การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02

THE STUDY OF OPTIMUM CONDITION FOR POLY-γ-GLUTAMIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY *Bacillus megaterium* SRU 02

ปิยาพัชร นาระคล
อิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงศ์

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02

THE STUDY OF OPTIMUM CONDITION FOR POLY-γ-GLUTAMIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY *Bacillus megaterium* SRU 02

T148870

ปิยาพัชร นาระคล
อิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงศ์

b.10876580
i.
ห้องสมุด
เลขทะเบียน 148870
รับ เดือน ปี 30 ก.ย. 2559

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02

THE STUDY OF OPTIMUM CONDITION FOR POLY- γ -GLUTAMIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY *Bacillus megaterium* SRU 02

จัดทำโดย

นางสาวปิยาพัชร นาระคล รหัสนักศึกษา 55080106

นางสาวอิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงศ์ รหัสนักศึกษา 55080139

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..../...../.....

(ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02
ชื่อนักศึกษา	ปิยาพัชร นาระคล รหัสนักศึกษา 55080106
	อิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงศ์ รหัสนักศึกษา 55080139
หลักสูตร	หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02 ในการหมักแบบกะ โดยใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้คือ 30 50 70 100 120 และ 150 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของแอมโมเนียม-คลอไรด์ที่ใช้คือ 0 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ผลการวิจัยพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมงจะทำให้ได้ความเข้มข้นของกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงสุดเป็น 14.46 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ: กรดพอลิแกมมากลูตามิก แป้งมันสำปะหลัง *Bacillus megaterium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	The study of optimum condition for Poly- γ -glutamic acid production from cassava starch by *Bacillus megaterium* SRU 02
Student name	Piyapat Narakon Student ID 55080106
	Issaraporn Wirunhatadaphong Student ID 55080139
Program	Bachelor of Science Program in Industrial Fermentation Technology
Year	2016
Advisor	Dr.Wiramsri Sriphochanart

ABSTRACT

The objective of this study was to determine optimum condition for poly- γ -glutamic acid production from cassava starch by *Bacillus megaterium* SRU 02 in batch fermentation. The concentration of cassava starch at 30, 50, 70, 100, 120 and 150 g/L and the concentration of NH_4Cl at 0, 5, 10, 15 and 20 g/L were determined. The results indicated that cassava starch at concentration of 120 g/L and NH_4Cl at concentration of 10 g/L were used as substrates. Fermentation time was 72 hours. The highest concentration of γ -PGA was 14.46 g/L

Keyword: Poly- γ -glutamic acid cassava starch *Bacillus megaterium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การทำปัญหาพิเศษในหัวข้อเรื่อง “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมา-กลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02” เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจาก ข้าพเจ้าได้รับความอนุเคราะห์เป็นอย่างดีจากท่านอาจารย์ ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิชาปัญหาพิเศษของข้าพเจ้า ท่านได้ให้ความกรุณาและเสียสละเวลาของท่านมาให้คำปรึกษา คอยชี้แจงข้อบกพร่อง และคอยปรับปรุงแนะนำให้ไปแก้ไข เพื่อให้การทำปัญหาพิเศษเล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าจึงขอบพระคุณท่านเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น ที่เข้าร่วมเป็นกรรมการในการฟังปัญหาพิเศษ และให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ท้ายที่สุด ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดามารดาและญาติทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจที่สำคัญและเป็นแรงผลักดันให้ข้าพเจ้าเรื่อยมาตลอดการทำปัญหาพิเศษ และขอขอบคุณเพื่อนทุกคนของข้าพเจ้าที่คอยให้คำแนะนำ คอยให้คำปรึกษา คอยให้กำลังใจและคอยให้ความช่วยเหลือตลอดมา

ปิยาพัชร นาระคล
อิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงศ์
11 กรกฎาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	IV
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 กรดพอลิแกมมากลูตามิก (Poly- γ -glutamic acid)	3
2.2 โครงสร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิก	3
2.3 การนำไปประยุกต์ใช้	3
2.4 ชนิดแบคทีเรียที่สังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก	4
2.5 *Bacillus megaterium*	4
2.6 วิถีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก	5
2.7 แหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อที่ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก	6
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	7
3.1 เชื้อที่ใช้และสารเคมี	7
3.2 อุปกรณ์	7
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	8
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	11
4.1 ศึกษาผลของกรดกลูตามิกที่มีต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02	11
4.2 ศึกษาผลของปริมาณแป้งที่มีต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02	11
4.3 ศึกษาผลของปริมาณเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02	12
4.4 ศึกษาผลของระยะเวลาการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02	13
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	15
5.1 สรุปผล	15
5.2 ข้อเสนอแนะ	15
บรรณานุกรม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	19
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและการคำนวณ	20
ภาคผนวก ข การเตรียมกราฟมาตรฐาน	22
ประวัติผู้เขียน	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ปริมาณการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดกลูตามิกและไม่เติมกรดกลูตามิก	11
ข.1	การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆ	22
ข.2	การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆ	23
ข.3	การเจือจางสารละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิกมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆ	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิก	3
2.2	การสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก	5
4.1	กราฟแสดงปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณความเข้มข้นของแป้งต่างๆ	12
4.2	กราฟแสดงปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณความเข้มข้นของแป้ง 120 กรัมต่อลิตรและปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่างๆ	13
4.3	กราฟแสดงผลของระยะเวลาการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU 02	14
ข.1	กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตรสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์	22
ข.2	กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตรสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด	23
ข.3	กราฟมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ค่าการดูดกลืนแสง 400 นาโนเมตร	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดพอลิแกมมากลูตามิก หรือแกมมา-พีจีเอ (Poly-γ-glutamic acid, γ-PGA) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพสามารถบริโภคได้ ละลายน้ำและย่อยสลายได้ มีคุณสมบัติไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม สร้างขึ้นจากหน่วยย่อยของกรดกลูตามิกชนิด D และ L หรือทั้งสองอย่าง และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแกมมาเอไมด์ เป็นสารที่ถูกขับออกมานอกเซลล์โดยเชื้อจุลินทรีย์ตระกูล *Bacillus sp.* จึงสามารถนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยาและอุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย ซึ่งคุณสมบัติของแกมมา-พีจีเอนี้เป็นที่ต้องการและน่าสนใจในวงการของอุตสาหกรรมอาหาร เป็นสารที่ย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ และสามารถรับประทานได้โดยไม่ก่อให้เกิดเป็นพิษแก่ร่างกาย ดังนั้นปัจจุบันจึงให้ความสนใจกับกระบวนการผลิตแกมมา-พีจีเอเพื่อให้สามารถผลิตสารขึ้นมาได้มากที่สุด โดยการปรับปรุงเพื่อให้สามารถผลิตได้มากนั้นจะขึ้นอยู่กับ เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง สภาวะที่เหมาะสมของการเจริญและผลิตสารออกมา และอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น ในการผลิตแกมมา-พีจีเอเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมปัจจุบันจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการสังเคราะห์ขึ้น เพื่อให้ตรงกับสภาวะการผลิตสารออกจากเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งจะทำให้มีต้นทุนในการผลิตที่สูง ดังนั้นในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้จึงหาแหล่งอาหารที่จะมาใช้ทดแทนอาหารสังเคราะห์เพื่อทำให้ต้นทุนมีราคาถูกลง และหาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารออกมาด้วย

งานวิจัยนี้จึงสนใจสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญและผลิตสารแกมมา-พีจีเอออกมา โดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02 ที่จะทำให้ผลผลิตจากเซลล์ออกมามากที่สุดจากแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่หาได้ง่ายคือ แป้งมันสำปะหลังใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการเลี้ยงเชื้อ เพราะแป้งมันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ หาง่าย ราคาถูก ผลิตได้จากหัวของมันสำปะหลัง ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญนอกจากน้ำก็คือ คาร์โบไฮเดรต ประมาณร้อยละ 70-80 และยังมีโปรตีน วิตามิน สารอาหารอื่นๆที่ยังสามารถใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อได้ด้วย จึงถือว่ามันสำปะหลังเป็นพืชที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ให้อาหารกับคนและสัตว์ได้ดีที่สุด แป้งประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีของเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาได้เพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลแล้วจึงนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้ในการเจริญและผลิตแกมมา-พีจีเอออกมา ซึ่งเป็นข้อดีอีกอย่างคือไม่จำเป็นต้องทำการย่อยแป้งก่อนนำมาเป็นสับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เพื่อที่จะทำให้ต้นทุนในการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาที่ถูกลงจากอาหารสังเคราะห์และศึกษาปริมาณองค์ประกอบที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อสามารถเจริญและผลิตแกมมา-พีจีเอ

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เตรียมจากแป้งสำมันปะมันในการเจริญของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02 สำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยสามารถลดต้นทุนลง

1.3.2 ทำให้ได้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจากมันสำปะหลังที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกให้ได้ผลผลิตมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

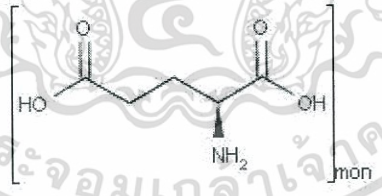
2.1 กรดพอลิแกมมากลูตามิก (Poly- γ -glutamic acid)

กรดพอลิแกมมากลูตามิกหรือแกมมา-พีจีเอ (Poly- γ -glutamic acid, γ -PGA) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (Biopolymer) ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์โดยเชื้อจุลินทรีย์เช่น *Bacillus subtillis* และ *Bacillus licheniformis* เป็นที่ต้องการในวงกว้างของอุตสาหกรรมต่าง ๆ แกมมา-พีจีเอเกิดขึ้นตามธรรมชาติ สามารถบริโภคได้ ละลายน้ำ ย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradable) มีคุณสมบัติไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารญี่ปุ่น คือ นัตโตะ ประสบความสำเร็จในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย มีศักยภาพในการนำไปใช้สำหรับการตกผลึกโปรตีน (Protein crystallization) เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อที่มีความนุ่ม (Moraes และคณะ, 2012)

Ivanovics และคณะ (1937) ได้ค้นพบแกมมา-พีจีเอครั้งแรกเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่ในแคบซูลของ *B. anthracis* มีลักษณะเหนียวหนืดและจะปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเซลล์แตก เป็นสารผสมระหว่างกรดพอลิกลูตามิก และฟรุกแทน ซึ่งถูกผลิตโดย *B. subtilis natto* นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า *Bacillus* หลายสายพันธุ์สามารถผลิตแกมมา-พีจีเอได้โดยการปล่อยออกมานอกเซลล์ (Shih และคณะ, 2001)

2.2 โครงสร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิก

สร้างขึ้นจากหน่วยย่อยของกรดกลูตามิกชนิด D และ L หรือทั้งสองอย่างและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแกมมาเอไมด์ (γ -amide) ระหว่างกรดแอลฟาอะมิโน (α-amino) และกรดแกมมาคาร์บอกซิลิก (γ -carboxylic) (Moraes และคณะ, 2012)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างกรดแกมมาพอลิกลูตามิก
ที่มา http://www.lookchem.com/Polyglutamic-acid/

2.3 การนำไปประยุกต์ใช้

แกมมา-พีจีเอเป็นเมือกของนัตโตะหรือถั่วเหลืองหมัก ซึ่งเกิดขึ้นจากแหล่งธรรมชาติเป็นอาหารพื้นเมืองของญี่ปุ่น แกมมา-พีจีเอเป็นสารสำคัญอย่างยิ่งในการนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นเอกลักษณ์ คือ ไม่เป็นพิษต่อคนและสิ่งแวดล้อม ละลายน้ำได้ สามารถย่อยสลายได้โดยวิธีทางชีวภาพ (Biodegradable) จึงเป็นประโยชน์ในการนำประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้แก่ กระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมการหมัก (Yokoi และคณะ, 1995) นอกจากนี้ในด้านการประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางและทางการแพทย์ยังสามารถประยุกต์ใช้เป็นสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มความเหนียว (Thickener) สารรักษาความชื้น (Humectant) วัสดุควบคุมการปลดปล่อย (Sustained release meterials) หรือสารนำพายา (Drug carrier) (Yoon และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังมีการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อดัดแปลงโครงสร้างของแกมมา-พีจีเอทำให้แกมมา-พีจีเอมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น การใช้ปฏิกิริยาเอสเทอ-ริฟิเคชั่น (Esterification) ตรงบริเวณหมู่คาร์บอกซิล (Carboxy group) ของแกมมา-พีจีเอทำให้เอสเทอร์ของแกมมา-พีจีเอสามารถแสดงคุณสมบัติเป็นพลาสติกทนร้อน (Thermoplastics) หรือ poly (γ -glutamic acid α-benzyl ester) แสดงคุณสมบัติเป็นเส้นใยและแผ่นฟิล์ม (Choi และ Kunioka, 1995) นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเป็นสารตกตะกอนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการบำบัดน้ำเสีย อุตสาหกรรมน้ำดื่ม ประปา โดยพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของสารตกตะกอนชีวภาพเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตกตะกอน

ในอุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย มีการทดลองใช้แกมมา-พีจีเอกำจัดโลหะหนักในน้ำเสีย โดยเมื่อเติมแกมมา-พีจีเอแสดงถึงการดูดซึมโลหะหนัก สามารถดูดโมเลกุลแล้วตกลงมาเป็นตะกอน เพื่อรอการกำจัดในขั้นตอนต่อไป (Bhattacharyya และคณะ, 1998) แกมมา-พีจีเอสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการแตกออกของโลหะหนักมากกว่า 99.8 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิคการกรองด้วยความดันต่ำ (Hajdu และคณะ, 2012) และมีประสิทธิภาพสามารถนำมาใช้เพื่อลบสีย้อมพื้นฐานจากสารละลาย การศึกษาพบว่า 98 เปอร์เซ็นต์ของสีย้อมดูดซับบนแกมมา-พีจีเอสามารถนำกลับมาใช้ที่พีเอช 1 ซึ่งอำนวยความสะดวกในเรื่องการใช้ประโยชน์แกมมา-พีจีเอไม่เป็นพิษ และย่อยสลายของระบบการดูดซับที่พัฒนาให้เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมกับอุตสาหกรรมสีย้อม (Inbaraj และคณะ, 2006)

2.4 ชนิดแบคทีเรียที่สังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก

การสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก (Poly- γ -glutamic acid) โดยแบคทีเรียสามารถจำแนกตามองค์ประกอบของสารอาหารในการเพาะเลี้ยงเชื้อได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ (Ishwar และSinghal, 2011)

1. กลุ่มที่ต้องเติม L-glutamic acid ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (L-glutamic acid-dependent) เพื่อกระตุ้นการสร้างแกมมา-พีจีเอและการเจริญเติบโตของเซลล์ วิถีการสังเคราะห์แกมมา-พีจีเอของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มของการเติม L-glutamic acid เช่น วิถีการสร้างแกมมา-พีจีเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus anthracis, B. licheniformis* ATCC9945A, *B. subtilis* IFO 3335, *B. subtilis* F-2-01 และ*B. Subtilis* NX-2 เป็นต้น

2. กลุ่มที่ไม่ต้องเติม L-glutamic acid ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (L-glutamic acid-independent) มีรายงานการศึกษาวิถีการสร้างแกมมา-พีจีเอจำนวนน้อยมาก เช่น วิถีการสร้างแกมมา-พีจีเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtilis* TAM-4 และ *B. licheniformis* A35 เป็นต้น

2.5 *Bacillus megaterium*

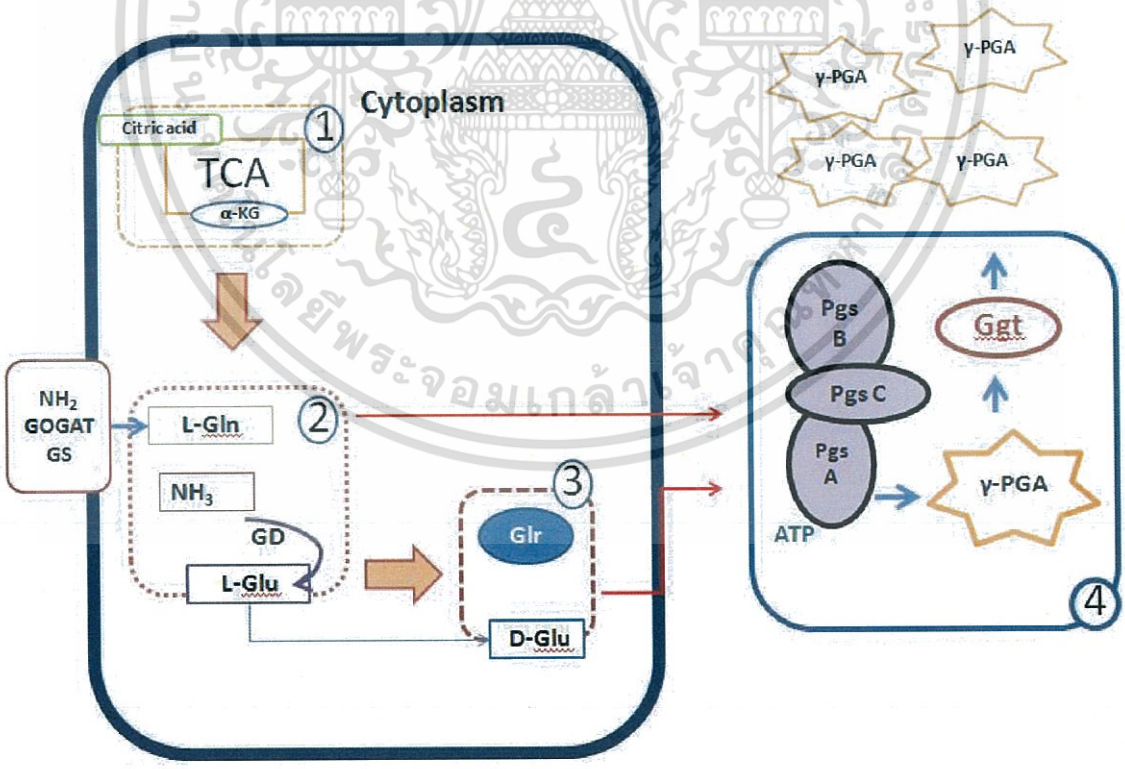
Bacillus megaterium เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสปอร์ และมีรูปร่างเป็นแท่ง ไม่ก่อให้เกิดโรค ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถเจริญได้จากแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย เช่น ของเสียจากอุตสาหกรรม กากน้ำตาล เป็นต้น ที่มาของชื่อ megaterium เพราะมีขนาดใหญ่เป็นเซลล์พืช (มากกว่า 10 ไมครอน) (Vary, 1994; Vary และคณะ, 2007; Schulz และคณะ, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 วิถีการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก

จากภาพที่ 2.2 แสดงถึงวิถีการสังเคราะห์แกมมา-พีจีเอของแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการเติม L-glutamic acid ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยสามารถแบ่งวิถีการสร้างแกมมา-พีจีเอหลักออกเป็น 4 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 สังเคราะห์แอลฟาคีโตกลูตาเรท (α-ketoglutarate, α-KG) ในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) โดยใช้กรดซิตริก (citric acid) เป็นซับสเตรต จากนั้น α-KG จะเข้าสู่ส่วนที่ 2 เป็นการสร้างกรดแอลกลูตามิก (L-glutamic acid, L-Glu) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (Glutamate dehydrogenase, GD) ร่วมกับการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และมีการสร้าง L-Glu จาก L-glutamine (L-Gln) ร่วมด้วย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutamate 2-oxoglutarate (α-ketoglutarate) aminotransferase (GOGAT) เอนไซม์ Glutamine synthetase (GS) และการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่ง L-Glu ที่สร้างได้ทั้งหมดนี้ส่วนหนึ่งจะเข้าสู่ส่วนที่ 4 โดยตรงและส่วนหนึ่งจะเข้าส่วนที่ 3 เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นกรดดีกลูตามิก (D-glutamic acid, D-Glu) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutamic acid racemase (Glr) ก่อนเข้าสู่ส่วนที่ 4 เพื่อสังเคราะห์ γ-PGA ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ poly(glutamic acid) synthetase (PgsBCA) ร่วมกับ ATP และปลดปล่อย γ-PGA ออกสู่ภายนอกเซลล์ต่อไป (ณัฐวุฒิ และคณะ, 2556)



ภาพที่ 2.2 การสังเคราะห์กรดแกมมาพอลิกลูตามิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 แหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อที่ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

แหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดแกมมา-พีจีเอมีความสำคัญอย่างมากในการที่จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตกรดแกมมา-พีจีเอ การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่สังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อให้เชื้อผลิตกรดออกมาในปริมาณมากเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง เพราะฉะนั้นในการศึกษาที่จะหาแหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติมาทดแทนเป็นสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้มีต้นทุนที่ถูกลงจึงมีความสำคัญ แหล่งคาร์บอนที่หาได้จากธรรมชาติ เช่น มันสำปะหลัง หรือ กากน้ำตาล เป็นต้น (Fan และคณะ, 2013)

Nuttawut K. และคณะ (2015) ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยแบคทีเรียที่ไม่ต้องเติมกรดกลูตามิก คือ *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 ดำเนินการหมักแบบกึ่งกะ และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน พบว่าใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลง และเติมกลูโคสกับแอมโมเนียมคลอไรด์อย่างต่อเนื่อง ควบคุมความเข้มข้นของออกซิเจนและพีเอช ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ได้คือ 27.5 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิต 0.29 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Luana P. M. และคณะ (2012) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้กากน้ำตาล กรดซิตริก และแอมโมเนียมซัลเฟต ในกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อ *Bacillus velezensis* NRRL-23189 เพื่อใช้ผลิตแกมมา-พีจีเอ และตรวจกากน้ำตาลที่ถูกใช้ไป สภาวะในการศึกษาจะให้การเขย่า 200 รอบต่อนาทีที่ 27 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง พีเอช 6.5 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบไปด้วยกากน้ำตาล 200 กรัมต่อลิตร กรดซิตริก 12.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 8 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตแกมมา-พีจีเอมากที่สุดคือ 4.82 กรัมต่อลิตร

Zhang D. และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดย *Bacillus subtilis* NX-2 จากกากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ย่อย และของเสียจากผงชูรส ทำการทดลองพบว่าการหมักแบบกึ่งกะจะให้ผลผลิตมากกว่าการหมักแบบกะ ในขณะเดียวกันการหมักแบบกึ่งกะจากกากน้ำตาลอ้อยที่ไม่ย่อยและกากน้ำตาลอ้อยที่ย่อยให้ผลผลิตใกล้เคียงกันคือ 50.2 และ 51.1 กรัมต่อลิตร ที่ 96 ชั่วโมง ต่อมาทำการทดลองเลี้ยงเชื้อในของเสียผงชูรส ให้ผลผลิต 52.1 กรัมต่อลิตร จากผลที่ได้นี้เป็นคำแนะนำให้ใช้ทางเลือกของแหล่งคาร์บอนที่ต้นทุนต่ำและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

Zhang H. และคณะ (2012) ได้ศึกษาเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* C10 โดยไม่เติมกรดกลูตามิกจากภายนอก และเติมกรดออร์แกนิก 5 ชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตแทน ได้แก่ กรดออกซาลิก กรดอะซิติก กรดซักซินิก กรดมาลิก และกรดซิตริก เพื่อเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ พบว่าการเติมกรดซิตริกมีการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกในปริมาณสูงกว่ากรดออร์แกนิกตัวอื่น ๆ ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และได้กรดพอลิแกมมากลูตามิก เท่ากับ 27.7 กรัมต่อลิตร

Zhu F. และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตแกมมา-พีจีเอ โดยใช้เส้นใยซังข้าวโพดที่ถูกย่อยและไม่ถูกย่อย โดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* HB-1 พบว่าแกมมา-พีจีเอที่ผลิตได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน สรุปได้ว่า เชื้อที่ใช้มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยซังข้าวโพดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตแกมมา-พีจีเอได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อที่ใช้และสารเคมี

3.1.1 เชื้อที่ใช้

Bacillus megaterium SRU 02

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.2.1 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ (Pre-inoculated) และ Plate Count Agar (PCA)

Tryptone, Difco, U.S.A

Yeast extract, Difco, U.S.A

Dextrose, Difco, U.S.A

Agar agar, Difco, U.S.A

3.1.2.2 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth (LB)

Tryptone, Difco, U.S.A

Yeast extract, Difco, U.S.A

Sodium chloride, Carlo Erba, Italy

3.1.2.3 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

Ammonium chloride, Scharlau, Barcelona

Glucose, Univar, Australia

3.1.2.4 สำหรับวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริกแอซิด

Glucose, Univar, Australia

Phenol, Merck, Germany

Sulfuric, Merck, Germany

3.1.2.3 สำหรับการวิเคราะห์ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

Dinitrosalicylic acid (DNS), Carlo Erba, Italy

Sodium hydroxide, Carlo Erba, Italy

Potassium sodium tartrate, Carlo Erba, Italy

3.1.2.4 สำหรับการวิเคราะห์ค่ากรดแกมมาโพลีกลูตามิค

Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)

Ethyl alcohol 95 %

Sodium hydroxide, Univar, Australia

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

3.2 อุปกรณ์

เครื่องชั่ง (Balance), Mettler Toledo, Germany

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven), Heraeus, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, Heraeus, Germany
ตู้แช่แข็ง (Freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส, Sanyo, Japan
ตู้ดูดควัน (Fume hood), Heraeus, Germany
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) : ABS 1200, BossTech, Thailand
ไมโครเวฟ (Microwave) : MR-30A, Electrolux, China
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave), Tommy, Japan
ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร, Brand, Germany)
เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer), Scientific Industrirs, USA
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter), inolab, Germany
เครื่อง High speed Centrifuge : 3804R, Appendrop, Germany
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath), Memmert, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
เครื่องวัดดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
เครื่องเขย่าบ่มเชื้อ (Incubator shaker) : NB-205VL
หลอดเซนทริฟิวจ์ (Centrifuge tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50 250 และ 1000 มิลลิลิตร
กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 10 100 และ 1000 มิลลิลิตร
ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร
ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 10 100 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 16x150 มิลลิเมตร
ตะเกียงแอลกอฮอล์
แท่งแก้วคนสาร
ช้อนตักสาร
เข็มเขี่ยเชื้อ
คิวเวท
จานเพาะเชื้อ
ลูกแก้ว
ปากคีบ
ขวด M
ขวด Duran
ลูกยางแดง

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมอาหาร LB broth และ LB agar โดยชั่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tryptone 10 กรัม Yeast extract 5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นนำไปปรับ pH ให้ ได้ 7.0 และแบ่งออกมาทำ LB agar โดยเติม Agar เป็นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตรของ LB broth นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

3.3.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งมันสำปะหลัง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ จากแป้งมันสำปะหลัง ปริมาณ 30 50 70 100 120 และ 150 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว

3.3.1.3 การเลี้ยงเชื้อโดยกระบวนการหมักแบบกะ

เตรียมกล้าเชื้อโดยนำเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02 จากตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงโดยการ Streak plate ลงในที่มีอาหาร LB agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บโคโลนีเดี่ยว โดยเลี้ยงใน LB agar Slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ที่เลี้ยงมาทำการเขี่ยเชื้อ 1 ลูป ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth และเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงหัวเชื้อจนได้ค่าความขุ่น Optical density (OD) 1.0 ± 0.1 ที่ 600 นาโนเมตร และเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจากมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง

3.3.2 การตรวจวิเคราะห์ค่าผลการทดลอง

3.3.2.1 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธี Phenol sulfuric acid (Dubois และคณะ 1956)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้ สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลได้ในช่วง 1–100 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลอื่นในธรรมชาติที่อาจอยู่ในรูปของ mono- di- tri- oligo- และ polysaccharide โดยน้ำตาลเหล่านี้ จะทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารประกอบที่มีสี สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 480 – 490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligosaccharide และ polysaccharide พันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลถูกตัดออกจากกันด้วยกรดพร้อมทั้งเกิดปฏิกิริยาการขจัดน้ำออก และมีการแทนที่ด้วยอนุพันธุ์ของเฟอร์ฟูรอล (Furfural derivatives) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกับฟีนอลกลายไปเป็นสารประกอบไตรเอริลมีเทนที่มีสีส้ม (Triarylmethane dyes)

ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ 2 นาที เมื่อผสมเข้ากันแล้วเติมกรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid; H_2SO_4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จะได้สารละลายเป็นสีส้ม-เหลือง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3.3.2.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid method) (DNS method) (Miller 1959)

เป็นวิธีใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5–500

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อผสมเข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเป็นสีส้ม-เหลือง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน

3.3.2.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยวิธี Cetylmethyl ammonium bromide method (CTAB method)

การแยกตะกอนกรดพอลิแกมมากลูตามิกออกจากสารละลายตัวอย่างทำได้โดยนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างใส่ขวด ทำการตกตะกอนเติมเอทานอลเย็นปริมาตร 4 เท่าของตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำขวดสารละลายตัวอย่าง ที่ถูกเก็บไว้มาทำการแยกตะกอนแกมมา-พีจีเอ ออกจากสารละลาย โดยปั่นเหวี่ยงที่ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนใส เก็บตะกอนไว้แล้วเติมน้ำกลั่นใส่ลงไป 10 มิลลิลิตร นำไปตกตะกอนแป้งออกโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใส่เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดพอลิแกมมาลูตามิก (Chintrakool และคณะ, 2014)

ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยวิธี cetylmethylammonium bromide (CTAB) โดยปิเปตส่วนใส่ที่ได้จากการตกตะกอนแกมมา-พีจีเอ 2 มิลลิลิตรผสมกับ CTAB 2 มิลลิลิตร และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นวัดความเข้มข้นแกมมา-พีจีเอ โดยการค่าดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Kongklom และคณะ, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ศึกษาผลของกรดกลูตามิกที่มีต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02

จากการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(แป้งมันสำปะหลัง) ที่เติมกรดกลูตามิกและไม่เติมกรดกลูตามิก นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดกลูตามิกจะมีการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกออกมาในปริมาณที่มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดกลูตามิกเกือบ 3 เท่า จากผลการทดลองแสดงได้ว่าเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 เป็นเชื้อที่สามารถใช้แหล่งอาหารจากแป้งมันสำปะหลังในการเจริญและสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกได้โดยที่ไม่ต้องเติมกรดกลูตามิกซึ่งให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกมากกว่าอาหารที่เติมกรดกลูตามิก

ผลที่ได้จากการทดลองมีความแตกต่างกับงานวิจัยของ Tork และคณะ (2015) ซึ่งได้ศึกษาเชื้อกลุ่ม *Bacillus sp.* ที่สามารถสร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิก พบว่า *Bacillus licheniformis* NRC20 เป็นเชื้อที่เป็นอิสระจากกรดกลูตามิกในการสร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิก แต่สามารถทำให้ได้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูง ๆ โดยการเติมเติมกรดกลูตามิกจากภายนอกเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนของเชื้อ *Bacillus licheniformis* NRC20

ตารางที่ 4.1 ปริมาณการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดกลูตามิกและไม่เติมกรดกลูตามิก

อาหารเลี้ยงเชื้อ	กรดพอลิแกมมากลูตามิก (กรัมต่อลิตร)
เติมกรดกลูตามิก	7.00 ± 0.51
ไม่เติมกรดกลูตามิก	20.19 ± 4.31

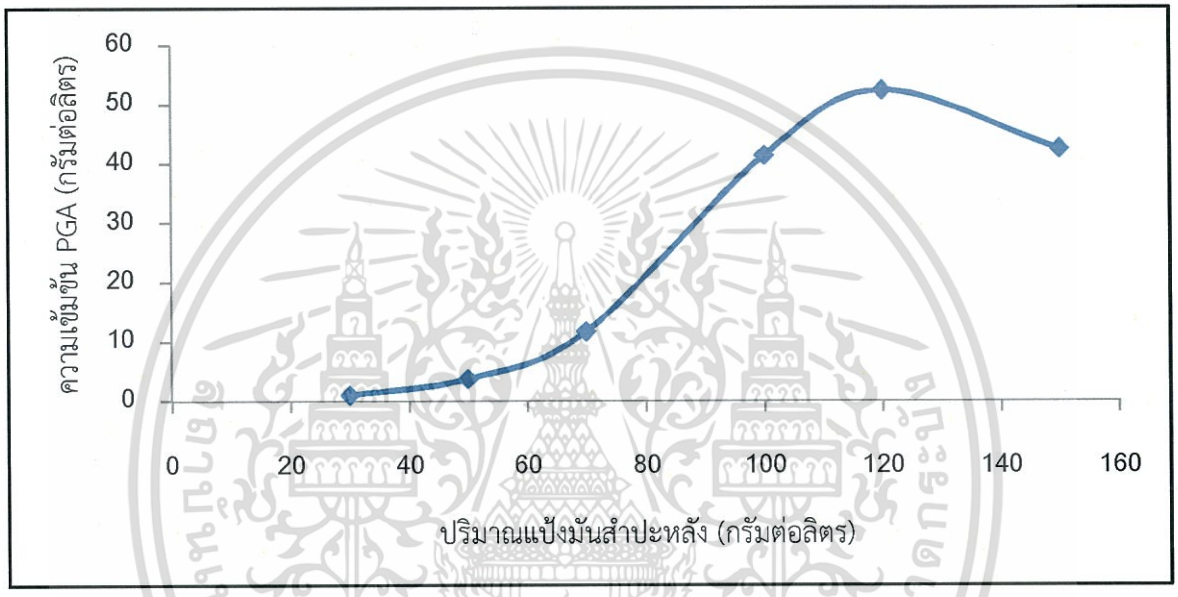
4.2 ศึกษาผลของปริมาณแป้งที่มีต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02

จากการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลัง ที่มีปริมาณความเข้มข้น 30 50 70 100 120 และ 150 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.1 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแป้งเพิ่มขึ้นจะทำให้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่เพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของแป้งที่ 120 กรัมต่อลิตร เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้สูงที่สุดถึง 52.3 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 มีคุณสมบัติเฉพาะตัวคือสามารถสร้างและปล่อยเอนไซม์อะไมเลสออกมาช่วยย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลแหล่งสารอาหารที่สำคัญในการเจริญและสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อได้ แต่ในขณะที่ความเข้มข้นของแป้ง 150 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้น้อยลงเพราะแป้งมีลักษณะแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นก้อนอาจทำให้เชื้อต้องใช้เวลาในการย่อยแป้งนานกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ จากผลการทดลองทำให้สามารถเลือกความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ได้คือ 120 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะนำความเข้มข้นของแป้งนี้ไปทำการศึกษาต่อในหัวข้อถัดไป

Pratima และPramod (1989) ได้ศึกษาการสังเคราะห์แอลฟาอะไมเลสของ *B. licheniformis* TCRDC-B13 โดยสภาวะของอุณหภูมิและอาหารที่แตกต่างไป พบว่าสังเคราะห์แอลฟาอะไมเลสได้ดีที่ pH 6-9 และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีแหล่งคาร์บอนคือ แป้งข้าวโพด และแหล่งไนโตรเจนคือเปปโตน



ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณความเข้มข้นต่างๆ

จากภาพที่ 4.1 ได้ผลที่สอดคล้องกับ Luana และคณะ (2012) ได้สรุปไว้ว่าเมื่อแหล่งคาร์บอนมีปริมาณที่สูงขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงขึ้นในช่วงเริ่มต้นการหมักเท่านั้น แต่ถ้ามีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินจะทำให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกลดลง

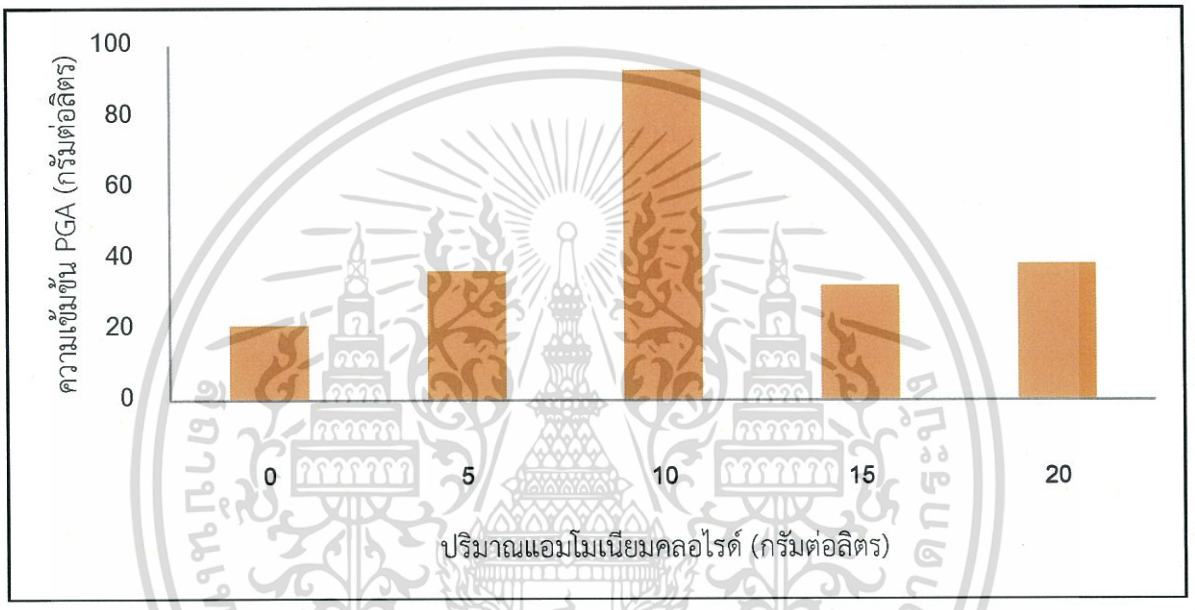
4.3 ศึกษาผลของปริมาณเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02

จากการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร และเติมเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยมีความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.2 พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร สามารถทำให้เชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิคได้สูงที่สุดถึง 92.92 กรัมต่อลิตร การเติมแหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นแหล่งสารอาหารสำรองจากแหล่งคาร์บอนมีผลต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยที่เป็นส่วนประกอบของการสร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิก (สุพัฒน์ และรสมันต์, 2551)

Luana และคณะ (2012) ได้ศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยเชื้อ *Bacillus velezensis* NRRL-23189 ที่มีมีส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นแหล่งไนโตรเจน คือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยมีความเข้มข้น 4 8 และ 12 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกมีปริมาณสูงกว่าเมื่อเติมในปริมาณ 4 และ 12 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ผลใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ทำขึ้นคือเมื่อเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตสูงที่สุดเช่นกัน



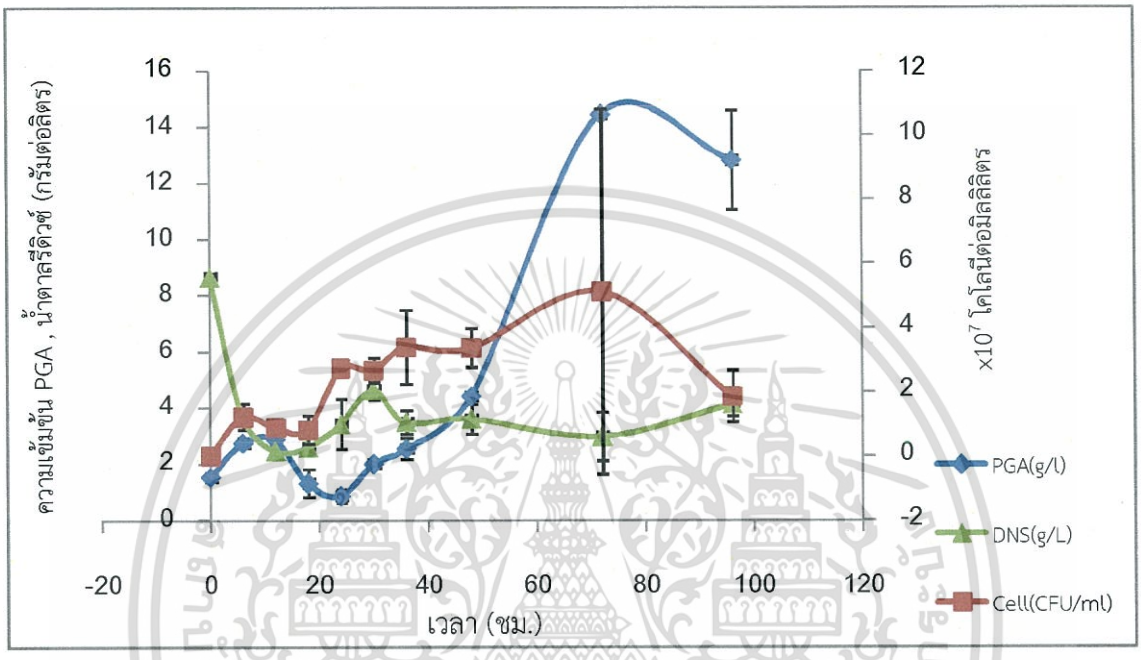
ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิคของเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร และปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

4.4 ศึกษาผลของระยะเวลาการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดพอลิ-แกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02

จากการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร และเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.3 พบว่าความเข้มข้นของกรดพอลิแกมมากลูตามิกมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเหมือนกับการเจริญของเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 แต่ในขณะเดียวกันความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มที่ตรงข้ามคือลดลงเรื่อย ๆ จนคงที่ สำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU 02 จะให้ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและชั่วโมงที่ 72 ให้ผลผลิตมากที่สุดถึง 14.46 กรัมต่อลิตร และปริมาณของแบคทีเรียก็เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น พบว่ามีปริมาณสูงสุดชั่วโมงที่ 72 และหลังจากนั้นปริมาณจะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากสารอาหารที่เชื้อใช้ในการเจริญเริ่มหมดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลที่ได้จากการทดลองสอดคล้องและเป็นไปตามงานวิจัยของ Zhu และคณะ (2013) ได้ทำการศึกศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากซังข้าวโพดที่ย่อยแล้วโดยเชื้อ *Bacillus subtillis* HB-1 ดำเนินในกระบวนการหมักแบบกะ พบว่ามีการใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 20 ชั่วโมง ความเข้มข้นของไซโลสจะลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และหลังจากชั่วโมงที่ 40 จะให้อัตราการผลิตที่สูงสุด แต่ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจะให้ปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 44 คือ 24.92 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงผลของระยะเวลาการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมา-กลูตามิกของเชื้อ *B. megaterium* SRU 02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

การศึกษาผลของกรดกลูตามิก ปริมาณแป้ง และปริมาณเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ที่มีต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02 โดยการเลี้ยง *Bacillus megaterium* SRU 02 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณกรดกลูตามิกที่ใส่เติมลงไปไม่มีผลต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้มากขึ้นเนื่องจากผลการทดลองที่ได้นั้นแสดงให้เห็นว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกรดกลูตามิกนั้นให้ผลผลิตได้มากกว่าถึง 3 เท่า การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02 คือความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังที่ 120 กรัมต่อลิตร และเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร สามารถให้ผลผลิตได้สูงที่สุดถึง 14.46 กรัมต่อลิตรที่เวลา 72 ชั่วโมง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 สำหรับการศึกษาผลของกรดกลูตามิก ปริมาณแป้ง และปริมาณเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ควรนับจำนวนเชื้อควบคู่ไปด้วยเพื่อที่จะได้ทราบว่าเมื่อปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณเชื้อหรือไม่

5.2.2 ในการวิเคราะห์สารควรเตรียมสารที่จะใช้วิเคราะห์จำนวนครั้งละมาก ๆ เนื่องจากตัวอย่างมีจำนวนเยอะ และหลายซ้ำ จะได้ไม่ให้เกิดการเบี่ยงเบนระหว่างการทดลอง

5.2.3 การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SRU 02 เป็นเชื้อตระกูลที่มีการสร้างสปอร์ เวลาจะนับเชื้อที่สร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิกควรนับเพียงโคโลนีไม่นับรวมสปอร์

5.2.4 ทำงานวิจัยเพิ่มเติมโดยศึกษาสภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยกระบวนการแบบกึ่งกะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

การแปรรูปและใช้ประโยชน์มันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.thailandtapiocastarch.net/download/download-th-17.pdf. 2 ธันวาคม 2558.

การสังเคราะห์กรดแกมมา-พอลิกลูตามิก. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.biotec.or.th/ TSB/ images/stories/journal/E-Mag%20Jan-May%202013.pdf. 18 พฤศจิกายน 2558.

โครงสร้างกรดแกมมา-พอลิกลูตามิก. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.lookchem.com/ Polyglutamic-acid/. 26 พฤศจิกายน 2558.

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

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

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี. การวิเคราะห์แอมโมเนีย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.fisheries.go.th/cf-chan/visit-water-room/ammonia/ammonia-page.htm. 2 ธันวาคม 2558.

ศศิเกษม ทองยงค์ และพรรณี เดชกำแหง. 2530. เคมีอาหารเบื้องต้น. โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ. 211.

สารลดแรงตึงผิว (Biosurfactant) และพอลิเมอร์ชีวภาพ (Biopolymer). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2411/8/242721_ch1.pdf. 7 พฤศจิกายน 2558.

สุรางค์ สุธิราวุธ. การนับโคโลนีของบาซิลลัส. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.doa.go.th/biotech/pdf-ktk/i_book_1.pdf. 25 พฤศจิกายน 2558.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2526. เอกสารประกอบการสอนวิชา วทอ.412 (ชีวเคมีอาหาร). ภาควิชาวิทยาศาสตร์แลและเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 152.

อาหารเลี้ยงเชื้อ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/3064/ 4/241012_app1.pdf. 2 ธันวาคม 2558.

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.

Braverman, J.B.S. 1963. Introduction to The Biochemistry of Foods. Elsevter Publishing Company, Amsterdam.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Buescher, J.M. and Margaritis, A. 2007. Microbial biosynthesis of poly glutamic acid biopolymer and applications in the biopharmaceutical, biomedical and food industries. Journal of Biotechnology. 27: 1-19.

Dubois,M.,Grilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. Colorimetric Method for determination of sugar and related substances Analytical Chemistry. 28: 350-356.

El Khadem, H.S. 1988. Carbohydrate chemistry. Academic press Inc., San Diego. 251.

French, d. 1969. Physical and Chemical Structure of Starch and Glycogen in Symposium o on Foods : Carbohydrate and Their Roles. Westport, Connecticut. 458.

Hajdu, I., Bodnar, M., Csikos, Z., Wei, S., Daroczi, L., Kovacs, B., Gyori, Z., Tamas, J. and Borberly, J. 2012. Combined nano - membrane technology for removal of lead ions. Journal of Membrane Science. 409-410, 44-53.

Inbaraj, B. S., Chiu, C. P., Ho, G. H., Yang, J. and Chen, B. H. 2006. Removal of cationic dyes from aqueous solution using an anionic poly-γ-glutamic acid-based absorbent. Journal of Hazardous Materials. 137: 226-234.

Ishwar, B. and Rekha, S. 2011. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial Interest. Bioresource Technology. 102: 5551–5561.

Luana, P, M., Ranulfo, M, A. and Priscila, N, B. 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. 618-623.

Methawee, C.,Nuttawut, K. and Sarote, S. 2014. The production of poly- γ - glutamic acid from monosodium glutamate waste (ami-ami) by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. 26: 222-228.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31: 420-428.

Nielsen, S.S. 2003. Food Analysis. 3rd Edition. Kluwer Academic /Plenum Publishers, New York. 557.

Nuttawut, K., Luo, H., Shi, Zh.,Chiravoot, P., Chisti, Y. and Sarote, 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.

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.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

148870

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, IL. And Van, YT. 2001. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. Bioresource Technology. 79: 207-225.

Tork, S. E. Aly, M. M. Alakili, 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

Triebold, H.O. and Leonard, W.A. 1963. Food Composition and Analysis. Van Nostrand Reinhold company, New York. 497.

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

Yokoi, H., Natsuda, O., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1995. Characteristics of a Biopolymer flocculant produced by *Bacillus sp*. PY-90. Journal of Fermentation and Bioengineering. 79: 378-380.

Yoon, S. H., Do, J. H., Lee, S. Y. and Chang, H. N. 2000. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. Biotechnology Letters. 22: 585-588.

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, Zh. 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, Q., Cen, P. and Xu, Zh. 2013. A novel approach for poly-γ -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 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีและการคำนวณ

ก.1 การเตรียมสารละลาย Hydrochloric acid (HCl) ความเข้มข้น 2 นอร์มอล

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

จากสูตร $C = \frac{10dx}{MW}$

โดย C = ความเข้มข้น หน่วยเป็น นอร์มอล

d = ความหนาแน่น (density) หน่วยเป็น กรัมต่อมิลลิลิตร

x = %ปริมาณเนื้อกรด

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

$= 12.06$ นอร์มอล

ดังนั้น กรด HCl เข้มข้น 37% (W/W) มีความเข้มข้น 12.06 นอร์มอล ถ้าต้องการเตรียมกรด HCl เข้มข้น 2 นอร์มอล 250 มิลลิลิตร จากกรด HCl ความเข้มข้น 12.06 นอร์มอล จะทำการเจือจางความเข้มข้นดังกล่าวโดยคำนวณปริมาตรที่ต้องเจือจาง

จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$12.06 \times V_1 = 2 \times 250$

$V_1 = 41.46$ มิลลิลิตร

ปิเปตกรด HCl conc. มา 41.46 มิลลิลิตรแล้วเจือจางเป็น 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

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

จะได้ $g = \frac{(2 \times 100 \times 39.99)}{1000}$

$= 8$ กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่ง NaOH มา 8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยการเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

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

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วยสาร

3, 5-Dinitrosalicylic acid 10 กรัม

Sodium hydroxide 16 กรัม

Potassium sodium tartrate 300 กรัม

ชั่งสาร 3,5-Dinitrosalicylic acid 10 กรัม ลงในบีกเกอร์ ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และชั่ง NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมสารละลายด่างทีละน้อยลงไปในสารละลาย คนให้เข้ากันนำไปอังบนอ่างควบคุมอุณหภูมิจนสารละลายใส เติม Potassium sodium tartrate ลงไปทีละน้อยจนครบ 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

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

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

g = 12.76 กรัม

NaOH 2% ใน CTAB ความเข้มข้น 0.07 โมลาร์

CTAB 100 มิลลิลิตร ใช้สาร NaOH 2 กรัม

ถ้า CTAB 500 มิลลิลิตร ใช้สาร NaOH (2 x 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมกราฟมาตรฐาน

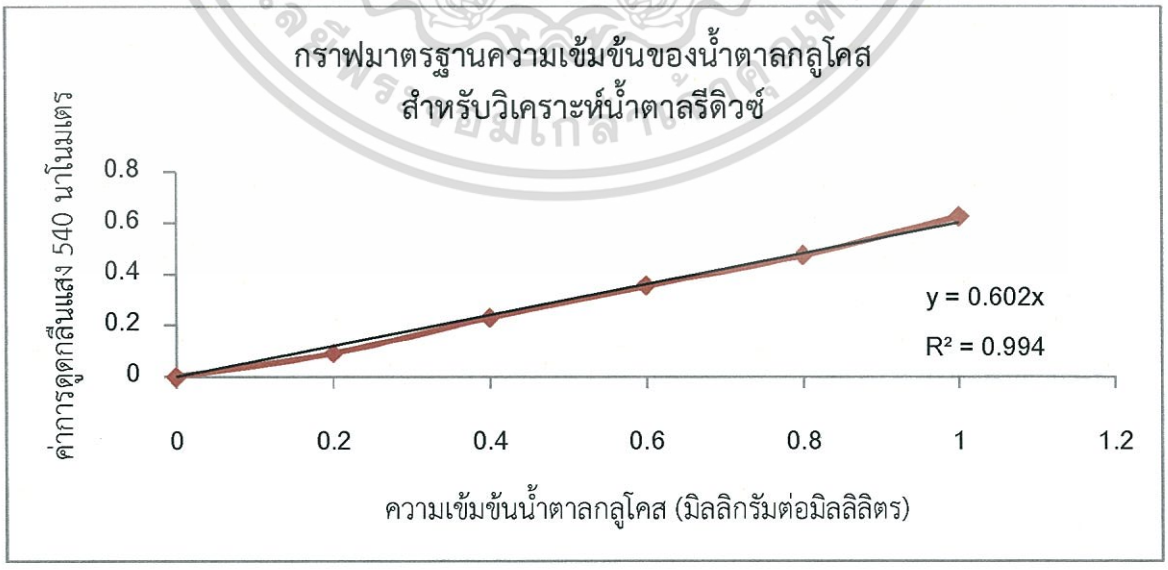
ข.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคสสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ข.1 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	การเจือจาง		ค่า Abs ที่ 540 นาโนเมตร
		สารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	
1	0.2	0.2	0.8	0.092
2	0.4	0.4	0.6	0.230
3	0.6	0.6	0.4	0.355
4	0.8	0.8	0.2	0.473
5	1.0	1.0	0	0.624
6	blank	0	1.0	0

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) = (ค่าการดูดกลืนแสง x อัตราการเจือจาง) /ความชัน



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตรสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

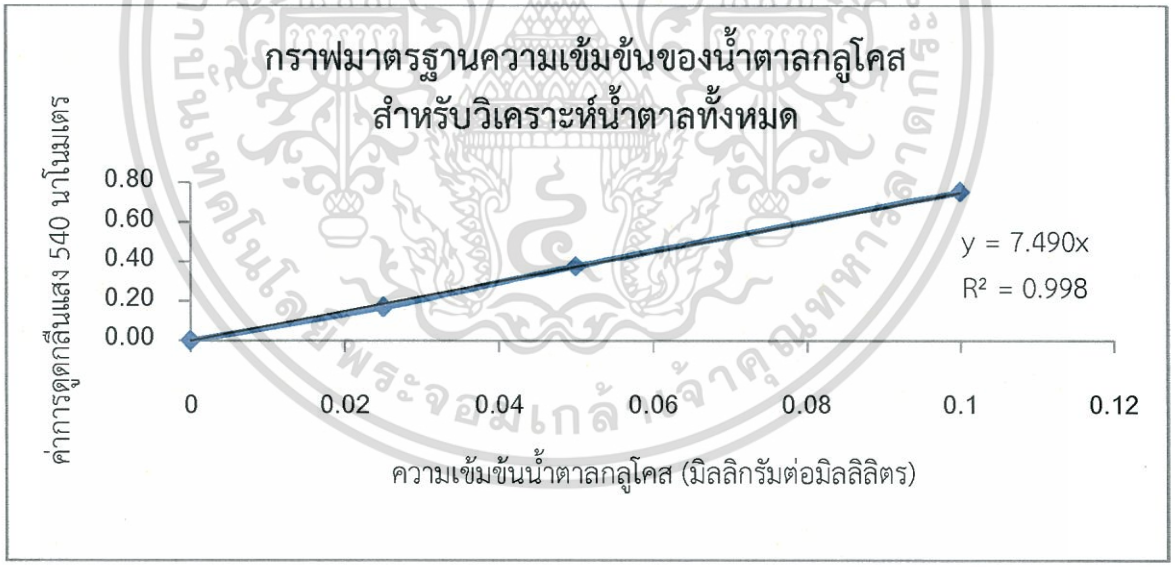
ข.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคสสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายน้ำตาลกลูโคส 0.05 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.025 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ข.2 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	การเจือจาง		ค่า Abs ที่ 540 นาโนเมตร
		สารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	
1	0.025	0.05	0.95	0.169
2	0.05	0.10	0.90	0.376
3	0.1	0.20	0.80	0.753
4	blank	0	1.0	0

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) = (ค่าการดูดกลืนแสง x อัตราการเจือจาง) /ความชัน



ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตรสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

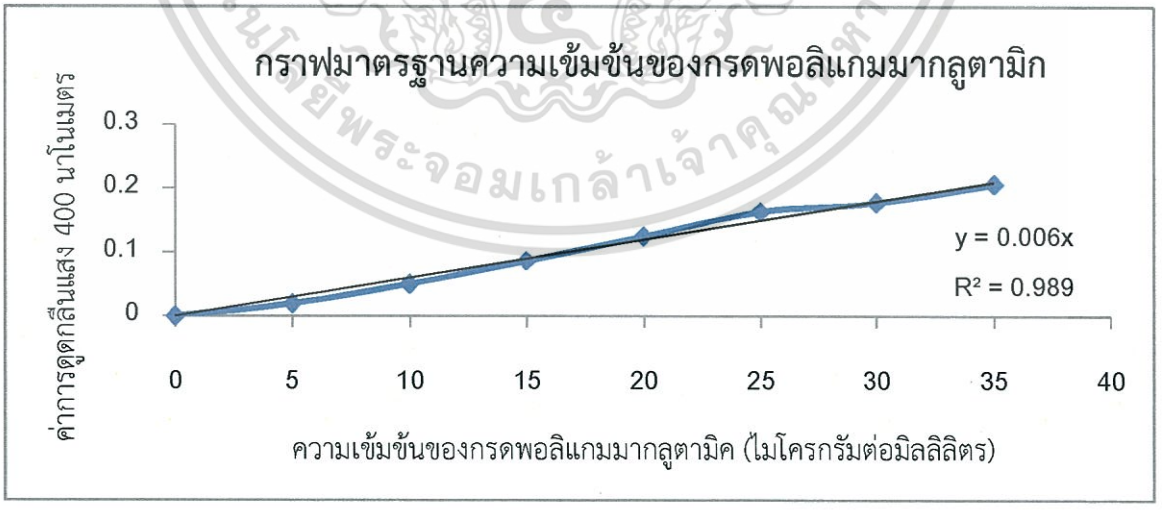
ข.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิก ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิก 0.002 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิก มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 5 10 15 20 25 30 และ 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ข.3 การเจือจางสารละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิกมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ความเข้มข้น γ-PGA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	การเจือจาง		ค่า Abs ที่ 400 นาโนเมตร
		สารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	
1	0	0	5	0
2	5	0.62	4.37	0.020
3	10	1.25	3.75	0.050
4	15	1.87	3.12	0.087
5	20	2.50	2.50	0.125
6	25	3.12	1.87	0.164
7	30	3.75	1.25	0.178
8	35	4.37	0.62	0.207

ปริมาณ γ-PGA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = (ค่าการดูดกลืนแสง x อัตราการเจือจาง) /ความชัน



ภาพที่ ข.3 กราฟมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ค่าการดูดกลืนแสง 400 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	ปิยาพัชร นาระคล
วัน เดือน ปี เกิด	15 สิงหาคม 2537
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนพรตพิทยพยัต
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
	สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมเกษตร
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	บริษัท กรีนสปอต จำกัด
และผลงานวิจัย	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02
	(The study of optimum condition for Poly-γ-glutamic acid production from cassava starch by *Bacillus megaterium* SRU 02)

ชื่อ-นามสกุล	อิสราภรณ์ วิรุฬหธาดาพงศ์
วัน เดือน ปี เกิด	9 กรกฎาคม 2537
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนสารสาสน์วิเทศนิมิตใหม่
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
	สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมเกษตร
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	บริษัท ส.ขอนแก่น ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
และผลงานวิจัย	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* SRU 02
	(The study of optimum condition for Poly-γ-glutamic acid production from cassava starch by *Bacillus megaterium* SRU 02)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้