แอมโมเนียมคลอไรด์ และ 7.5% ฟรุกโตส ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เช่ย่ ขวดด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที และเมื่อทำการศึกษาร้อยละของกรดแกมมาโพลีกลูตามิกในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 36 ชั่วโมง จนถึง 96 ชั่วโมง พบว่าอัตราส่วนระหว่างกรดกลูตามิกและกรดแอลกลูตามิกเท่ากับ 78 : 22 ตลอดระยะเวลาที่วัดแต่ปริมาณความหนืดและมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยที่อัตราส่วนระหว่าง ดีต่อแอลไม่เปลี่ยนแปลง

Bovarnick (1942) ได้ศึกษาการผลิต กรดแกมมาโพลีกลูตามิก จากกรดกลูตามิกไม่อิสระ หรือ เป็นกลุ่มที่ต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอกโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A พบว่าการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกจะได้ผลผลิตที่สูงเมื่อจุลินทรีย์เจริญแบบเช่ย่ขวดในอาหาร (กำหนดให้เป็นอาหาร C) ซึ่งประกอบด้วยกรดแอลกลูตามิก 20 กรัมต่อลิตร กรดซิทริก 12 กรัมต่อลิตรและกลีเซอรอล 80 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะนี้ผลผลิตของกรดแกมมาโพลีกลูตามิกเกินกว่า 15 กรัมต่อลิตรใน 3-4 วัน

Bajaj และSinghal (2009) ได้ศึกษาผลกระทบของการเพิ่มกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ได้แก่ อะลานีน กลูตามีน อะซิโตนิน แอดพาติก โอนิทิน โพลีน และสารตัวกลางในวัฏจักรเครบส์ ได้แก่ แอลฟาคีโต-กลูตาสิก กรดมาลิก กรดซัคซินิก และกรดไพรวูวิก เป็นสารตั้งต้นของการเผาผลาญอาหารในการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 ซึ่งการเติมแอลกลูตามีนและแอลฟาคีโต-กลูตาสิกได้ผลผลิตสูงสุดของกรดแกมมาโพลีกลูตามิกเท่ากับ 35.75 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับกรณีที่ไม่เติมสารตั้งต้นต่อมา Cesaro และ Silva (2014) ใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* BL53 ในการศึกษาเพิ่มเติมอีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 3 สูตร ได้แก่ 1. อาหารที่เติมกรดกลูตามิก 2. อาหารที่ไม่เติมกรดกลูตามิกและ 3.อาหารที่เติมแอลกลูตามีน และแอลฟาคีโตกลูตาสิกซึ่งพบว่าการเติมแอลกลูตามีนและแอลฟาคีโตกลูตาสิกเป็นสารตั้งต้น โดยศึกษา นั้นให้ผลของกรดแกมมาโพลีกลูตามิกเพิ่มขึ้น 20%

Zhang และคณะ (2012) ได้เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* C10 โดยไม่เติมกรดกลูตามิกจากภายนอก และเติมกรดออร์แกนิกได้แก่ กรดออกซาลิก กรดอะซิติค กรดซัคซินิก กรดมาลิก และกรดซิทริก ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิต โดยพบว่าการเติม กรดซิทริก มีการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกในปริมาณสูงกว่ากรดออร์แกนิกตัวอื่น ๆ ซึ่งผลได้ของ กรดแกมมาโพลีกลูตามิก เท่ากับ 28.3 กรัมต่อลิตร

Tork และคณะ (2015) ได้ศึกษาเชื้อกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่สามารถสร้าง กรดแกมมาโพลีกลูตามิก พบว่า *Bacillus licheniformis* NRC20 เป็นเชื้อที่เป็นอิสระจากกรดกลูตามิกหรือไม่จำเป็นต้องเติมกรดกลูตามิกจากภายนอกในการสร้างกรดแกมมาโพลีกลูตามิกแต่ถ้าต้องการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกให้ได้ปริมาณสูงๆซึ่งพบว่าการผลิตต้องเติมกรดกลูตามิกจากภายนอกเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนของ *Bacillus licheniformis* NRC20 จะทำให้กรดแกมมาโพลีกลูตามิกในปริมาณที่สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peng และคณะ (2015) ได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแกมมา-โพลีกลูตามิกโดยเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* ที่เป็นอิสระต่อกลูตามิก โดยการเติมแหล่งคาร์บอนหลายตัวลงไปในอาหาร เช่น โซเดียมกลูตามิก กลูโคส กลีเซอรอล แปะงละลายน้ำ แอลฟาแลคโตส มอลโตส ซูโคส กรดซิตริกและฟรุกโตส จากผลการทดลองบอกว่า การใช้แหล่งคาร์บอนเหล่านี้สนับสนุนการผลิตกรดแกมมา-โพลีกลูตามิกของเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* SK19.001 พบว่ากลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดและเป็นประโยชน์ส่งผลให้มีการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกได้ 14.00 ± 0.2 กรัมต่อลิตร

Du และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของการเติมกลีเซอรอลในการผลิตกรดโพลีแกมมาไกลูตามิก การเติมกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นร่วมกับกรดกลูตามิกและกรดซิตริกในการเพิ่มการผลิตของกรดแกมมาโพลี-กลูตามิกจากการทดลองพบว่า กลีเซอรอล กลูโคส แอลกลูตามิก และกรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้การผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A ได้ปริมาณสูงที่สุด

Bajaj และคณะ (2009) ได้ศึกษาสภาวะของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และ pH ที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 โดยเชื้อนี้เป็นเชื้อที่ขึ้นอยู่กับคาร์บอนจากการเติมกรดกลูตามิกจากภายนอก จากการทดลองกลีเซอรอลไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดแอลกลูตามิกเพื่อสร้างกรดแกมมาโพลีกลูตามิกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน 5 กรัมต่อลิตร จะเพิ่มการผลิตของกรดแกมมาโพลีกลูตามิกและลดโพลีแซคคาไรด์ และ pH ที่เหมาะสมที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก คือ 6.5

นอกจากนี้ Zeng และคณะ (2016) ศึกษาผลของการเติมโพแทสเซียมคลอไรด์ในการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกโดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* GXA-24 โดยเติมโพแทสเซียมคลอไรด์ลงไปในการที่ความเข้มข้น 0 13.4 67.1 201.2 335.3 มิลลิโมลาร์ โดยความเข้มข้นที่ 201.2 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่ทำให้การผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 22.57 ± 0.86 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของโพแทสเซียมมากกว่า 201.2 มิลลิโมลาร์ จะทำให้ได้เซลล์เจริญมากกว่าการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อที่ใช้และสารเคมี

3.1.1 เชื้อที่ใช้

Bacillus licheniformis SRU 01

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.2.1 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ (Pre-inocula)

Agar agar, Difco, U.S.A.

Tryptone, Difco, U.S.A.

Yeast extract, Difco, U.S.A.

Sodium chloride, Carlo Erba, Italy

3.1.2.2 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

Ammonium chloride, Scharlau, Barcelona

Calcium chloride, Carlo Erba, Italy

Citric acid, Univar, Australia

Dipotassium phosphate, Merck, Germany

Glucose, Univar, Australia

Glutamic acid, Himedia, India

Glutamine, Himedia, India

α -ketoglutamic, Sigma, U.S.A.

Magnesium sulfate heptahydrate, Merck, Germany

Manganese Sulfate, Carlo Erba, Italy

Potassium dihydrogen phosphate, Carlo Erba, Italy

3.1.2.3 สำหรับการวิเคราะห์ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

Dinitrosalicylic acid (DNS), Carlo Erba, Italy

Sodium hydroxide, Carlo Erba, Italy

Potassium sodium tartrate, Carlo Erba, Italy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2.4 สำหรับการวิเคราะห์ค่ากรดแกมมาโพลีกลูตามิก

Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), Calbiochem, India

Ethyl alcohol 95 %

Sodium hydroxide, Univar, Australia

Poly-L- γ -glutamic acid sodium, Sigma, U.S.A.

3.1.2.5 สำหรับการวิเคราะห์ค่ากรดกลูตามิก

Acetonitrile, Burdick&Jackson, Korae

Boric acid, Carlo Erba, Italy

Hydrochloric acid, Calbiochem, India

1-Fluoro-2, 4-dinitrobenzene (FDNB), Sogma, USA

Potassium chloride, Univar, Australia

3.2 อุปกรณ์

เครื่องชั่ง (Balance)	(Mettler Toledo, Germany)
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	(Heraeus, Germany)
ตู้อบเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	(Heraeus, Germany)
ตู้แช่แข็ง (Freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	(Sanyo, Japan)
ตู้ดูดควัน (Fume hood)	(Heraeus, Germany)
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) : ABS 1200	(BossTech, Thailand)
เครื่องเขย่าบ่มเชื้อ (Incubator shaker) : NB-205VL	
ไมโครเวฟ (Microwave) : MR-30A	(Electrolux, China)
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	(Memmert, Germany)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)	(Tommy, Japan)
ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100-1000	
และ 20-200 ไมโครลิตร	(Brand, Germany)
เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)	(Scientific Industrirs, USA)
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter)	(inolab, Germany)
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	
เครื่อง High speed Centrifuge : 3804R	(Appendrop, Germany)
เครื่องวัดดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	
หลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge tube) ขนาด 15, 50 มิลลิลิตร	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปีกเกอร์ขนาด (Beaker) 50, 250, 600 และ 1000 มิลลิลิตร
 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100, 250 และ 1000 มิลลิลิตร
 ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 10, 100, 250, 500, 1000 มิลลิลิตร
 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250, 500 มิลลิลิตร
 หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 16x150 มิลลิเมตร

แท่งแก้วคนสาร

ช้อนตักสาร

เข็มเย็บเชื้อ

โถดูดความชื้น

คิวเวต

จานเพาะเชื้อ

ถ้วยฟอยล์

ลูกแก้ว

ปากคีบ

ขวด-M

ขวด Duran

ลูกยางแดง

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหัวเชื้อ

เตรียมอาหาร LB broth และ LB agar โดยชั่ง Yeast extract 10 กรัม Tryptone 10 กรัม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5 กรัม ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้ได้ 7.0 และแบ่งออกมาทำ LB agar โดยเติม Agar เป็นร้อยละ 2 ของ LB broth นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว

3.3.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014)

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Leonarde และคณะ, 1958)

สารอาหาร	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
L-glutamic acid	20
Glucose	20
NH ₄ Cl	7
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
KH ₂ PO ₄	0.2
K ₂ HPO ₄	0.81
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.15
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.04

เตรียมโดยชั่งส่วนประกอบตามตารางที่ 3.1 ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้ได้ 7.0 โดยใช้ NaOH หรือ HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว

3.3.1.3 การเลี้ยงเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อโดยนำเชื้อจากตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงโดยการสตรีก เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 ลงในเพลทที่มีอาหาร LB agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บโคโลนีเดียว โดยเลี้ยงใน LB agar Slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 ที่เลี้ยงมาทำการเชยเชื้อ 1 ลูบ ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth และเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงหัวเชื้อจนได้ค่าความขุ่น 1.0 ± 0.1 OD ที่ 600 นาโนเมตร และเติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ E ที่ 10% โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การศึกษาหาชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* SRU01 ที่ผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก เป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid-dependent หรือ Glutamic acid-independent

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.3.1.3 ปริมาตร 10% โดยปริมาตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 แบบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่เติมกรดแอลกลูตามิกและอาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่ไม่เติมกรดแอลกลูตามิกและเติมเชื้อปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยการปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ เก็บตัวอย่างที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ

3.3.3 การศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นในการเติมสารตัวกลางในวิธีเมแทบอลิซึม ได้แก่ กรดแอลฟาดีโตกลูตาริก แอลกลูตามีน และ กรดซิทริกต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้ กระบวนการหมัก จากเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01

3.3.3.1 การทดลองเพื่อหาอิทธิพลของปัจจัยจากแบบจำลอง

การทดลองเพื่อหาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก ปริมาณน้ำหนัก เซลล์แห้ง ปริมาณกรดกลูตามิก และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และใช้การออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ที่มี 3 ปัจจัย คือ กรดแอลฟาดีโตกลูตาริก (X_1) แอลกลูตามีน (X_2) และกรดซิทริก (X_3) ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินการ ดังนี้

1. การกำหนดระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

การกำหนดระดับของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย โดยพิจารณาจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และการทดลองเบื้องต้น ซึ่งระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมี 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และ ระดับสูง (1) โดยมีค่าแอลฟา (α) เท่ากับ 1.68 ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้การทดลอง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD)

ในการทดลองเต็มสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU01 ได้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติกำหนดลำดับการทดลองและออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ที่มี 3 ปัจจัย แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 6 ครั้ง ดังนั้นจึงมีจำนวนหน่วยทดลองทั้งหมด 20 หน่วย ดังตารางที่ 3.3

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกด้วยการเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึม โดยใช้กระบวนการหมักจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU01

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.3.1.3 ปริมาตร 10% โดยปริมาตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) โดยจะมีการเติมกรดแอลฟาดีโกลูตาริก แอลกลูตามีน และกรดซิตริกเพิ่มลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่ปริมาณความเข้มข้นแตกต่างกัน จำนวน 20 ขวดตามลำดับการทดลองที่กำหนดไว้ในตารางที่ 3.3 และเติมเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ทำการเก็บตัวอย่างในเวลา 72 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ เก็บตัวอย่างที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ ต่อไป

3.3.3.2 การตรวจวิเคราะห์ค่าผลการทดลอง

1. การตรวจวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

เตรียมฟรอยด์ที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอนทำการปิเปตสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่เตรียมไว้ และนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเหวี่ยงแยกอีกครั้ง รินส่วนใสทิ้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นลงในเตลิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน คำนวณหาน้ำหนักแห้งในหน่วยกรัมต่อลิตรโดยใช้สูตร (เทพปัญญา และ วรสิทธิ์, 2553)

$$X \text{ (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดทดสอบและเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดทดสอบ (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} * 10^{-3}}$$

2. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิธี DNS

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank (เทพปัญญา และ วรสิทธิ์, 2553)

3. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก

การแยก กรดแกมมาโพลีกลูตามิก ออกจากสารละลายตัวอย่างโดยใช้เอทานอลเย็น 4 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง โดยสารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลเย็น 40 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาทำการแยกตะกอน กรดแกมมาโพลีกลูตามิก ออกจากสารละลาย โดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที รินส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนไว้แล้วเติมน้ำกลั่นใส่ลงไป 5 มิลลิลิตร นำไปตกตะกอนโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสเพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก (Chintrakool และคณะ, 2014)

ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกด้วยวิธีการ cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) โดยปิเปตส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอน กรดแกมมาโพลีกลูตามิกออกจากสารละลายตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตรผสมกับ CTAB 2 มิลลิลิตร และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นวัดความเข้มข้น กรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยการวัดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ 400 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Kongklom และคณะ, 2015)

4. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูตามิก

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

3.3.3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

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

1. การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

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

2. การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ

เป็นการวิเคราะห์ว่าการออกแบบที่ใช้การทดลองมีความเหมาะสมหรือไม่ ซึ่งในการทดลองทุกครั้งจะต้องมีความผันแปรที่อธิบายไม่ได้หรือความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ การออกแบบการทดลองที่ดีจะต้องทำให้เกิดความผันแปรที่อธิบายไม่ได้ให้น้อยที่สุดโดยที่ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้ (Hu, 1999)

$$\text{สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ} = \frac{\text{ความผันแปรที่อธิบายได้} \times 100}{\text{ความผันแปรทั้งหมด}}$$

3. การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเป็นการตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลองโดยพิจารณาจาก ค่า P-value ของเทอมต่าง ๆ ในตารางของการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ได้เปรียบเทียบกับค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด

4. การสร้างสมการทำนายปริมาณของผลการทดลอง

การสร้างสมการทำนายปริมาณของผลการทดลอง โดยนำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของผลการทดลอง มาเขียนให้อยู่ในรูปของสมการต่อไปนี้

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

5. การสร้างพื้นผิวตอบสนองของผลการทดลอง

เมื่อได้สมการสำหรับทำนายผลการทดลองแล้ว จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณผลการทดลองเทียบกับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง คือ กรดแอลฟาดีโตกลูตาริก แอลกลูตามีน และกรดซิตริกโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

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



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

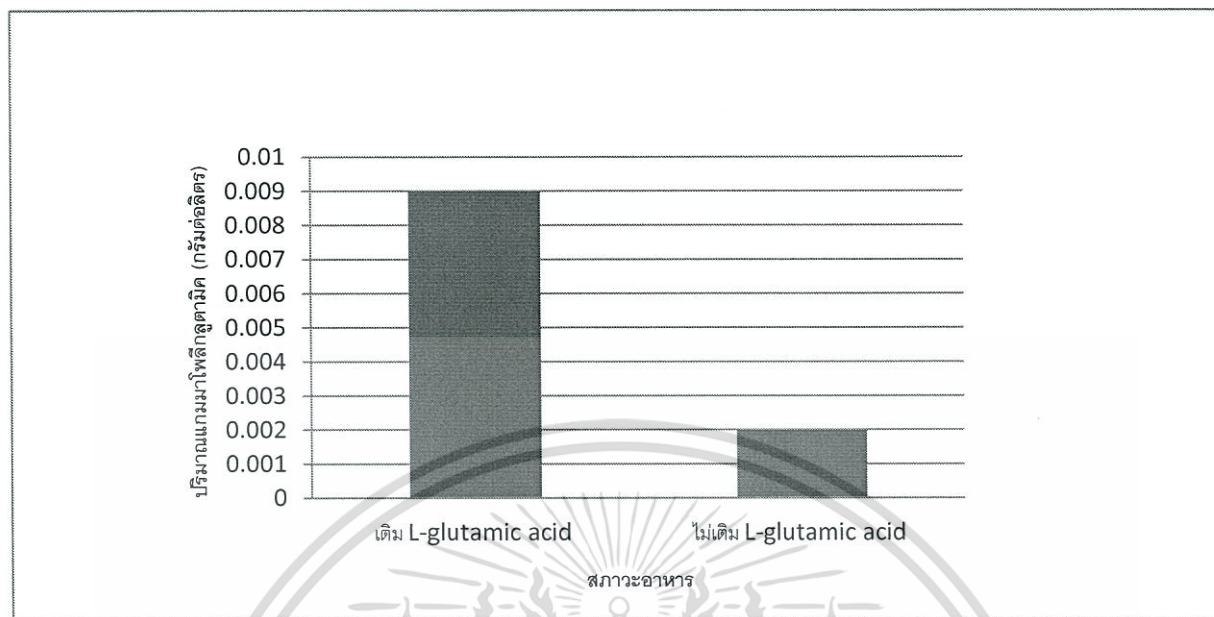
4.1 ศึกษาหาชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* SRU 01 ที่ผลิตกรดแกมมาโพลี-กลูตามิกเป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid-dependent หรือ Glutamic acid-independent

จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 แบบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่เติมกรดแอลกลูตามิกและ ที่ไม่เติมแอลกลูตามิก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมงผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1 จะพบว่า *Bacillus licheniformis* SRU 01 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดแอลกลูตามิกจะมีการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกในปริมาณมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดแอลกลูตามิกและยังพบอีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดแอลกลูตามิกจะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่น้อยกว่าที่กล่าวมาข้างต้นสามารถอ้างอิงว่า *Bacillus licheniformis* SRU 01 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแอลกลูตามิกจะทำให้มีแอลกลูตามิกที่มากขึ้นที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ กรดแกมมาโพลีกลูตามิกทำให้ได้ปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่มากกว่าในอาหารเลี้ยงที่ไม่เติมแอลกลูตามิก สรุปได้ว่า *Bacillus licheniformis* SRU 01 ที่ผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกเป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid dependent คือเป็นกลุ่มที่ต้องการกรดกลูตามิกจากแหล่งภายนอกเพิ่มเข้าไปในสารอาหารเพื่อจะช่วยให้เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 4.1 ปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* SRU 01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่เติมกรดแอลกลูตามิก และไม่เติมกรดแอลกลูตามิก

สภาวะ	กรดแกมมาโพลีกลูตามิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดกลูตามิก (กรัมต่อลิตร)
เติมกรดแอลกลูตามิก	0.009±0.00	1.193±0.06	0.793±0.03	0.246±0.00
ไม่เติมกรดแอลกลูตามิก	0.002±0.00	3.933±0.46	1.673±0.19	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงปริมาณกรดแอมมาโพลีกลูตามิกของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* SRU 01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ E ตัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ที่เติมกรดแอลกลูตามิก และไม่เติมกรดแอลกลูตามิก

4.2 ศึกษาผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแอมมาโพลีกลูตามิกโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01

4.2.1 ปริมาณของผลการทดลองการเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแอมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01

ในการทดลองเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแอมมาโพลีกลูตามิกด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* SRU01 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติกำหนดลำดับและออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ที่มี 3 ปัจจัย คือ กรดแอลฟาดีโตกลูตาริก (X_1) แอลกลูตามีน (X_2) และกรดแอลฟาดีโตกลูตาริก (X_3) โดยมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 6 ครั้ง ดังนั้นจึงมีจำนวนหน่วยทดลองทั้งหมด 20 หน่วยทดลอง เมื่อทำการทดลองผลิตกรดแอมมาโพลีกลูตามิกโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 ตามลำดับการทดลอง และสภาวะที่กำหนดไว้ผลที่ได้จากการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าการทดลองของผลการเติมสารตัวกลางในวิถีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01

ลำดับการทดลอง	ปัจจัยที่ศึกษา				
	แอลฟา-คีโตกลูตาริก (X_1) (มิลลิโมลาร์)	แอลกลูตามีน (X_2) (มิลลิโมลาร์)	กรดซिटริก (X_3) (กรัม/ลิตร)	กรดแกมมาโพลีกลูตามิก (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)
1	5	0.25	15	0.090	0.756
2	15	0.25	15	0.123	0.892
3	5	0.75	15	0.141	0.893
4	15	0.75	15	0.095	0.845
5	5	0.25	25	0.096	0.616
6	15	0.25	25	0.100	0.999
7	5	0.75	25	0.122	0.524
8	15	0.75	25	0.103	0.745
9	1.59	0.5	20	0.128	0.700
10	18.41	0.5	20	0.119	0.864
11	10	0.08	20	0.113	0.734
12	10	0.92	20	0.127	0.648
13	10	0.5	11.59	0.093	1.039
14	10	0.5	28.41	0.086	0.726
15	10	0.5	20	0.122	0.796
16	10	0.5	20	0.121	0.787
17	10	0.5	20	0.113	0.741
18	10	0.5	20	0.130	0.791
19	10	0.5	20	0.118	0.706
20	10	0.5	20	0.115	0.735

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

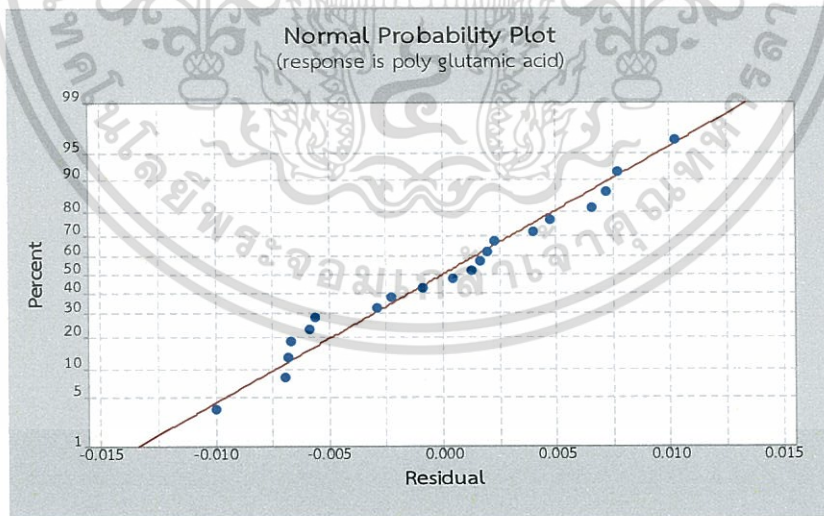
4.2.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

4.2.2.1 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

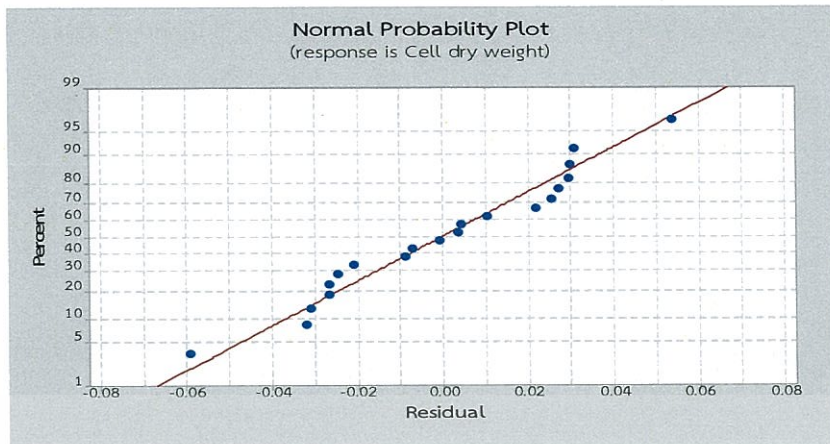
เมื่อทำการทดลองเติมสารตัวกลางในวิธีหมักบอสิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 ทั้ง 20 หน่วยทดลอง แล้วจึงนำผลการทดลองที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลว่ามีความเหมาะสมหรือไม่ด้วยการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง หากข้อมูลมีความเหมาะสมจึงนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square:R-Sq) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลมี 3 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ (2) การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล และ (3) การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน

1. การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ

การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติเป็นการตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูลว่ามีการกระจายแบบแจกแจงปกติหรือไม่ จากการพิจารณาการกระจายของค่าส่วนตกค้าง ในภาพที่ 4.2 และ 4.3 ของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก และปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีหมักบอสิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 พบว่ามีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรงทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า ส่วนตกค้างจากผลการทดลองของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก และปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีหมักบอสิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 ไม่แสดงสิ่งผิดปกติให้เห็น จึงสรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ



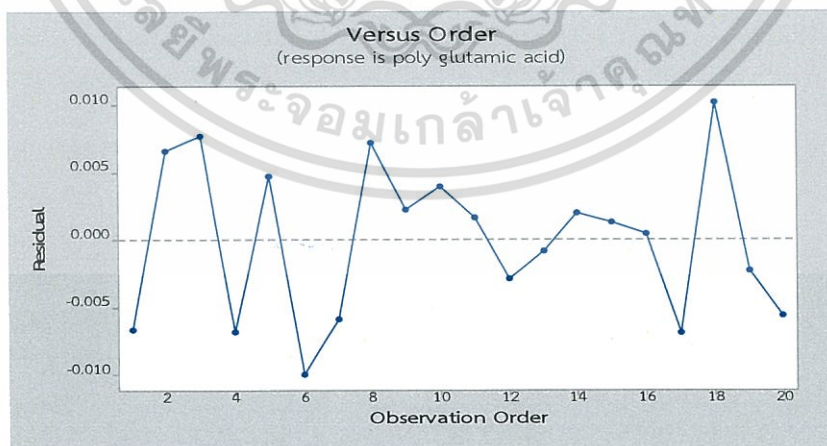
ภาพที่ 4.2 กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก



ภาพที่ 4.3 กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

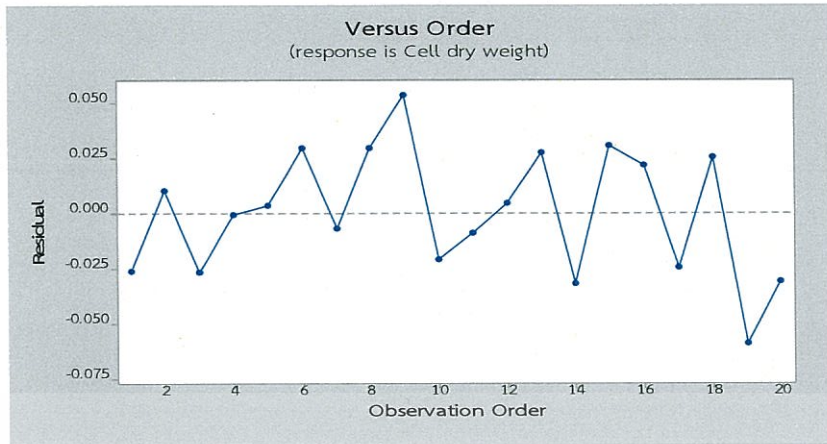
2. การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล

การตรวจสอบความเป็นอิสระของค่าส่วนตกค้างโดยใช้แผนภูมิการกระจายเพื่อสังเกตลักษณะการกระจายของจุดที่แทนข้อมูลบนแผนภูมิว่ามีรูปแบบอิสระหรือไม่ จากการพิจารณาภาพที่ 4.4 และ 4.5 ของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกและปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 พบว่า ส่วนตกค้างของผลการทดลองของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกและปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 ไม่มีรูปแบบที่แน่นอน หรือไม่สามารถประมาณรูปแบบที่แน่นอนได้ มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ แสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ



ภาพที่ 4.4 แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิก

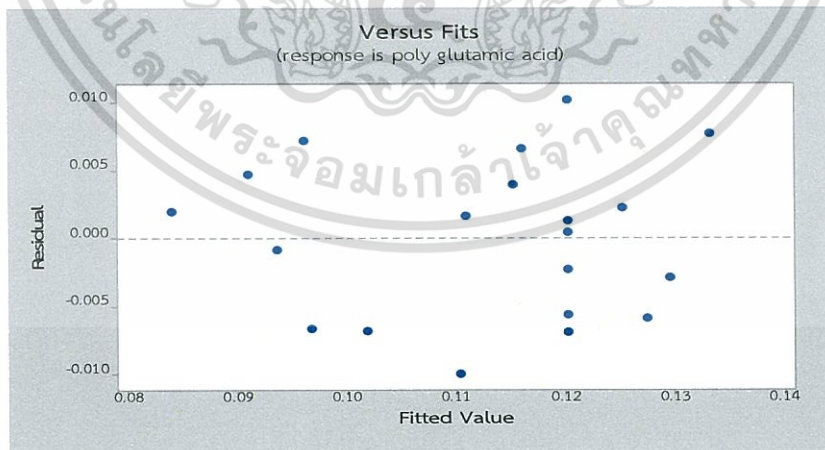
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

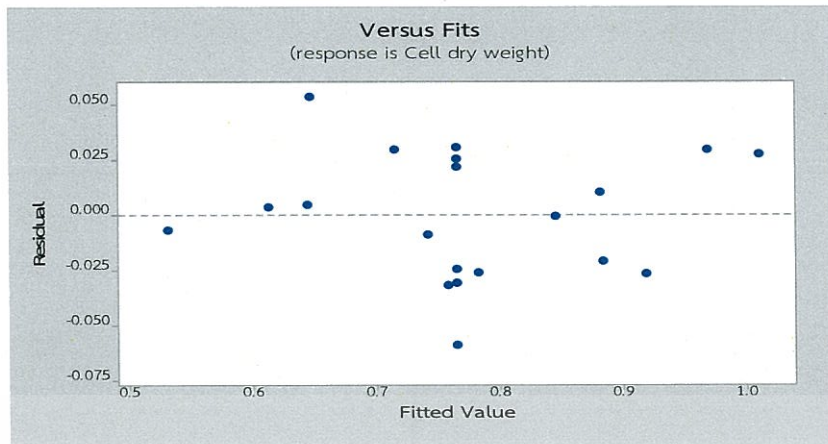
3. การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน

การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวนโดยใช้แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย จากการพิจารณาภาพที่ 4.6 และ 4.7 ของปริมาณกรดแอมมาโพลีกลูตามิก และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแอมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 ตามลำดับ พบว่า ส่วนตกค้างของผลการทดลองของปริมาณกรดแอมมาโพลีกลูตามิกและปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแอมมาโพลีกลูตามิกโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและทางลบ แสดงว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน



ภาพที่ 4.6 แผนภูมิการกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณแอมมาโพลีกลูตามิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 แผนภูมิการกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลองของปริมาณกรดแกมมา โพลีกลูตามิก และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิถีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมา โพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 พบว่า ค่าส่วนตกค้างของข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นไปตามสมมติฐานทั้ง 3 ข้อ คือ (1) ส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ (2) ค่าส่วนตกค้างมีความเป็นอิสระต่อกัน และ (3) ค่าความแปรปรวนมีเสถียรภาพ จึงสรุปได้ว่า ข้อมูลที่ได้จากการทดลองชุดนี้มีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน

4.2.2.2 ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ

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

1. ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของปริมาณกรดแกมมา โพลีกลูตามิก

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นว่า ค่า R-Sq มีค่าเท่ากับ 85.63% หมายความว่า ตัวแปรอิสระได้แก่ กรดแอลฟาดีโทกลูตาริก แอลกลูตามีน และกรดซิทริก สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามคือปริมาณกรดแกมมา โพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ ได้ร้อยละ 85.63 แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนาย เพื่อหาค่าผลตอบได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณกรดแอมมาโพลีกลูตามิก

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	-0.1021	0.0298	-3.42	0.004
Alpha Ketoglutamic	0.0045	0.0010	4.41	0.001
Glutamine	0.1238	0.0203	6.09	0.000
Citric	0.0172	0.0028	6.09	0.000
Citric*Citric	-0.0004	0.0001	-6.34	0.000
Alpha Ketoglutamic *Glutamine	-0.0102	0.0019	-5.35	0.000

S = 0.008, R-sq = 85.63%, R-sq (adj) = 80.50%

2. ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากตารางที่ 4.5 จะเห็นว่า ค่า R-Sq มีค่าเท่ากับ 94.48% หมายความว่า ตัวแปรอิสระได้แก่ กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก แอลกลูตามีน และกรดซิตริก สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามคือ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ ได้ร้อยละ 94.48 แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนาย เพื่อหาค่าผลตอบได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองขอปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	1.4620	0.2300	6.34	0.000
Alpha ketoglutamic	-0.0201	0.0121	-1.66	0.125
Glutamine	1.5110	0.2890	5.23	0.000
Citric	-0.0865	0.0176	-4.90	0.000
Glutamine*Glutamine	-0.4090	0.1580	-2.58	0.025
Citric*Citric	0.0017	0.0004	4.27	0.001
Alpha ketoglutamic *Glutamine	-0.0345	0.0107	-3.23	0.008
Alpha ketoglutamic *Citric	0.0026	0.0005	4.83	0.001
Glutamine*Citric	-0.0438	0.0107	-4.10	0.002

S = 0.038, R-sq = 94.48%, R-sq (adj) = 90.47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเป็นการตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลอง

1. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก

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

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	5	0.0038	0.0008	16.68	0.000
Linear	3	0.0007	0.0002	4.84	0.016
Square	1	0.0018	0.0018	40.24	0.000
Interaction	1	0.0013	0.0013	28.66	0.000
Error	14	0.0006	0.0000		
Lack-of-Fit	9	0.0004	0.0000	1.29	0.408
Pure Error	5	0.0002	0.0000	0.00	
Total	19	0.0044			

2. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง

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

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณปริมาณน้ำหนักรวมแห้ง

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	8	0.2682	0.0335	23.55	0.000
Linear	3	0.1576	0.0525	36.91	0.000
Square	2	0.0386	0.0193	13.55	0.001
Interaction	3	0.0720	0.0240	16.85	0.000
Error	11	0.0157	0.0014		
Lack-of-Fit	6	0.0088	0.0015	1.06	0.487
Pure Error	5	0.0069	0.0014		
Total	19	0.2839			

4.2.2.4 การสร้างสมการทำนายปริมาณของผลการทดลอง

การสร้างสมการทำนายปริมาณของผลการทดลองได้จากผลของการเต็มสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 โดยนำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของปริมาณของผลการทดลอง ในตารางที่ 4.3 และ 4.4 มาเขียนให้อยู่ในรูปของสมการดังนี้

1. การสร้างสมการทำนายปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก ในตารางที่ 4.3

$$\text{กรดแกมมาโพลีกลูตามิก (กรัมต่อลิตร)} = -0.1021 + 0.00448 X_1 + 0.1238 X_2 + 0.01721 X_3 - 0.000444 X_3^2 - 0.01016 X_1 * X_2$$

เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (Lack of fit) ในตารางที่ 4.5 พบว่าค่า P-value ของ lack of fit มีค่าเท่ากับ 0.408 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 มาก ทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบบจำลองนี้มีความพอเพียงของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถนำสมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกที่ได้จากผลของการเต็มสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 ได้

2. การสร้างสมการทำนายปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง ในตารางที่ 4.4

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักรเซลล์แห้ง} &= 1.462 - 0.0201 X_1 + 1.511 X_2 - 0.0865 X_3 - 0.409 X_2^2 + 0.001688 X_3^2 \\ (\text{กรัมต่อลิตร}) &- 0.0345 X_1 * X_2 + 0.002576 X_1 * X_3 - 0.0438 X_2 * X_3 \end{aligned}$$

เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (Lack of fit) ในตารางที่ 4.6 พบว่าค่า P-value ของ lack of fit มีค่าเท่ากับ 0.487 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 มาก ทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบบจำลองนี้มีความพอเพียงของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถนำสมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง ที่ได้จากผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมตาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 ได้

4.2.2.5 การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณผลการทดลอง

เมื่อได้สมการสำหรับทำนายผลการทดลองแล้ว จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวผลตอบของผลการทดลอง และกราฟโครงร่าง

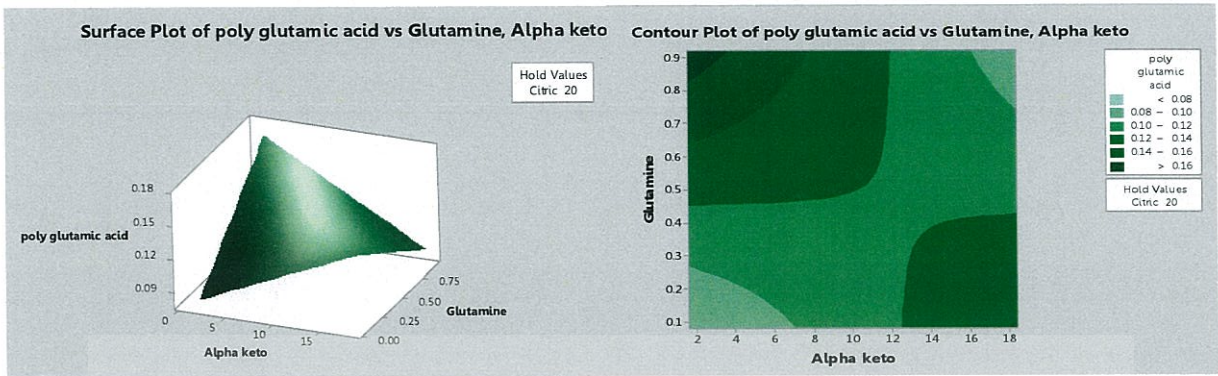
1. การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิก

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาดีโตกลูตาริก และกลูตามีน ในภาพที่ 4.8 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กรดซिटริกที่ใช้ในการผลิตคงที่ 20 กรัมต่อลิตร จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกในการผลิตมากที่สุด คือ แอลฟาดีโตกลูตาริกประมาณ 1-2.5 มิลลิโมลาร์ และกลูตามีนประมาณ 0.75-0.9 มิลลิโมลาร์

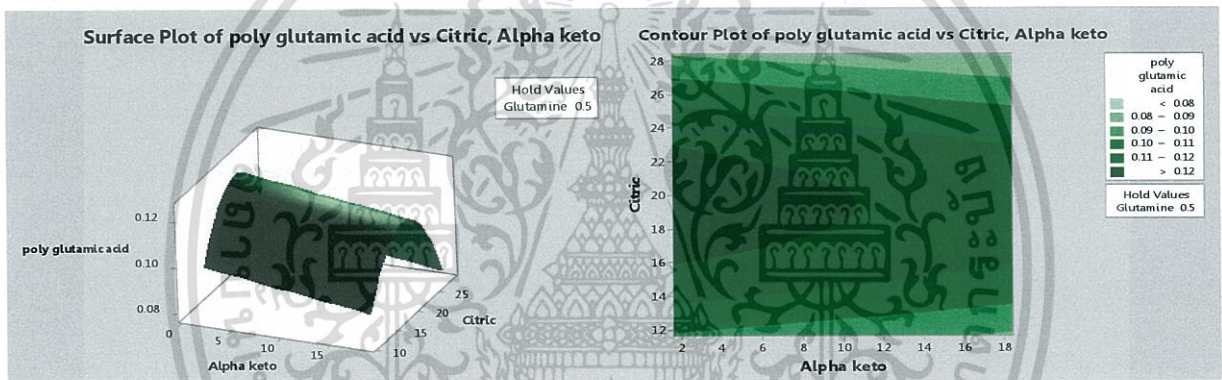
จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างระหว่างแอลฟาดีโตกลูตาริก และกรดซिटริกในภาพที่ 4.9 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดคือ ต้องการปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กลูตามีนที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.5 มิลลิโมลาร์ จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกในการผลิตมากที่สุด คือ แอลฟาดีโตกลูตาริกประมาณ 1-10 มิลลิโมลาร์ และกรดซिटริกประมาณ 16-22.3 กรัมต่อลิตร

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีน และกรดซिटริกในภาพที่ 4.10 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดคือ ต้องการปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้แอลฟาดีโตกลูตาริกที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.5 มิลลิโมลาร์ จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกในการผลิตมากที่สุด คือ กรดกลูตามีนประมาณ 0.55 มิลลิโมลาร์ และกรดซिटริกประมาณ 15-22 กรัมต่อลิตร

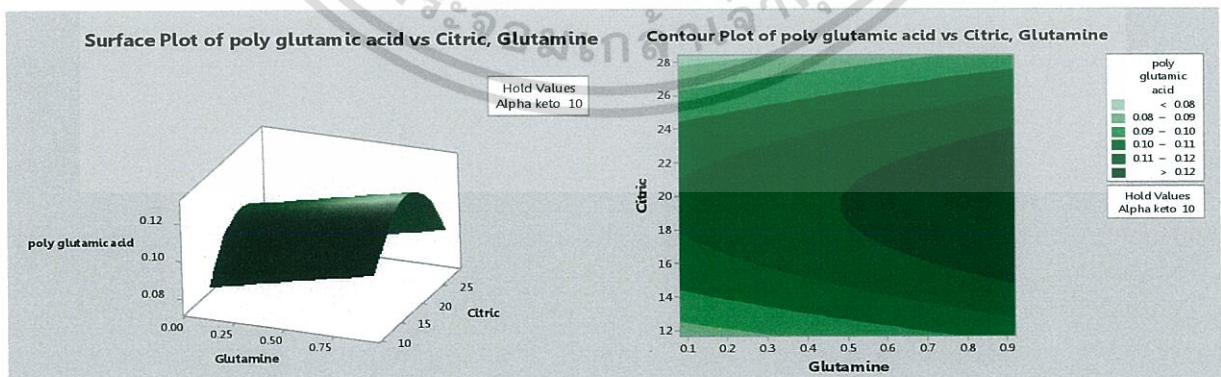
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริกและกลูตามีน



ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริกและกรดซิตริก



ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีนและกรดซิตริก

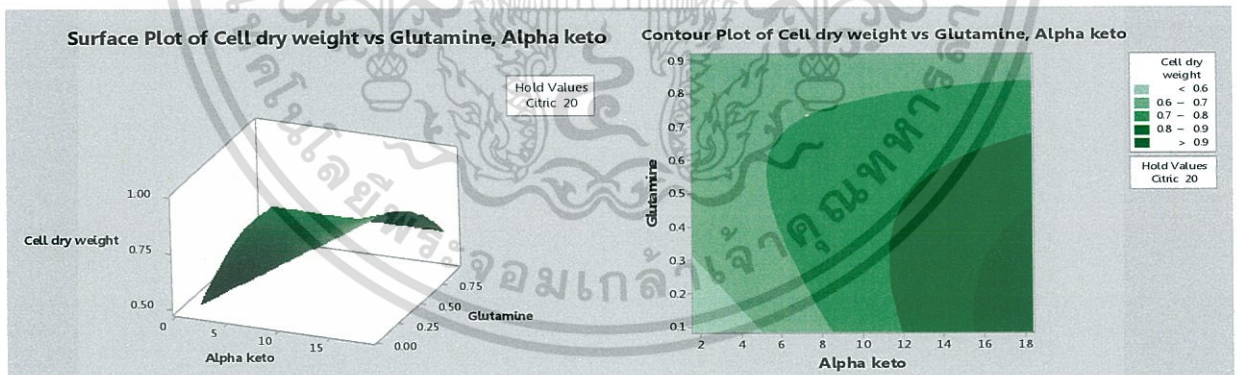
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การสร้างพื้นผิวผลตอบแทนของปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้ง

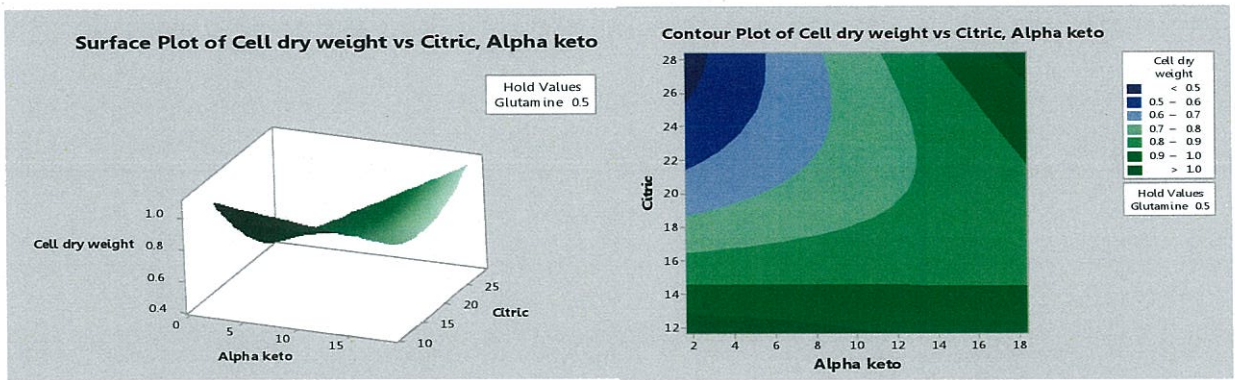
จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบแทนและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริก และกลูตามีน ในภาพที่ 4.11 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กรดซิตริกที่ใช้ในการผลิตคงที่ 20 กรัมต่อลิตร จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด คือ แอลฟาคีโตกลูตาริกประมาณ 15.7-18 มิลลิโมลาร์ และกลูตามีนประมาณ 0.1-0.45 มิลลิโมลาร์

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบแทนและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริก และกรดซิตริกในภาพที่ 4.12 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้กลูตามีนที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.5 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด คือ แอลฟาคีโตกลูตาริกประมาณ 16.5-18 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกประมาณ 25.8-28 กรัมต่อลิตร

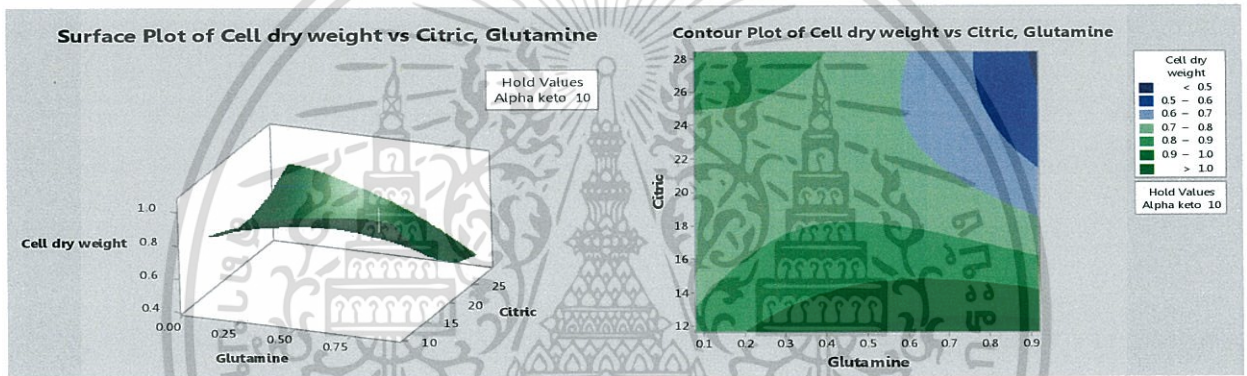
จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบแทนและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีน และกรดซิตริก ในภาพที่ 4.13 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด โดยกำหนดให้แอลฟาคีโตกลูตาริกที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.5 มิลลิโมลาร์ จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งในการผลิตมากที่สุด คือ กลูตามีนประมาณ 0.5-0.9 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกประมาณ 11.5-12 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบแทนและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาคีโตกลูตาริกและกลูตามีน



ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอลฟาเคโตไกลูตาริกและกรดซิตริก



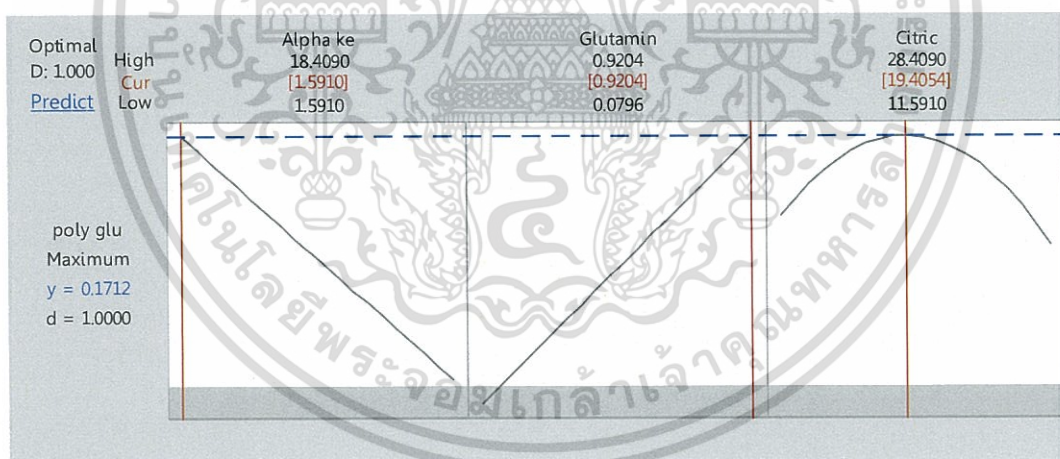
ภาพที่ 4.13 กราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกลูตามีนและกรดซิตริก

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกและปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ผลิตได้ โดยมีการเติมกรดซิตริกพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดซิตริกที่มากจะมาผลต่อปริมาณแกมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ในปริมาณที่มาก

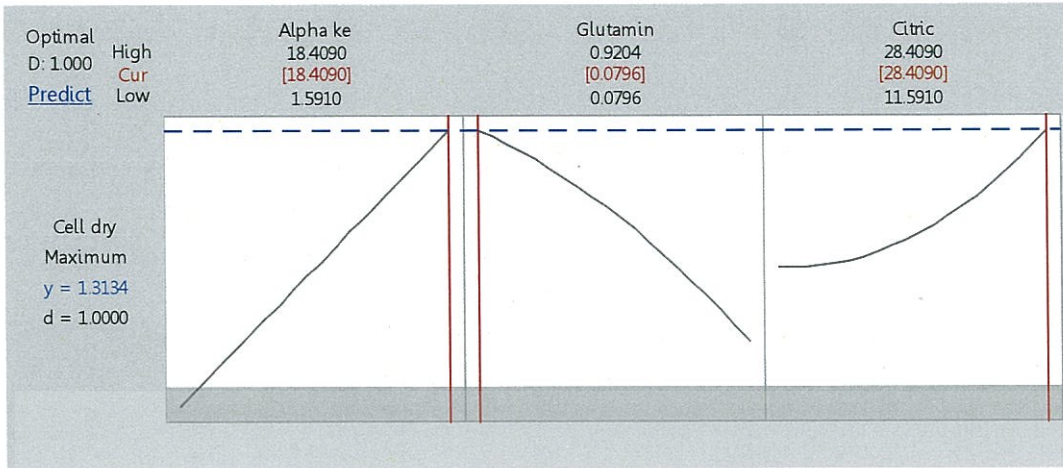
4.2.2.6 การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้ปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก และ ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer ในโปรแกรมสำเร็จรูปทาง สถิติซึ่งเป็นฟังก์ชันที่ใช้หาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยและใช้วัดความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบ (composite desirability: D) ซึ่งค่าความพึงพอใจของผลตอบมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 ถ้า D มีค่าเท่ากับ 1 หมายถึง ผลตอบ นั้นได้รับความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์

จากการหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่ดีที่สุดโดยใช้ ฟังก์ชัน response optimizer พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก และปริมาณน้ำหนักรเซลล์ โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 คือ แอลฟาดีโตกลูตาริกที่ 1.59 มิลลิโมลาร์ กลูตามิกที่ 0.92 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกที่ 19.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกเท่ากับ 0.171 กรัมต่อลิตร ส่วนสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปริมาณ น้ำหนักรเซลล์แห้ง คือ แอลฟาดีโตกลูตาริกที่ 18.41 มิลลิโมลาร์ กลูตามิกที่ 0.08 มิลลิโมลาร์ และกรดซิตริกที่ 28.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งเท่ากับ 1.3134 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าความพึงพอใจรวม เท่ากับ 1 ดังภาพที่ 4.14 และ 4.15



ภาพที่ 4.14 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก



ภาพที่ 4.15 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการผลิตน้ำหมักเซลล์แห้ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการศึกษาหาชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* SRU 01 พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* SRU 01 เป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid-dependent คือต้องการ Glutamic acid จากแหล่งภายนอกเพิ่มเข้าไปในสารอาหารเพื่อให้สามารถที่จะทำการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิกในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นในการเติมสารตัวกลางในวิถีเมแทบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก โดยใช้กระบวนการหมักจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 แสดงในรูปของสมการสำหรับทำนายปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิก คือ ปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิต ได้เท่ากับ $-0.1021 + 0.00448 X_1 + 0.1238 X_2 + 0.01721 X_3 - 0.000444 X_3^2 - 0.01016 X_1 * X_2$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ เท่ากับ 0.856 เมื่อนำมาหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก คือ แอลฟาดีโตกลูตาริกที่ 1.59 มิลลิโมลาร์ กลูตามิกที่ 0.92 มิลลิโมลาร์ และกรดซिटริกที่ 19.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่ผลิตได้ เท่ากับ 0.1712 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าความพึงพอใจรวมเท่ากับ 1 สมการสำหรับทำนาย น้ำหนักเซลล์แห้ง คือ ปริมาณเซลล์แห้งที่ผลิต ได้เท่ากับ $1.462 - 0.0201 X_1 + 1.511 X_2 - 0.0865 X_3 - 0.409 X_2^2 + 0.001688 X_3^2 - 0.0345 X_1 * X_2 + 0.002576 X_1 * X_3 - 0.0438 X_2 * X_3$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ เท่ากับ 0.945 เมื่อนำมาหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ แอลฟาดีโตกลูตาริกที่ 18.41 มิลลิโมลาร์ กลูตามิกที่ 0.08 มิลลิโมลาร์ และกรดซिटริกที่ 28.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ผลิตได้ เท่ากับ 1.3134 กรัม โดยมีค่าความพึงพอใจรวมเท่ากับ 1

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรนำค่าที่ได้จากการทำนายสมการไปทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้ว่าเป็นไปตามค่าที่ได้จากสมการทำนาย

5.2.2 ควรศึกษาเชื้อ *Bacillus* ที่สกุลต่างจากการศึกษานี้เพิ่มเติม เพื่อศึกษาถึงผลของการผลิตกรดแกมมาโพลีกลูตามิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- กานต์ยุพา จิตติวัฒนา, อรุณ ชาญชัยเขาวีวัฒน์, ภิญโญ พานิชพันธ์, พิณทิพ รื่นวงษา, มนัสวี โพธิ์ทอง และ นาทฤดี ชำนาญพล. 2558. วัฏจักรเครปส์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/ap-biology1/Chapter7/Part6.html>. 20 ตุลาคม 2558.
- ฐิติกร มหิสนันท์. 2555. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิกด้วยวิธีการใช้รังสีและ/หรือสารเคมี. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- เทพปัญญา เจริญรัตน์ และ วรสิทธิ์ โทจำปา. 2553. ปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.
- ภิญโญ พานิชพันธ์, พิณทิพ รื่นวงษา, นาทฤดี ชำนาญพล, วชิร ใจภักดี, มนัสวี โพธิ์ทอง, จิราพร ธารแผ้ว, สุการัตน์ เหล่าคุณธรรม และ พิทักษ์พงษ์ คมพุดชา. 2558. การหายใจ. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก: <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/respiration/L2T3.html>. 30 ตุลาคม 2558.
- ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีกรมหมัก. 2558. สรรสาระเทคโนโลยีชีวภาพ. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก: <http://www.biotech.or.th/TSB/images/stories/journal/E-Mag%20Jan-May%202013.pdf>. 20 ตุลาคม 2558.
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี. ม.ป.ป. การวิเคราะห์หาแอมโมเนีย. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก: <http://www.fisheries.go.th/cf-chan/visit-water-room/ammonia/ammonia-page.htm>. 3 พฤศจิกายน 2559.
- Bajaj, I. and Singhal, R. 2011. Poly (glutamic acid) : an emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*. 102:5551–5561.
- 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 and Biotechnology*. 41:1375–1382.
- Chintrakool, M., Kongklom, N. and Sirisansaneeyakul, S. 2014. The production of poly- γ -glutamic acid from monosodium glutamate waste (ami-ami) by *Bacillus licheniformis* ATCC 9. *Biodiversity Biotechnology Bioeconomy*. 179:222-228.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kongkloma, N., Luo, H., Shi, Z., Pechyen, C., 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.
- Leonard, C.G., Housewright, R.D. and Thorne, C.B. 1958. Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 76:499-503.
- 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.
- Paraskevas, G., Atta-Politou, J. and Koupparis, M. 2002. Spectrophotometric determination of lisinopril in tablets using 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene reagent. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 29:865-872.
- Shih, I.L. and Van, Y.T. 2001. The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*. 79:207-225.
- 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. *The Japan Chemical Journal Forum and Wiley Periodicals*. 5:352-366.
- Yokoigawa, K., Sato, M. and Soda, K. 2006. Simple improvement in freeze-tolerance of bakers' yeast with poly- γ -glutamate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 102:215-219.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและการคำนวณ

ก.1 การเตรียมสารละลาย Hydrochloric acid (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

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

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

โดย C = ความเข้มข้น หน่วยเป็น นอร์มอล

D = ความหนาแน่น (density) หน่วยเป็น กรัมต่อมิลลิลิตร

% = เปอร์เซ็นต์ปริมาณเนื้อกรด

MW = มวลโมเลกุลของ HCl หน่วยเป็นกรัมต่อโมล

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

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

$$\begin{aligned} \text{จากสูตร } N_1 V_1 &= N_2 V_2 \\ 12.06 \times V_1 &= 1 \times 250 \\ V_1 &= 20.73 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ปีเปตกรด HCl เข้มข้นมา 20.73 มิลลิลิตร แล้วเจือจางเป็น 250 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

***เพื่อความปลอดภัย ให้เทกรดลงในน้ำ อย่าเทน้ำใส่กรดเด็ดขาด

ก.2 การเตรียมสารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 2 นอร์มอล

เมื่อ NaOH ความหนาแน่น 2.13 กรัมต่อมิลลิลิตร มวลโมเลกุล 39.99 กรัมต่อโมล

$$\begin{aligned} \text{จากสูตร } \frac{g}{MW} &= \frac{CV}{1000} \end{aligned}$$

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

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

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

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

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วยสาร

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

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

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

ในสารละลาย 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสาร

Cetyltrimethyl ammonium bromide	12.76 กรัม
Sodium hydroxide	10 กรัม

เมื่อ CTAB มวลโมเลกุล 364.5 กรัมต่อโมล

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\begin{aligned} \text{จะได้} \quad \frac{\text{g}}{364.5} &= \frac{(0.07) \times (500)}{1000} \\ \text{g} &= 12.76 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

NaOH 2% ใน CTAB ความเข้มข้น 0.07 โมลาร์

CTAB 100 มิลลิลิตร ใช้สาร NaOH 2 กรัม

ถ้า CTAB 500 มิลลิลิตร ใช้สาร NaOH $\frac{2 \times 500}{100} = 10$ กรัม

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

ก.5 การเตรียมสารละลาย 1-Fluoro-2, 4-dinitrobenzene (FDNB) ความเข้มข้น 0.006 โมลาร์

เมื่อ FDNB เข้มข้น 99% (W/W) ความหนาแน่น 1.482 กรัมต่อมิลลิลิตร มวลโมเลกุล 186.1 กรัมต่อโมล

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

โดย C = ความเข้มข้น หน่วยเป็น นอร์มอล

D = ความหนาแน่น (density) หน่วยเป็น กรัมต่อมิลลิลิตร

% = เปอร์เซ็นต์ปริมาณเนื้อกรด

MW = มวลโมเลกุลของ FDNB หน่วยเป็น กรัมต่อโมล

$$\begin{aligned} \text{จะได้} \quad C &= \frac{(10 \times 1.482 \times 99)}{186.1} \\ &= 7.9 \text{ นอร์มอล} \end{aligned}$$

ดังนั้น FDNB เข้มข้น 99% (W/W) มีความเข้มข้น 7.9 นอร์มอล ถ้าต้องการเตรียมกรด FDNB เข้มข้น 0.006 โมลาร์ 200 มิลลิลิตร จาก FDNB ความเข้มข้น 7.9 นอร์มอล จะทำการเจือจางความเข้มข้นดังกล่าวโดยคำนวณปริมาตรที่ต้องเจือจาง

$$\begin{aligned} \text{จากสูตร} \quad N_1 V_1 &= N_2 V_2 \\ 7.9 \times V_1 &= 0.006 \times 200 \\ V_1 &= 0.152 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ปิเปตกรด FDNB มา 0.152 มิลลิลิตร แล้วเจือจางโดยการเติม อะซิโตนไนด์ 200 มิลลิลิตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.6 การเตรียมสารละลาย Borate buffer ความเข้มข้น 0.050 โมลาร์

ในสารละลาย 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสาร

Boric acid (H_3BO_3) 1.55 กรัม

Potassium chloride (KCl) 1.86 กรัม

เมื่อ H_3BO_3 มวลโมเลกุล 61.84 กรัมต่อโมล

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

โดย g = น้ำหนักของ NaOH ที่ต้องการ หน่วยเป็น กรัม

MW = มวลโมเลกุลของ NaOH หน่วยเป็น กรัมต่อโมล

C = ความเข้มข้นที่ต้องการ หน่วยเป็น นอร์มอล

V = ปริมาตรที่ต้องการ หน่วยเป็น มิลลิลิตร

$$\text{จะได้ } \frac{g}{61.84} = \frac{(0.05) \times (500)}{1000}$$

$$g = 1.55 \text{ กรัม}$$

เมื่อ KCl มวลโมเลกุล 74.55 กรัมต่อโมล

$$\text{จะได้ } \frac{g}{74.55} = \frac{(0.05) \times (500)}{1000}$$

$$g = 1.86 \text{ กรัม}$$

ชั่ง H_3BO_3 มา 1.55 กรัม และชั่ง KCl มา 1.86 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 8.2-8.5 ด้วย NaOH 2 นอร์มอล ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยการเติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

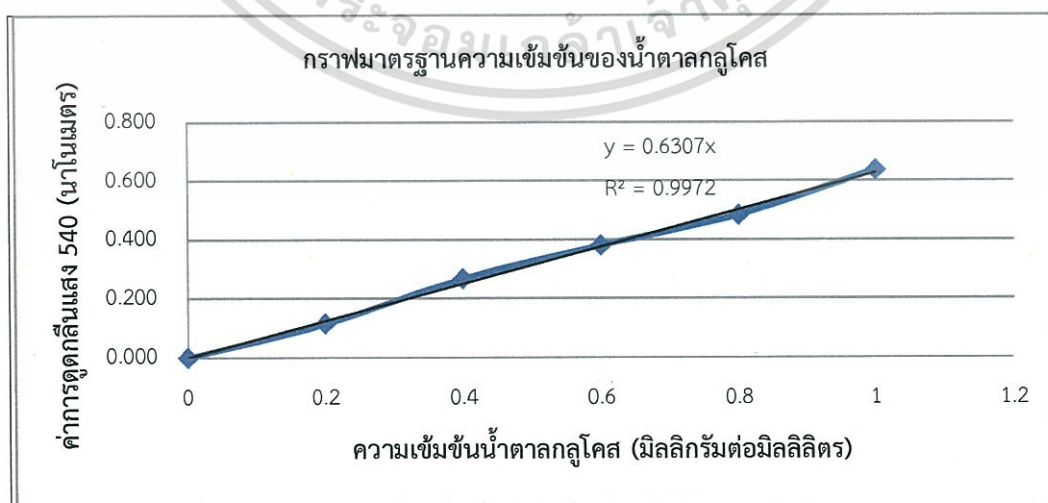
ข.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลาย น้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลาย น้ำตาลกลูโคสมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ข-1 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานและค่า OD₅₄₀ ที่กลูโคสความเข้มข้นต่างๆ

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

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



ภาพผนวกที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

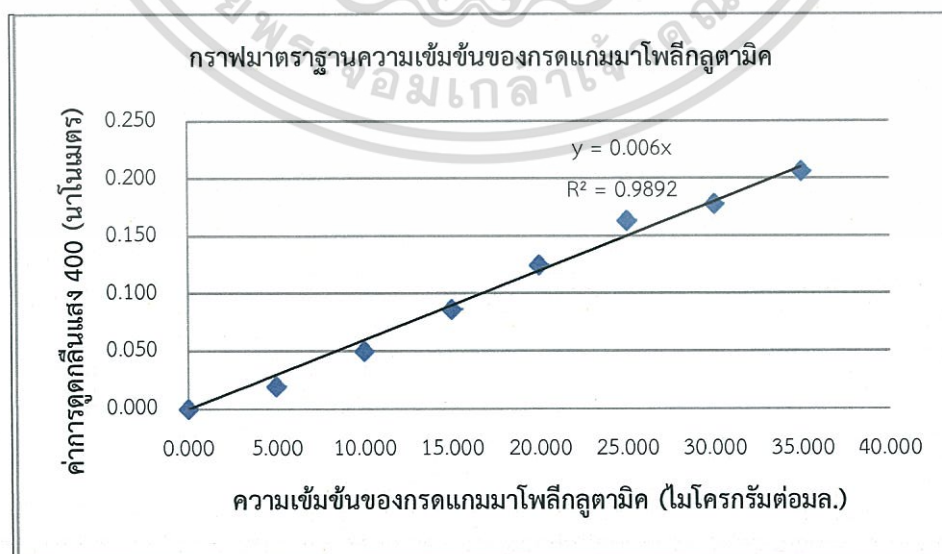
ข.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแอมมาโพลีกลูตามิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอมมาโพลีกลูตามิก ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายกรดแอมมาโพลีกลูตามิก 0.002 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายกรดแอมมาโพลีกลูตามิก มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 5 10 15 20 25 30 และ 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ข-2 การเจือจางสารละลายกรดแอมมาโพลีกลูตามิกมาตรฐานและค่า OD₄₀₀ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

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

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



ภาพผนวกที่ ข-2 กราฟมาตรฐานกรดแอมมาโพลีกลูตามิกที่ค่าการดูดกลืนแสง 400 นาโนเมตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

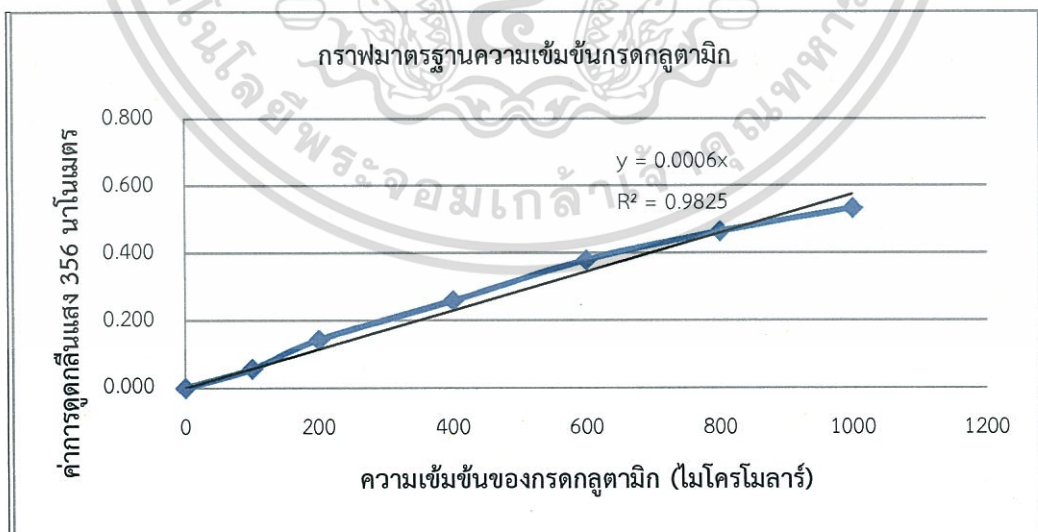
ข.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดกลูตามิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดกลูตามิก ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ โดยละลายกรดกลูตามิก 0.0147 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายกรดกลูตามิก มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 100 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครโมลาร์

ตารางที่ ข-3 การเจือจางสารละลายกรดกลูตามิกมาตรฐานและค่า OD₃₅₆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอด ที่	การเจือจาง		ความเข้มข้น γ -PGA (ไมโครกรัม / มล.)	OD ₃₅₆
	สารมาตรฐาน (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)		
1	0	10	0	0.000
2	1	9	100	0.057
3	2	8	200	0.143
4	4	6	400	0.259
5	6	4	600	0.381
6	8	2	800	0.465
7	10	0	1000	0.536

ปริมาณ γ -PGA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสง \times อัตราการเจือจาง
ความเข้มข้น

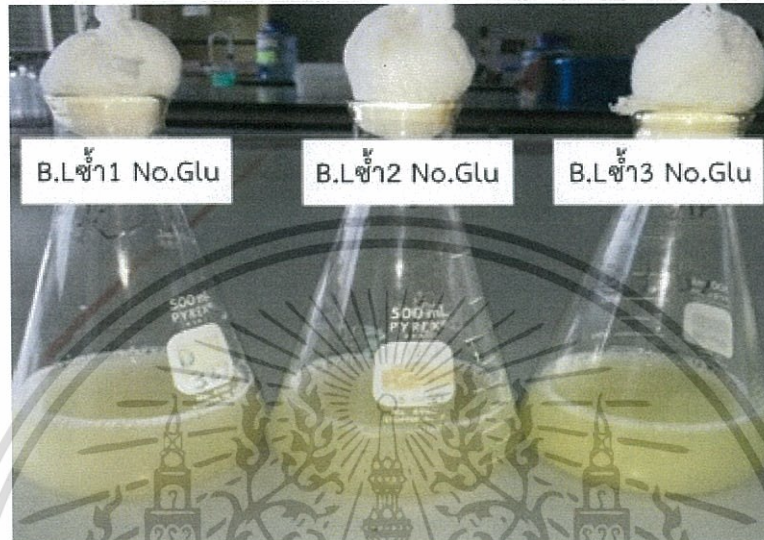


ภาพผนวกที่ ข-3 กราฟมาตรฐานกรดกลูตามิกที่ค่าการดูดกลืนแสง 356 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รูปภาพประกอบปัญหาพิเศษ

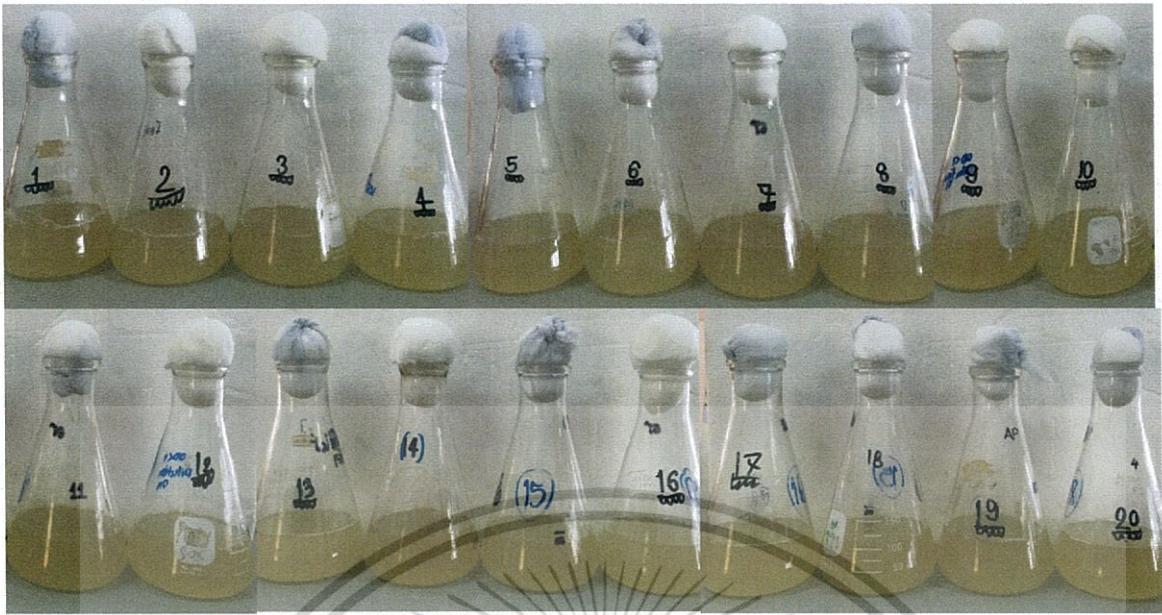


ภาพที่ ค-1 การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 โดยอาหารที่ไม่มีการเติมกรดแกลกลูตามิก



ภาพที่ ค-2 การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 โดยอาหารมีการเติมกรดแกลกลูตามิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค-3 การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* SRU 01 โดยอาหารที่มีการเติมกรดแอลฟาดีโตลลูตาริกปแอลกลูตามีนแแบกรดซิติริก



ภาพที่ ค-4 ลักษณะของตะกอนกรดแกมมาโพลีกลูตามิกที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	พรสุดา สระจิตร์
วัน เดือน ปี เกิด	25 ตุลาคม 2536
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ เตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน และผลงานวิจัย	บริษัท ไทยอคริฟู๊ดส์ จำกัด (มหาชน) ผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมา- โพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01 (Effect of metabolic pathway intermediates on poly- γ -glutamic acid production by <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01)
ชื่อ-นามสกุล	ศรินทิพย์ ธงถาวรสุวรรณ
วัน เดือน ปี เกิด	22 กรกฎาคม 2537
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนที่ โรงเรียนสตรีศรีสุริโยทัย ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน และผลงานวิจัย	บริษัท แดรี่โฮม จำกัด ผลของการเติมสารตัวกลางในวิธีเมทาบอลิซึมต่อการผลิตกรดแกมมา- โพลีกลูตามิก โดยใช้เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01 (Effect of metabolic pathway intermediates on poly- γ -glutamic acid production by <i>Bacillus licheniformis</i> SRU 01)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้