การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลัง

Production of poly-γ-glutamic acid from cassava starch

วรวลัญช์ ถาจันทึก
สาวิตรี บุญครอง
สุพรรษา โคพระ

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลัง

Production of poly-γ-glutamic acid from cassava starch

จัดทำโดย

นางสาววรวลัญช์	ถาจันทึก	รหัสนักศึกษา	59080121
นางสาวสาวิตรี	บุญครอง	รหัสนักศึกษา	59080122
นางสาวสุพรรษา	โคพระ	รหัสนักศึกษา	59080123

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

W. Sriphachanart ..... 13 / ก.ค. / 2563

(ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลัง
ชื่อนักศึกษา	วรวลัญช์ ถาจันทึก รหัสนักศึกษา 59080121
	สาวิตรี บุญครอง รหัสนักศึกษา 59080122
	สุพรรษา โคพระ รหัสนักศึกษา 59080123
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. วิรามศรี ศรีพจนารถ

บทคัดย่อ

กรดพอลิแกมมากลูตามิกเป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยจุลินทรีย์ เป็นโฮโมพอลิเมอร์ของกรดกลูตามิกที่ไม่เป็นพิษ, ละลายในน้ำ และย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งในการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมา-กลูตามิกใช้เชื้อจุลินทรีย์ คือ *Bacillus* spp. การใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่มีราคาถูกเป็นสารตั้งต้นเพื่อทดแทนสารสังเคราะห์ที่มีต้นทุนสูงในการหมักทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาหาชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ E ที่เติมกรดแอลกลูตามิกและไม่เติมกรดแอลกลูตามิก หาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อที่จะผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยเชื้อ *Bacillus velezensis* และใช้กระบวนการแซ็กคาริฟิเคชันด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ใช้เป็นสารตั้งต้น ย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 130 ยูนิตต่อกรัม และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 80 ยูนิตต่อกรัม พบว่า เชื้อ *Bacillus velezensis* เป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการกรดแอลกลูตามิกในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก และสามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้สูงสุดที่แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงสุดเท่ากับ 0.105 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ: กรดพอลิแกมมากลูตามิก *Bacillus velezensis* แป้งมันสำปะหลัง เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Production of poly-γ-glutamic acid from cassava starch	
Student name	Worrawalan Tajantuek	Student ID 59080121
	Savitree Boonkrong	Student ID 59080122
	Supansa Kopra	Student ID 59080123
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology	
Year	2020	
Advisor	Dr. Wiramsri Sriphochanart	

ABSTRACT

Poly-γ-glutamic acid (PGA) synthesized by microbes, is a homopolymer of glutamic acid, non-toxic, water-soluble and biodegradable. The synthesis of PGA use *Bacillus* spp. Using inexpensive agricultural raw materials as a substrate to replace high-cost synthetic substances can reduce the cost of production of PGA. The objective of this research is to study the type of *Bacillus* spp. that produce PGA by using medium E that contains L-glutamic acid and without L-glutamic acid.The concentration of cassava starch for the PGA production by Bacillus velezensis was investigated. The saccharification process using α-amylase and glucoamylase to break down starch into sugar was carried out. Cassava starch at the concentration of 20, 40, 60 and 80 g/L and 10 g/L of ammonium chloride were used as substrate. The α-amylase at concentration of 130 units/g and glucoamylase at concentration of 80 units/g. were used for the starch hydrolysis. The result found that *B. velezensis* is bacteria glutamic acid independent type in the produce PGA. *B. velezensis* produced the highest amount of PGA at cassava starch concentration of 80 g/L. The maximum yield of PGA was 0.105 g/L.

Key words: Poly-γ-glutamic acid, *Bacillus velezensis*, cassava starch, α-amylase, glucoamylase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปัญหาพิเศษในหัวข้อเรื่อง การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลัง (Production of poly-γ-glutamic acid from cassava starch) สำเร็จลุล่วงได้ดีเนื่องจากได้รับคำปรึกษาคำแนะนำข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ รวมไปถึงการแก้ไขปัญหาต่างๆ

ขอขอบพระคุณ ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ เป็นอย่างสูง ที่ให้เกียรติเป็นที่ปรึกษาปัญหาพิเศษคอยให้คำปรึกษาดูแลเอาใจใส่และแนะนำติชมต่างๆ รวมทั้งตรวจทานแก้ไข การทำปัญหาพิเศษนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่กรุณาเป็นกรรมการและคอยช่วยเหลือในการศึกษาปัญหาพิเศษครั้งนี้เป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณพี่นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติที่คอยให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกระหว่างปฏิบัติงานทำให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอพระคุณคุณพ่อคุณแม่เป็นอย่างสูง ที่ช่วยส่งเสริมด้านกำลังใจและคอยช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนทุกคนที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุกๆด้าน จนทำให้การทำปัญหาพิเศษนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้หากมีความผิดพลาดประการใดทางคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้และหวังอย่างยิ่งว่ารายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ของผู้ศึกษาเป็นอย่างดี

วรวลัญช์ ถาจันถึก
สาวิตรี บุญครอง
สุพรรษา โคพระ
13 กรกฎาคม 2563

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... IV
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... IV
กิตติกรรมประกาศ..... IV
สารบัญ..... IV
สารบัญตาราง..... VI
สารบัญภาพ..... VII
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 2
2.1 กรดพอลิแกมมากลูตามิก (poly-γ-glutamic acid, PGA)..... 2
2.2 ชนิดของแบคทีเรียที่สังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก..... 3
2.3 วิถีการสังเคราะห์ PGA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp..... 5
2.4 สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย..... 5
2.5 *Bacillus velezensis*..... 6
2.6 การใช้แป้งเป็นสารอาหารสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก..... 6
2.7 กระบวนการแซ็กคาริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์..... 8
2.8 การนำไปประยุกต์ใช้..... 9
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 10
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี..... 10
3.2 อุปกรณ์..... 11
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง..... 12
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 15
4.1 ศึกษาผลของกรดแอลกลูตามิกที่มีผลต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus velezensis* และ *Bacillus subtilis*..... 15
4.2 ศึกษาผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เติมเอนไซม์ต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus subtillis*..... 17
4.3 ศึกษาผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เติมเอมไซม์ต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacilus velezensis*..... 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 ศึกษาผลของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus velezensis*..... 19
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ..... 21
5.1 สรุปผลและการทดลอง..... 21
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 21
บรรณานุกรม..... 22
ภาคผนวก..... 25
ภาคผนวก ก..... 26
ภาคผนวก ข..... 28
ประวัติผู้เขียน..... 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ E.....	12
4.1	การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus velezensis* และ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ E ที่เติมกรดแอลกลูตามิกและไม่เติมกรดแอลกลูตามิก.....	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของกรดพอลิแกมมากลูตามิก.....	2
2.2	การสังเคราะห์ PGA.....	4
2.3	โครงสร้างอะไมโลส.....	6
2.4	โครงสร้างอะไมโลเพกติน.....	6
4.2	ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. subtillis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร.....	17
4.3	ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B.velezensis* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่เติมเอมไซม์มีปริมาณความเข้มข้นต่างกันที่ 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร.....	18
4.4	การเจริญของเชื้อ *B. velezensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร และ แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....	20
4.5	ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. velezensis* ใน อาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร และ แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดพอลิแกมมากลูตามิก เป็นโฮโมพอลิเมอร์ของกรดกลูตามิก ที่ไม่เป็นพิษ, ละลายในน้ำ, และย่อยสลายได้ทางชีวภาพ กรดพอลิแกมมากลูตามิก ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม เช่น ใช้ในการผลิตไฮโดรเจล, สารที่ช่วยในการตกตะกอน, สารเพิ่มความข้นหนืด และสารที่ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง เป็นต้น ซึ่งในการสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ คือ *Bacillus* spp. เพราะเป็นเชื้อที่สามารถนำมาทำการหมักและให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยความต้องการสารอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการเจริญเติบโตและใช้ในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ ซึ่งสารอาหารหลักที่สำคัญได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และยังรวมไปถึงวิตามินหรือเกลือแร่ต่างๆ ที่จะเป็นตัวช่วยในการส่งเสริมให้การเจริญจุลินทรีย์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยในการส่งเสริมการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกให้ได้ปริมาณที่สูงตามต้องการ ในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกนั้นส่วนมากจะใช้สารอาหารที่สังเคราะห์ขึ้นมา ส่งผลให้การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมมีราคาแพง

ดังนั้นจึงต้องหาแหล่งของสารอาหารที่จะนำไปใช้ในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ให้มีราคาถูกลงโดยการนำเอาวัตถุดิบทางการเกษตรมาใช้เป็นสารตั้งต้น เพื่อเป็นการทดแทนสารสังเคราะห์ที่มีราคาสูงและเป็นการนำวัตถุดิบทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยมีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนครบตามที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ ซึ่งในการวิจัยนี้จะเป็นการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นเพื่อศึกษาการนำแป้งมันสำปะหลังมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลเพื่อเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก เพราะหาซื้อง่าย และราคาถูก

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 ศึกษาหาชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้

1.2.2 ศึกษาหาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบถึงกระบวนการผลิตและปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากกระบวนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง

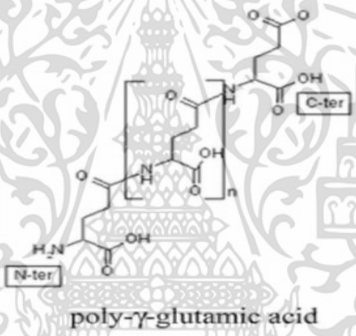
1.3.2 สามารถเพิ่มมูลค่าให้กับแป้งมันสำปะหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดพอลิแกมมากลูตามิก (poly-γ-glutamic acid, PGA)

PGA เป็นสารพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็นแบบโฮโมพอลิเมอร์ของกรดกลูตามิก ที่มี amide linkage เป็นตัวเชื่อมระหว่าง α-amino groups และ γ-carboxylic acid groups ดัง ที่ประกอบด้วย D-glutamic acid (D-form) และ L-glutamic acid (L-form) (Moraes และคณะ, 2013) PGA มีโครงสร้างของกรด D- และ L-glutamic 5,000 - 10,000 หน่วย ที่สร้างสารละลายที่มีความหนืดสูงเมื่อสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีความหนืดสูงสุดที่สังเกตได้ภายใต้สภาวะของค่า pH เป็นกลาง ซึ่งเป็น extracellular biopolymer ทั่วไปแล้วพบว่า *Bacillus* spp. สามารถผลิต PGA ซึ่งเป็นสารที่แบคทีเรียปล่อยออกมาสู่ภายนอกเซลล์ทำให้เกิดความเหนียวหนืด เมื่อเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะการเจริญที่คงที่ (stationary phase) (คณวิชช์, 2560)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของกรดพอลิแกมมากลูตามิก
ที่มา: Candela และ Fouet (2006)

Ivanovics และคณะ (1937) ได้ค้นพบ PGA เป็นครั้งแรก โดยพบในส่วนประกอบที่มีอยู่ในแคปซูลของ *B. anthracis* เมื่อหลั่งออกสู่สิ่งแวดล้อมจะมีลักษณะเหนียวหนืด และจะปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเซลล์แก่หรือเซลล์แตก PGA ที่พบเห็นได้ง่ายได้แก่สารเหนียวหนืดที่มีอยู่ในถั่วเน่า (natto)

Goto และKunioka (1992) ศึกษาวิธีการหมักโดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ของ *B. subtilis* ที่มีความสามารถในการปล่อย PGA ออกมาได้อย่างอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อและยังพบว่า *Bacillus* อีกหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิต PGA ได้โดยการปล่อยสารออกมานอกเซลล์ (Extracellular Biopolymer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

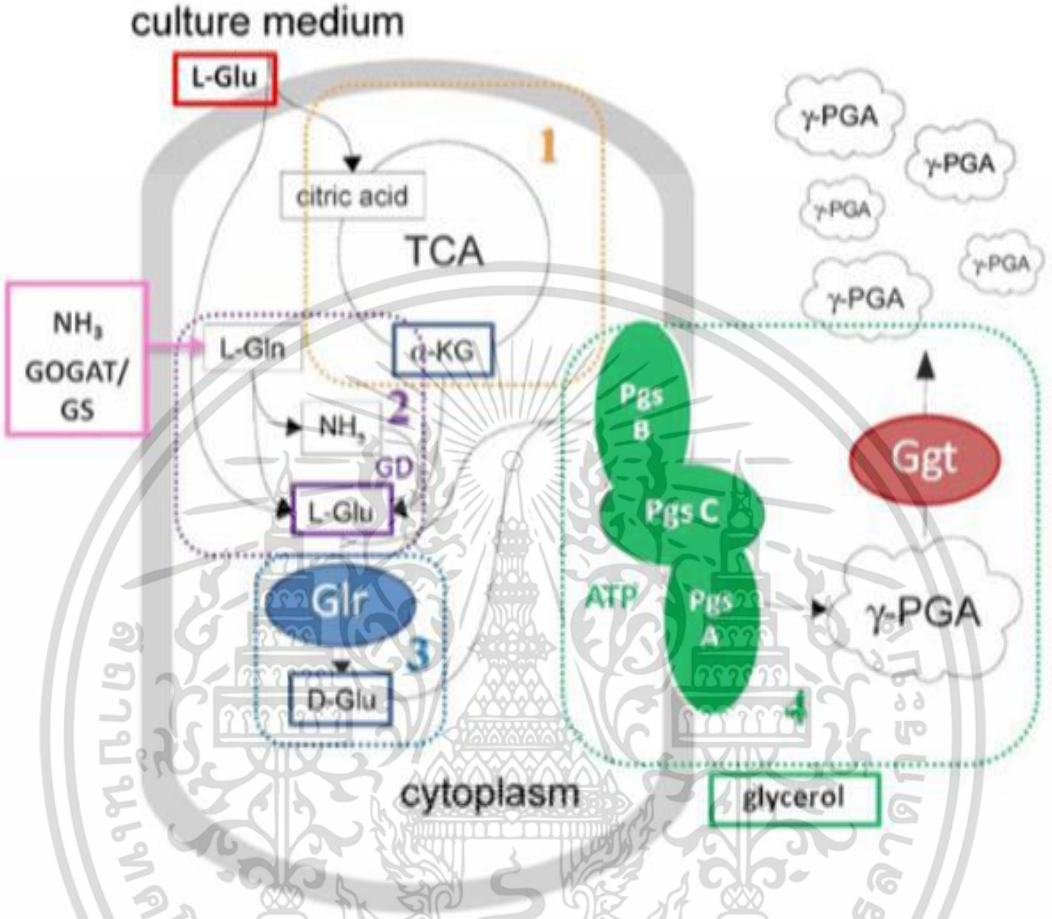
2.2 ชนิดของแบคทีเรียที่สังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก

เนื่องจากเราสามารถค้นพบแบคทีเรียที่ผลิตสารที่มีลักษณะเหนียวหนืดชนิดของแบคทีเรียที่สังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิก การสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยแบคทีเรียโดยจำแนกตามองค์ประกอบของสารอาหารในการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ (Bajaj และSinghal, 2011)

1) กลุ่มที่ต้องเติม L-glutamic acid ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (L-glutamic acid-dependent) เพื่อช่วยกระตุ้นในการสร้างแกมมา-พีจีเอและการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *B. anthrocis*, *B. licheniformis* ATCC9945A, *B. subtillis* IFO 3335, *B. subtillis* F-2-01 และ *B. subtillis* NX-2

2) กลุ่มที่ไม่ต้องเติม L-glutamic acid ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (L-glutamic acid-independent) มีรายงานการศึกษาวิถีการสร้าง PGA จำนวนน้อยมาก เช่น วิถีการสร้าง PGA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtillis* TAM-4, *B. licheniformis* A35 และ *B. subtillis* 5E เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 การสังเคราะห์ PGA
ที่มา: ณัฐวุฒิ คงกล่อม และคณะ (2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 วิถีการสังเคราะห์ PGA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp.

จากภาพที่ 2.2 เริ่มต้นโดยเป็นการสังเคราะห์ α-ketoglutarate (α-KG) ในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) โดยใช้กรดซิตริกเป็นสารตั้งต้น หลังจากนั้นจะเป็นการสร้างกรดกลูตามิก (L-Glu) จาก α-ketoglutarate (α-KG) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutamate dehydrogenase (GD) ร่วมกับการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์Glutamine-synthetase (GS) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างกรดแอล-กลูตามิก (L-Glu) ให้เป็นกรดดีกลูตามิก (D-Glu) โดยอาศัยการทางานของเอนไซม์ Glutamic acid racemase (Glr) หลังจากนั้นกรดกลูตามิก (L-Glu) จะถูกสังเคราะห์ให้เป็น PGA ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์โดยการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ Poly (glutamic acid) synthetase (PgsBCA) ร่วมกับ ATP และปลดปล่อย PGA ออกสู่ภายนอกเซลล์ต่อไป (Fujii, 1963)

Bacillus spp. สร้าง PGA ขึ้นมาเพื่อดำรงชีวิตอยู่ ซึ่ง PGA เป็นสารเมทาไลท์ทุติยภูมิ เซลล์จะเริ่มสร้าง PGA เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารให้เก็บเซลล์ เป็นแอนติบอดี้ (Antibody) ช่วยรักษาสภาพของเซลล์ ป้องกันการเจริญจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่จำเป็นต่อการผลิต PGA หากทำการหมักต่อไปเรื่อยๆ แล้วสารอาหารตั้งต้นลดน้อยลงจะทำให้เซลล์เกิดย่อย PGA โดยใช้เอนไซม์ γ-glutamyltranspeptidase (GGT) ให้ได้เป็นกลูตาเมต เพื่อนำกลูตาเมตไปใช้เป็นสารอาหารในการดำรงชีวิตอยู่ต่อไป (Kimura และFujimoto, 2010)

2.4 สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

ในการผลิต PGA ในระดับอุตสาหกรรมนั้น จำเป็นต้องมีการผลิต PGA เพื่อให้ได้ปริมาณมากที่มาก ดังนั้นจำเป็นต้องควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA โดยมีการศึกษาการนำเชื้อ *Bacillus toyonensis* As8 เพาะเลี้ยงแบบ submerged fermentation pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ซึ่งผลิต PGA ได้สูงสุด 22.26 กรัมต่อลิตร (Odeniyi และAvoseh, 2018)

Cromwick และ Gross (1996) ได้ใช้ *B. licheniformis* ATCC 9945A ที่เจริญใน medium E medium E ประกอบด้าย กรดแอลกลูตามิก 20 กรัมต่อลิตร กรดซิตริก 12 กรัมต่อลิตร กลีเซอรอล 80 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์ 7 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร เฟอร์ริกคลอไรด์ 0.04 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.15 กรัมต่อลิตร และแมงกานีสซัลเฟต 0.104 กรัมต่อลิตร แบบ batch fermenter ได้ศึกษาผลของ pH และอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ซึ่ง pH ที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ 5.5, 6.5, 7.4 และ 8.25 ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์รวม ไปถึงแหล่งคาร์บอนและ L-glutamate มีผลต่อการผลิต PGA ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการ ผลิต PGA คือกรดซิตริกที่ pH 6.5 อัตราการให้อากาศ 0.5-2.01 ลิตรต่อนาที โดยจะมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมและการผลิต PGA ได้สูงสุด 15 กรัมต่อลิตร

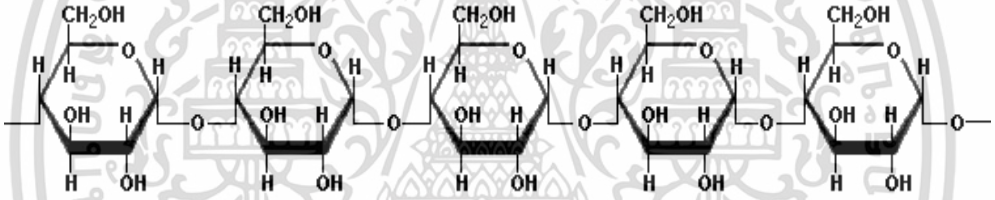
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 *Bacillus velezensis*

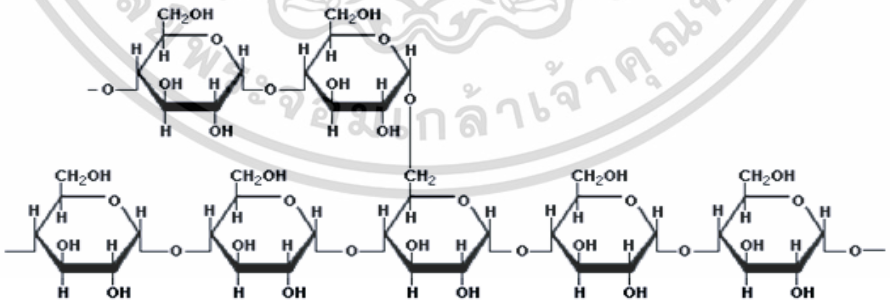
Bacillus velezensis ถูกพบครั้งแรกจากตัวอย่างน้ำกร่อยที่นำมาจากแม่น้ำทางตอนใต้ของประเทศสเปน เป็นแบคทีรียที่มีลักษณะเป็นแท่งแกรมบวก เซลล์มีทั้งเดี่ยวและคู่ใน Endospore เป็นรูปวงรี เคลื่อนที่ได้ด้วย flagella ลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Trypticase soy agar โคโลนีที่ปรากฏเป็นครีมสีขาวที่มีลักษณะแตกแขนงมีขอบล็กน้อย ลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Trypticase soy broth ที่เป็นของเหลวนั้นจะเกิดฟิล์มบาง ๆ *Bacillus velezensis* สามารถเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 12% ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร และสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15 ถึง 45 องศาเซลเซียส และที่ค่า pH เท่ากับระหว่าง 5 และ 10 แต่ไม่เจริญในสภาวะ anaerobic (Ruiz-Garcia และคณะ, 2005)

2.6 การใช้แป้งเป็นสารอาหารสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

แป้ง เป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ในพืชชั้นสูง สะสมอยู่ในเมล็ด ราก หัว ลำต้น และใบของพืช เช่น ข้าว มัน เผือก ธัญพืช โมเลกุลของแป้งเกิดจากน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซดิก เป็นจำนวนมากในรูปของพอลิเมอร์เชิงเส้นตรงหรืออะไมโลส และพอลิเมอร์เชิงกิ่งก้านหรืออะไมโลเพกทิน เมื่อแป้งถูกย่อยถึงขั้นตอนสุดท้ายจะได้น้ำตาลกลูโคส (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2546)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างอะไมโลส
ที่มา https://www.scientificpsychic.com/fitness/starch.gif



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างอะไมโลเพกติน
ที่มา https://image.dek-d.com/25/2315457/108678917

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yong และคณะ (2011) สำหรับการผลิต PGA โดย *Bacillus amyloliquefaciens* C1 ในการหมักแบบ solid-state (SSF) โดยอาหาร SSF ที่เหมาะสม จะต้องมีสารตั้งต้น 20 กรัมที่มีความชื้นเริ่มต้น 50% สำหรับการผลิต PGA ในอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีปุ๋ยหมัก dairymanure 5.51 กรัม เค้กถั่วเหลือง 1.91 กรัม แป้งข้าวโพด 0.57 กรัม monosodium glutamate residues 2.15 กรัม รำข้าวสาลี 1.5 กรัม เค้กเรพสีด 0.5 กรัม กรดซิตริก 0.1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 กรัม และ แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการผลิตได้มากถึง 0.0437 กรัมPGAต่อกรัมของสารตั้งต้น

Wang และคณะ (2017) เป็นการศึกษาการผลิต PGA โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิต ก่อนที่จะทำแป้งข้าวโพดเข้าสู่กระบวนการหมัก มีการย่อยแป้งข้าวโพดให้เป็นน้ำตาลโดยอาศัยกระบวนการแซ็กคาริฟิเคชันของเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส วิธีการก็คือ นำแป้งข้าวโพดผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 : 3 ในถัง นำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ที่ pH 6.7 – 7.0 จากนั้นใช้แอลฟาอะไมเลส 20 KU/g โดยลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วอยู่ที่ประมาณ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับ pH ของของเหลวเป็น 4.5 ด้ายกรดไฮโดรคลอริก หลังจากนั้นเติมกลูโคอะไมเลส 50 KU/g บ่มไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แป้งข้าวโพดก็จะเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลและนำไปใช้ในกระบวนการผลิต PGA โดย *Bacillus subtilis* 115 ในถังหมัก 30 ลิตร โดยมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย น้ำตาล 200 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.42 กรัมต่อลิตร เปปโตน 4 กรัมต่อลิตร โมโนโซเดียมกลูตาเมต 50 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ 12 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1.25 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 4 กรัมต่อลิตร และแมงกานีสซัลเฟต 0.08 กรัมต่อลิตร โดยควบคุมการกวน 150 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิระหว่าง 36.5 องศาเซลเซียส และ 37.5 องศาเซลเซียส ซึ่งได้ผลผลิต PGA ที่ 35 กรัมต่อลิตร

Odeniyi และAvoseh (2018) เป็นการศึกษาการผลิต PGA โดยใช้ผลพลอยได้ทางการเกษตรมาเป็นสารตั้งต้น โดยมีการใช้เปลือกมันสำปะหลังมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิต PGA ใช้เชื้อ *Bacillus toyonensis* As8 ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล วิธีการคือ นำเปลือกมันสำปะหลังมาทำการแปลสภาพโดยบดและร่อนให้อยู่ในลักษณะผง หลังจากนั้นละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร นำไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการผลิต PGA โดยอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย กรดแอลกลูตามิก 20 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.02 กรัมต่อลิตร และ เฟอร์ริคคลอไรด์ 0.05 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจะถูกบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ในตู้อบแบบเขย่า ที่ 150 รอบต่อนาที 96 ชั่วโมง ได้ผลผลิต PGA 22.26 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 กระบวนการแซ็กคาริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์

การเกิดแซ็กคาริฟิเคชัน (saccharification) เป็นการไฮโดรไลซ์โมเลกุลของแป้ง ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือน้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลโมเลกุลคู่ คือ น้ำตาลมอลโทส (maltose) ด้วยการใช้เอนไซม์ เช่น amylase, amyloglucosidase เป็นต้น

Anuradha และคณะ (1999) เป็นการศึกษากระบวนการ saccharification โดยการหมักแป้งในการผลิตกรดแลกติก โดยการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส วิธีการคือ โดยการนำแป้งมัน 50 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้น ใส่ในอ่างน้ำที่ 100 องศาเซียลเซียส โดยการปรับค่า pH เป็น 6 โดยใช้กรด-ไฮโดคลอริก แล้วเติมเอนไซม์อะไมเลส 0.1% ต่อกรัมน้ำหนักแป้งมัน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากลดอุณหภูมิให้เหลือที่ 60 องศาเซลเซียส แล้วปรับค่า pH เป็น 4.2 แล้วเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส บ่มเป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง จากกระบวนการแซ็กคาริฟิเคชันด้วยเอนไซม์ ทำให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงถึง 1.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้ศึกษากระบวนการหมักแบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) วิธีการคือ นำแป้งมันความเข้มข้น 100, 150, 250 กรัมต่อลิตร ใส่เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.15 มิลลิลิตรต่อ 100 กรัมของแป้ง แล้วทำไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการฆ่าเชื้อเสร็จแล้วให้รออุณหภูมิลดลงจนเหลือ 45 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.15 มิลลิลิตรต่อ 100 กรัมของแป้ง หลังจากนั้นเติม 10 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ที่ผ่านเพาะเลี้ยงมาแล้ว 14-18 ชั่วโมง ผลที่ได้คือการหมักแบบ simultaneous saccharification and fermentation เพิ่มปริมาณการผลิตกรดแลกติกจาก 1.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเพิ่มขึ้นเป็น 7.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นจากเดิม 70 เปอร์เซ็นต์

Van der Veen และคณะ (2006) เป็นการศึกษากระบวนการย่อยแป้งภายใต้สภาวะน้ำน้อย วิธีการคือการเติมเอนไซม์อะไมเลส 4.5 มิลลิลิตรต่อแป้งแห้งหนึ่งกิโลกรัม แล้วทำให้ร้อนถึง 90 องศาเซลเซียส หรือ 110 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นลดอุณหภูมิให้อยู่ที่ 60 องศาเซลเซียสและเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เพื่อผสมและทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 60 องศาเซลเซียส ทำให้มีอัตราในการย่อยแป้งที่สูงถึง 1.25 กิโลกรัมต่อนาที

Ruiz และคณะ (2011) เป็นการศึกษากระบวนการย่อยแป้งมันสำปะหลังเพื่อเป็นแหล่งอาหารให้ยีสต์ *Candida* sp. เปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล โดยใช้เอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจาก *Bacillus licheniformis* และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Aspergillus niger* ใช้ในการย่อยแป้ง 100 กรัมต่อลิตร โดยเติมเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส 130.5 ยูนิตต่อกรัม ของแป้ง ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส pH 5.0 และเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 81.5 ยูนิตต่อกรัม ของแป้ง ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส pH 4.5 ทำให้เอทานอลจาก *Candida* sp. ประมาณ 1.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ถึง 3.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เกศรินทร์ และคณะ (2557) เป็นการศึกษาการย่อยแป้งข้าวตกเกรดด้วยเอนไซม์อะไมเลสทางการค้า เพื่อที่จะสามารถนำน้ำตาลที่ย่อยได้จากแป้งข้าวตกเกรดสมารถไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่อเนื่องต่อไปได้ โดยวิธีการย่อยแป้งข้าวตกเกรดคือ สารละลายแป้งที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ที่ pH 5.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในปริมาณที่แตกต่างกันคือ 8.44, 1.69 และ 1.12 ยูนิต เขย่าให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที) จากนั้นเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในปริมาณที่แตกต่างกันคือ 9.0, 4.5, 1.8 และ 0.9 ยูนิต ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วย Dinitrosalicylic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

colorimetric method (DNS) ผลที่ได้คือ ปริมาณเอนไซมแอลฟาอะไมเลส 1.12 units เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการย่อยแป้งข้าวตกเกรดที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลมอลโตสได้ 48.77 กรัมต่อลิตร จากนั้นย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะเลส 4.5 ยูนิต ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ 86.23 กรัมต่อลิตร จึงสมารถสรุปได้ว่าปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 1.12 ยูนิต และ เอนไซม์กลูโคอะเลส 4.5 ยูนิต เป็นปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยแป้งข้าวตกเกรดให้เป็นน้ำตาลกลูโคส

2.8 การนำไปประยุกต์ใช้

คุณสมบัติที่น่าสนใจของ PGA คือเป็นสารที่มีประจุลบ ย่อยสลายได้โดยวิธีทาง ชีวภาพ (biodegradable) รับประทานได้ (edible) ละลายน้ำได้ และไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมจึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น การบำบัดน้ำเสีย การผลิตน้ำดื่ม กระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมการหมัก เป็นต้น

ด้านการบำบัดน้ำเสีย มีการใช้ PGA กำจัดโลหะหนักในน้ำเสีย โดยเมื่อเติม PGA ลงไปสามารถดูดโลหะหนัก เนื่องจาก PGA เป็นสารที่เป็นประจุลบ และโลหะมีประจุบวกจึงเกิดการจับตัวกันแล้วตกลงมาเป็นตะกอน (Bhattacharyya และคณะ, 1998)

ด้านอุตสาหกรรมอาหารได้มีการเติม PGA เพิ่มความหนืดคงตัวของโฟมและเพิ่มคุณสมบัติการผสมอิมัลชัลของแป้งเค้ก ส่งผลให้แป้งเค้กมีความกระด้างลดลง (Shyu และSung, 2010)

การใช้งานของ PGA ในการผลิตผลิตภัณฑ์บำรุงผิว (Ben-Zur และ Goldman, 2007) พวกเขาพบว่า PGA เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีและมีความสามารถเพิ่มความชุ่มชื้น PGA ถูกใช้อย่างประสบความสำเร็จในฐานะเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้ง hyaluronidase (Sung และคณะ, 2005) ซึ่ง Hyaluronidase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิกทำให้ผิวหนังไม่ชุ่มชื่น ไม่ยืดหยุ่น และแห้งกร้าน ได้รับการทดสอบกับผู้หญิง 50 คนและแสดงให้เห็นถึงการบำรุงผิว โดยผิวมีความมีความยืดหยุ่นและชุ่มชื้นมากขึ้น โดยการยับยั้งกิจกรรมของ hyaluronidase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

แป้งมันสำปะหลัง ยี่ห้อ ปลาไทย 5 ดาว

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus velezensis*

เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (Pre-inoculated)

อาหารแอลบี (Luria-Bertani Borth, LB) (Himedia, India)

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

Plate Count Agar (PCA) (Difco, USA)

3.1.5 การวิเคราะห์ค่าน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

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

ฟีนอล (Phenol, C_6H_5OH) (Merck, Germany)

โพแทสเซียม โซเดียมทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate, $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

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

3.1.6 การวิเคราะห์ค่ากรดพอลิแกมมากลูตามิก

Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) (Calbiochem, India)

Ethyl alcohol 95%

Sodium hydroxide (Univar, Australia)

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

3.1.7 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ทั่วไป

เกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4CI) (Difco, USA)

วุ้นแข็ง (Agar) (Difco, USA)

เอทานอล (Ethanol 95%)

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

เปปโตน (Peptone) (Rajasthan, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance) (Mettler Toledo, Germany)
เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance) (Mettler Toledo, Germany)
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Heraeus, Germany)
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Heraeus, Germany) อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส
ตู้แช่แข็ง (Freezer) (Sanyo, Japan) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
ตู้ดูดควัน (Fume hood) (Heraeus, Germany)
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) : ABS1200 (Bosstech, Thailand)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) (Tommy, Japan)
ไมโครเวฟ (Microwave) (Electrolux, China)
ไมโครปิเปต (Micropipette) (Mettler Toledo, Germany)
จานเพาะเชื้อพลาสติก (Petri Dish) ขนาด 15 × 90 มิลลิลิตร (MedEx, USA)
เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer) (Scientific Industries, USA)
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) (InoLab, Germany)
เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง High speed Centrifuge : 580R (Eppendorf, Germany)
หลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge tube) ขนาด 15, 50 มิลลิลิตร
เครื่องเขย่าบ่มเชื้อ (Incubator shaker) : NB-205VL (Innova lab, India)
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Thermo scientific, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น

เตรียมอาหาร LB broth และ LB agar โดยชั่ง LB สำเร็จรูป 25 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปปรับ pH ให้ได้ 7.0 ± 0.2 และแบ่งออกมาทำ LB agar โดยเติม agar เป็นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตรของ LB broth นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

3.3.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ E

อาหารเลี้ยงเชื้อ E ดัดแปลงจาก Cesaro และคณะ (2014) ตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ E

สารอาหาร	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
L-glutamic acid	20
Glucose	20
NH_4Cl	7
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
KH_2PO_4	0.2
K_2HPO_4	0.81
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.15
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.04

เตรียมโดยการชั่งส่วนประกอบตามตารางที่ 3.1 และผสมส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้ได้ 7.0 โดยใช้ NaOH หรือ HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

3.3.1.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งมันสำปะหลัง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 20 40 60 และ 80 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ± 0.1 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.4 การเลี้ยงเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อโดยนำเชื้อจากตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงโดยการสตรีก *เชื้อ Bacillus velezensis* ลงในเพลทที่มีอาหาร LB agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บโคโลนีเดี่ยวแล้วนำไปเลี้ยงใน LB agar Slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องซาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เลี้ยงใน LB agar Slant ทำการเขี่ยเชื้อ 1 ลูป ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LB broth อยู่ 30 มิลลิลิตร และเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหัวเชื้อไปเจือจางกับอาหาร LB broth ทำการเลี้ยงเชื้อจนได้ค่าความขุ่น Optical Density (OD) 1.0 ± 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ E และอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 5 โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.3.1.5 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต pH 6.9

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต pH 6.9 โดยชั่ง โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.7148 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.6898 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 0.0980 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปปรับ pH ให้ได้ 6.9 ด้วยโซเดียมคลอไรด์

3.3.1.6 การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

กระบวนการแซ็กคาริฟิเคชันของแป้งมันสำปะหลัง ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยดับเบิลเอนไซม์ คือ แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยใช้เอมไซม์แอลฟาอะไมเลส 130 ยูนิตต่อกรัม และกลูโคอะไมเลส 80 ยูนิตต่อกรัม (Ruiz และคณะ, 2011) มาเจือจาง 100 เท่า ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต pH 6.9 จากนั้นปิเปตแอลฟา-อะไมเลสลงในฟลาสก์ที่มีแป้ง และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หลังจากอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส ปิเปตกลูโคอะไมเลสลงไปในฟลาสก์ (Anuradha และคณะ, 1999) รอจนอุณหภูมิเหลือ 40 องศาเซลเซียส ใส่เชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.3.2 การตรวจวิเคราะห์ค่าผลการทดลอง

3.3.2.1 การตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์

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

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

เป็นวิธีใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5-500 ไมโครกรัม ของน้ำตาลกลูโคส โดยการต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายด่างที่มีกรดไตในโตรซาลิไซลิค (3, 5-dinitrosalicylic acid) ปฏิกิริยาดังกล่าวจะทำให้สารละลายมีสีเข้มขึ้นและสามารถดูดกลืนแสงที่ช่วงความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร น้ำตาลจะทำปฏิกิริยารีดักชันกับ 3, 5-dinitrosalicylic acid ได้เป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาลแดง ปิเปตต์ตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อผสมเข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรจะได้สารละลายเป็นสีส้ม-เหลือง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน

3.3.2.3 การสกัดกรดพอลิแกมมากลูตามิก

นำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนแป้งมันสำปะหลังและเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีนำส่วนสารละลายใสมาตกตะกอนกรดพอลิแกมมากลูตามิก ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แช่เย็นโดยใส่เอทานอล 3 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง เขย่าตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้กรดพอลิแกมมากลูตามิกตกตะกอนจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเอทานอลออก นำตะกอนไปละลายด้วยน้ำ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีลักษณะใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยวิธีการ cetylmethylammonium bromide (CTAB) (Kumar และ Pal, 2015)

3.3.2.4 การตรวจวิเคราะห์ ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยวิธีการ cetylmethylammonium bromide (CTAB)

ปิเปตต์ส่วนใสที่ได้จากการละลายตะกอนกรดพอลิแกมมากลูตามิก 2 มิลลิลิตรผสมกับ CTAB 2 มิลลิลิตร และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นวัดความเข้มข้นกรดพอลิแกมมากลูตามิก โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Kongklom และคณะ, 2015)

3.3.2.5 การตรวจวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 23 ตามแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลองเป็นจำนวน 3 ซ้ำ สิ่งทดลองถูกจัดสุ่มลงในหน่วยการทดลอง เป็นการวางแผนแบบทดสอบทางเดียว (One way ANOVA) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปราย

4.1 ศึกษาผลของกรดแอลกลูตามิกที่มีผลต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus velezensis* และ *Bacillus subtilis*

ผลของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ E จากงานวิจัยของ Cesaro และคณะ (2014) โดยเป็นแบบการเติมกรดแอลกลูตามิก และไม่เติมกรดแอลกลูตามิก ที่สภาวะพีเอช 7.00±0.1 นำไปบ่มที่เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 จะพบว่า จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus velezensis* และ *Bacillus subtilis* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบไม่เติมกรดแอลกลูตามิกให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่สูงกว่าที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดแอลกลูตามิก โดย *Bacillus velezensis* ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ 1.564 กรัมต่อลิตร และ *Bacillus subtilis* ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ 3.008 กรัมต่อลิตร สรุปได้ว่าเชื้อ *Bacillus velezensis* ที่ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ เป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid independent คือ เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ได้โดยไม่ต้องเพิ่มแหล่งอาหารภายนอกเข้าไปในอาหารก็สามารถผลิตพอลิแกมมากลูตามิกได้ เพราะว่าจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการเติมกรดแอลกลูตามิกและไม่เติมกรดแอลกลูตามิก มีผลเฉลี่ยแตกต่างกันทางทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่เชื้อ *Bacillus subtilis* ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid independent เพราะว่าจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการเติมกรดแอลกลูตามิกและไม่เติมกรดแอลกลูตามิกมีผลเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลที่ได้จากการทดลองมีความแตกต่างจากงานวิจัยของ Cesaro และคณะ (2014) ซึ่งได้ทำการศึกษาผลของสารตั้งต้นในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* BL53 พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* BL53 เป็นแบคทีเรียชนิด Glutamic acid dependent เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องทำการเติมแหล่งอาหารจากภายนอกเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อที่จะสามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกให้เพิ่มมากขึ้นได้โดยการเติมแหล่งอาหารจากภายนอกเข้าไปนี้ทำให้สามารถเพิ่มการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ 20 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.1 การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus velezensis* และ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ E ที่เติมกรดแอลกลูตามิกและไม่เติมกรดแอลกลูตามิก

เชื้อจุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก (กรัมต่อลิตร)
Bacillus velezensis	เติมกรดแอลกลูตามิก	0.5583 ± 0.05^{a}
	ไม่เติมกรดแอลกลูตามิก	1.5640 ± 0.25^{b}
Bacillus subtilis	เติมกรดแอลกลูตามิก	2.9167 ± 1.22^{b}
	ไม่เติมกรดแอลกลูตามิก	3.0083 ± 1.00^{b}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

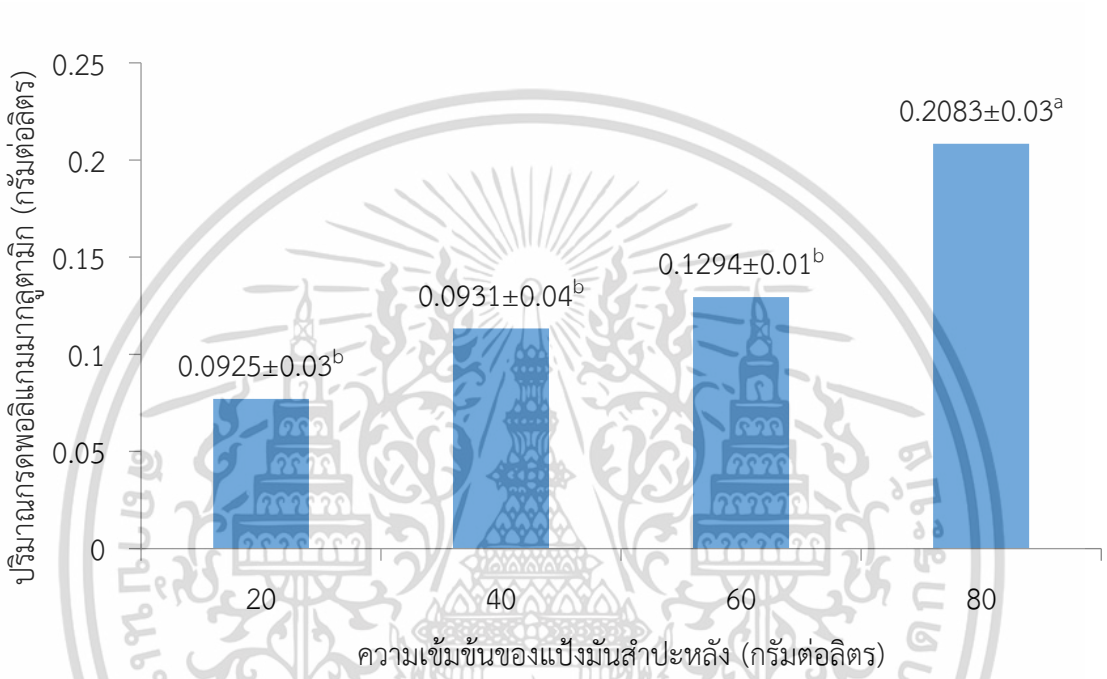
งานวิจัยของ Xu และคณะ (2005) ได้กล่าวไว้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกถูกแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ 1) Glutamic acid dependent แบคทีเรียที่ต้องเติมกรดแอลกลูตามิกลงอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อที่จะสามารถสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกออกมาได้ และ2) Glutamic acid independent แบคทีเรียที่ไม่ต้องเติมกรดแอลกลูตามิกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อก็สามารถสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกได้จากการสังเคราะห์จากการที่ เอนไซม์ Pyruvic acid aminotransferase เปลี่ยนกรดไพรูวิกและกรดแอลฟาคีโตกลูตาริกให้ไปเป็นกรดแอลอะลานีนก่อนเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูตามิกเพื่อที่จะสังเคราะห์กรดพอลิแกมมากลูตามิกออกนอกเซลล์

จากการศึกษาของ Lee และคณะ (2014) เป็นการศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดย *Bacillus subtilis* D7 โดยแบคทีเรียชนิดนี้สมารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกในกรณีที่ไม่มีกรดแอลกลูตามิกได้ แต่เมื่อทำการเติมกรดแอลกลูตามิก 30 กรัมต่อลิตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟส 0.1 กรัมต่อลิตร ก็สามารถเพิ่มการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้อีก โดยการเติมกรดแอลกลูตามิกเข้าไปจะช่วยเพิ่มผลผลิตของกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้มากถึง 24.93 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ทำการเติมแอลกลูตามิกถึง 5.4 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เติมเอนไซม์ต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus subtilis*

การศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* เพื่อให้ได้ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงสุด โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ใส่เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ตามลำดับ เติมเชื้อลงไป 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร
หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างของค่าตัวแปลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองพบว่าผลผลิตของกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ผลิตโดย *B. subtilis* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง โดยแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร จะผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ 0.0925, 0.0931, 0.1294 และ 0.2083 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าในอาหารที่มีความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 80 กรัมต่อลิตร มีปริมาณผลผลิตสูงสุด คือ 0.2083 กรัมต่อลิตร

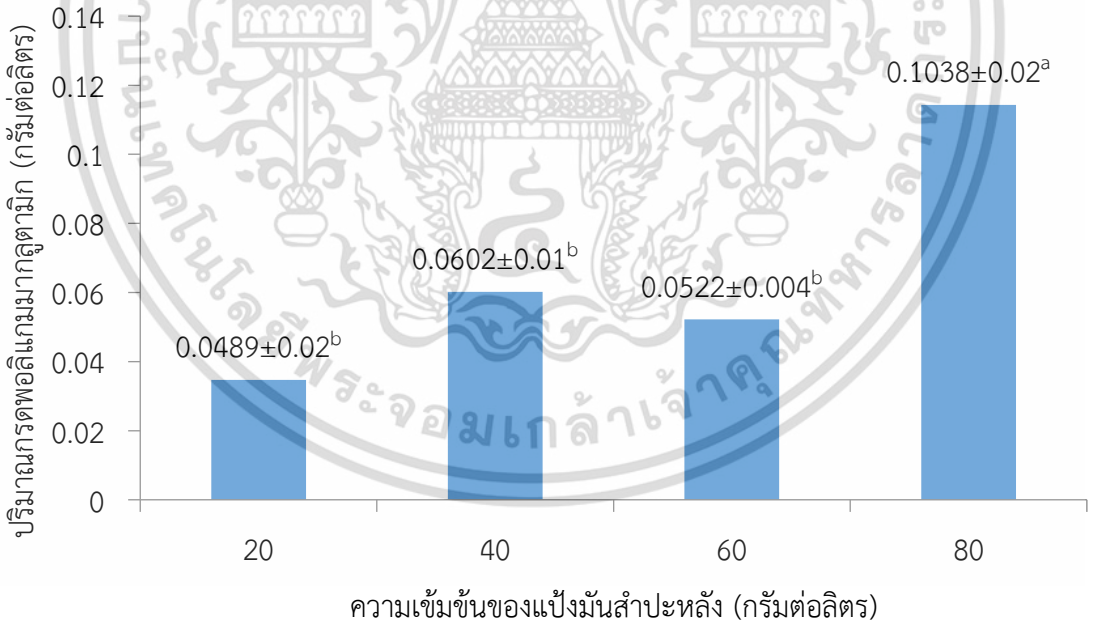
จากภาพที่ 4.2 พบว่าแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร มีผลเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ให้ผลได้ของกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เติมเอมไซม์ต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacilus velezensis*

ผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เติมย่อยด้วยเอมไซม์ต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. velezensis* จากการเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลัง ที่มีปริมาณความเข้มข้น 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร โดยมีการย่อยแป้งด้วยกระบวนการแซ็กคาริฟิเคชั่นโดยใช้เอมไซม์ นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4.3 พบว่าความเข้มข้นของแป้งเพิ่มขึ้นยิ่งมีการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกเพิ่มขึ้น ในการทดลองความเข้มข้นของแป้งที่ 80 กรัมต่อลิตร เชื้อ *B. velezensis* สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้สูงสุดถึง 0.1038 กรัมต่อลิตร

ผลการที่ได้จากการทดลองไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ju และคณะ (2014) ศึกษาการปรับปรุงการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยเชื้อ *B.subtilis* MJ80 โดยดำเนินการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า แป้งสามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้สูงมากโดยความเข้มข้นของแป้งที่ 30 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้สูงถึง 48.3 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.3 ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B.velezensis* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่เติมเอมไซม์มีปริมาณความเข้มข้นต่างกันที่ 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร
หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างของค่าตัวแปลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

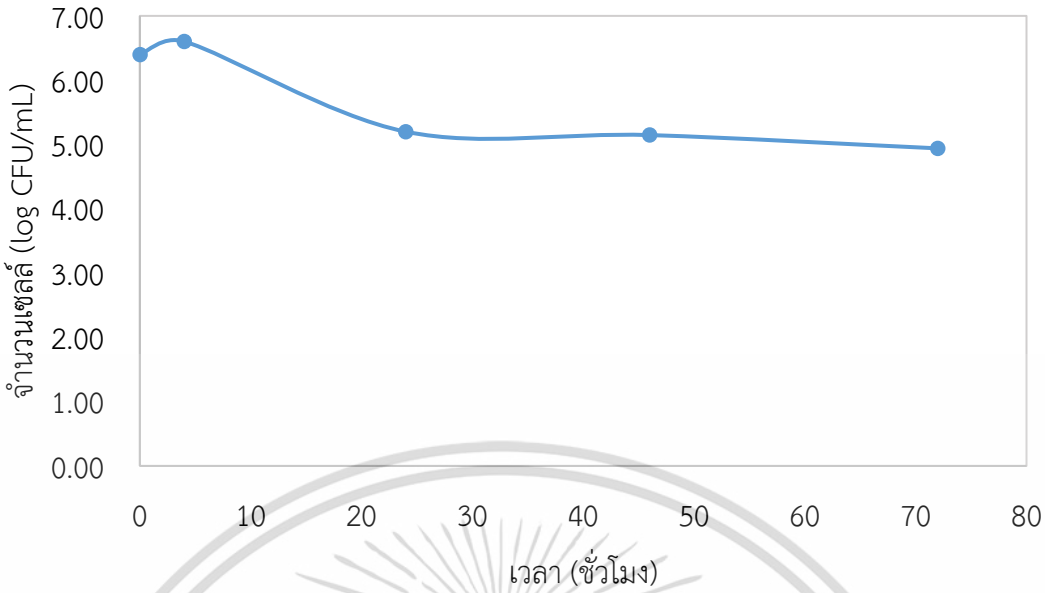
จากภาพที่ 4.3 พบว่าแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร มีผลเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ให้ผลได้ของกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.4 ศึกษาผลของการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *Bacillus velezensis*

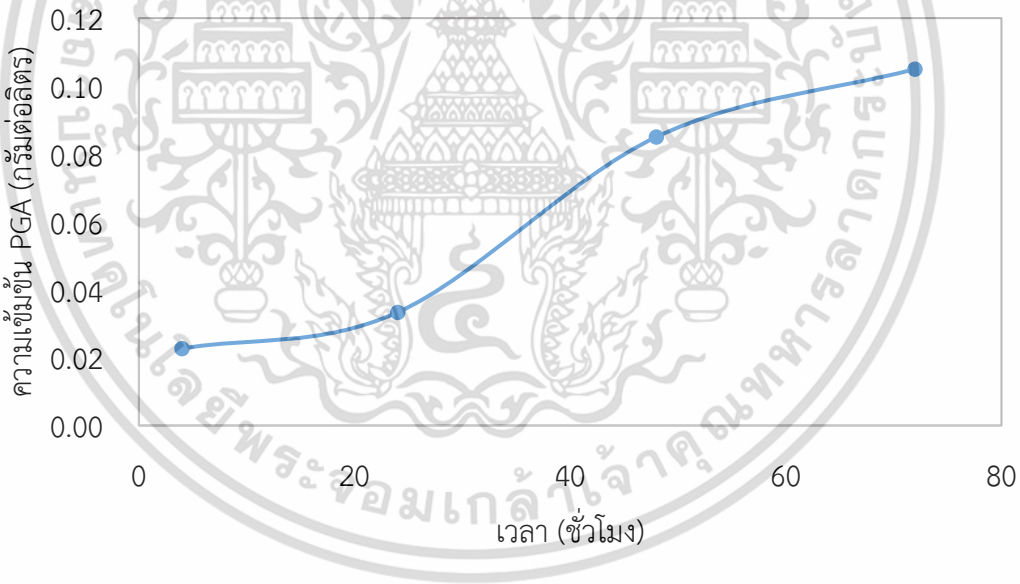
จากการทดลองหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ในปริมาณที่สูงสุด ซึ่งทำการทดลองความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 20, 40, 60, และ 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่สามารถส่งเสริมการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้ปริมาณที่สูงสุดคือความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* ในแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร และ แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณเชื้อ *B. velezensis* จากภาพที่ 4.4 พบว่า ชั่วโมงที่ 0-4 มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ชั่วโมงที่ 0 คือ 21.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งที่ 4 ชั่วโมงมีการเพิ่มจำนวนสูงสุดถึงประมาณ 6.6 Log CFU/mL หลังจากนั้นปริมาณเชื้อ *B. velezensis* ก็ลดจำนวนลง ชั่วโมงที่ 72 ปริมาณเชื้อลดจำนวนลงจนเหลือ 4.94 Log CFU/mL และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็ลดลงจนเหลือ 0.05 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเซลล์นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ และสร้างกรดพอลิแกมมากลูตามิก ซึ่งจากผลการทดลองการเจริญของเชื้อ *B. velezensis* มีการเจริญที่น้อยมาก อาจจะเป็นเพราะว่าเชื้อ *B. velezensis* เข้าสู่ช่วง Death phase หรือ decline phase คือช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะเซลล์ตาย ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของการเจริญของเซลล์ เซลล์ที่มีอยู่จะตายลงมากกว่าเซลล์ที่เพิ่มจำนวนขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะอาหารอาจหมด และมีสารพิษสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก และปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่เชื้อ *B. velezensis* สามารถผลิตได้แสดงในภาพที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าชั่วโมงที่ 4 มีปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิก 0.02 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกเพิ่มสูงขึ้น จนถึงชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 0.1050 กรัมต่อลิตร ถ้าทำการหมักต่อไปเกิน 72 ชั่วโมง การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจะลดลงเนื่องจากปริมาณน้ำตาลที่เหลือน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อ *B. velezensis* ซึ่งจะทำให้เชื้อเกิดการย่อยกรดพอลิแกมมากลูตามิกให้เป็นกลูตาเมตเพื่อเป็นแหล่งอาหารให้เชื้อดำรงชีวิตอยู่ได้ต่อไป

ผลที่ได้จากการทดลองแตกต่างจากงานวิจัยของ Odeniyi และ Avoseh (2018) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ เปลือกมันสำปะหลัง, ซังข้าวโพด, ข้าวฟ่าง, ลูกเดือย และ รำข้าว โดยเชื้อ *Bacillus toyonensis* As8 ใช้กระบวนการหมักแบบกะเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ให้ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงสุดได้แก่ เปลือกมันสำปะหลัง โดยมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ขึ้นเรื่อยๆ เซลล์เพิ่มจำนวนได้สูงที่สุดที่ 96 ชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง คือ 26.45 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 การเจริญของเชื้อ *B. velezensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร และ แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.5 ปริมาณกรดพอลิแกมมากลูตามิกของเชื้อ *B. velezensis* ใน อาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร และ แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลและการทดลอง

5.1.1 เชื้อ *B. velezensis* เป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการกรดแอลกลูตามิกในการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก

5.1.2 ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ของ *B. subtillis* เท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงที่สุด คือ 0.2083 กรัมต่อลิตร

5.1.3 ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิก ของ *B. velezensis* เท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกสูงที่สุด คือ 0.1143 กรัมต่อลิตร

5.1.4 การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกโดยใช้เชื้อ *B. velezensis* ด้วยกระบวนการหมักแบบกะในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรการทำงาน 200 มิลลิลิตร พบว่าที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกได้มากที่สุด 0.1050 กรัมต่อลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ศึกษาสภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกด้วยการขยายขนาดเป็นระดับถังหมัก

5.2.2 ศึกษาเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์อื่นเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มการผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกให้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

เกศรินทร์ ไกลถิ่น, นงพงา คุณจักร, และอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2557. การย่อยแป้งข้าวตกเกรดด้วเอนไซม์อะไมเลสทางการค้า. วิทยาศาสตร์เกษตร. 45(2): 677-680

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

คณวิชช์ ศรีปินตา. 2560. ผลของแกมม่าพอลีกลูตามิกแอซิดและเซลล์ *Bacillus subtilis* ต่อการปรับปรุงคุณภาพดินและการเจริญเติบโตของข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยพะเยา.

โครงสร้างอะไมโลส. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://www.scientificpsychic.com/fitness/starch.gif. 30 มิถุนายน 2563.

โครงสร้างอะไมโลเพกติน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://image.dek-d.com/25/2315457/108678917 30 มิถุนายน 2563.

ณัฐวุฒิ คงกล่อม, ชนิกา ชื่นแสงจันทร์ และสาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2555. วิธีการสังเคราะห์แกมม่าพอลิกลูตามิกแอซิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. สรรสาระเทคโนโลยีชีวภาพ. 3(1): 9

Anuradha, R., Suresh, A. K. and Venkatesh, K. V. 1999. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. Process Biochemistry. 35(3-4): 367-375.

Bajaj, I., and Singhal, R. 2011. Poly (glutamic acid)–an emerging biopolymer of commercial interest. Bioresource technology, 102(10), 5551-5561.

Ben-Zur, N. and Goldman, D.M. 2007. γ -Polyglutamic acid: a novel peptide for skin care. Cosmetics Toiletries. 122: 64–72.

Bhattacharyya, 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(1): 121-135.

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

Candela, T. and Fouet, A. 2006. Poly-gamma-glutamate in bacteria. Molecular microbiology. 60(5): 1091-1098.

Cesaro, A., Da 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(9): 1375-1382.

Chen, Y., Huang, S., Tang, Z., Chen, X. and Zhang, Z. 2011. Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of α-amylase and glucoamylase. Carbohydrate Polymers. 85(1): 272-275.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Fujii, H. 1963. On the formation of mucilage by *Bacillus nutto*. Parrlll. Chemical constitution of mucilage in natto. Nippon. Nogcikagaku Kaishi. 37: 407-411.

Goto, A. and M. Kunioka. 1992. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ-glutamicacid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 56: 1031-1035.

Ivanovics, G. and Bruckner, V. 1937. Chemische und immunologische Studien uber den Mechanismus der Milzbrandinfektion und Immunitat die chemische Struktur der Kapel-substanz des Milzbrand-bacillus und der serolisch identischen spezifichen Substanz des *Bacillus mesentericus*. Z Immunitatsforsch. 90: 304-310.

Ju, W. T., Song, Y. S., Jung, W. J., and Park, R. D. 2014. Enhanced production of poly-γ-glutamic acid by a newly-isolated *Bacillus subtilis*. Biotechnology letters. 36(11): 2319-2324.

Kimura, K., and Fujimoto, Z. 2010. Enzymatic degradation of poly-gamma-glutamic acid. 95-117. In Amino-acid homopolymers occurring in nature. Berlin: Springer.

Kongklom, 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.

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

Lee, N. R., Lee, S. M., Cho, K. S., Jeong, S. Y., Hwang, D. Y., Kim, D. S. and Son, H. J. 2014. Improved production of poly-γ-glutamic acid by *Bacillus subtilis* D7 isolated from Doenjang, a korean traditional fermented food, and its antioxidant activity. Applied biochemistry and biotechnology. 173(4): 918-932

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(5): 499.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 31(3): 426-428.

Moraes, L. P., Brito, P. N. and Alegre, R. M. 2013. The Existing Studies on Biosynthesis of Poly (γ-glutamic acid) by Fermentation. Food and Public Health. 3(1): 28-36.

Odeniyi, O.A. and Avoseh, D.S. 2018. Effects of media components and agricultural

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

by-products on γ-polyglutamic acid production by *Bacillus toyonensis* As8. Polimery w medycynie. 48(2): 91-97.

Ruiz-Garcia, C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I., and Quesada, E. 2005. *Bacillus velezensis* sp. a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55(1): 191-195.

Ruiz, M. I., Sanchez, C. I., Torres, R. G. and Molina, D. R. 2011. Enzymatic hydrolysis of cassava starch for production of bioethanol with a Colombian wild yeast strain. Journal of the Brazilian Chemical Society. 22(12): 2337-2343.

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

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 Chemical Record. 5(6): 352-366.

Van der Veen, M. E., Veelaert, S., Van der Goot, A. J. and Boom, R. M. 2006. Starch hydrolysis under low water conditions: a conceptual process design. Journal of Food Engineering. 75(2): 178-186.

Wang, F., Liang, J., Wang, W., Fu, D. and Xiao, W. 2017. A new and efficient method for purification of poly-γ-glutamic acid from high-viscosity fermentation broth. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 16(6): 1267-1275.

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

Yong, X., Raza, W., Yu, G., Ran, W., Shen, Q. and Yang, X. 2011. Optimization of the production of poly-γ-glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* C1 in solid-state fermentation using dairy manure compost and monosodium glutamate production residues as basic substrates. Bioresource technology. 102(16): 7548-7554.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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

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

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

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

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

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

ปิเปตกรด HCl เข้มข้นมา 20.73 มิลลิลิตร แล้วเจือจางเป็น 250 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

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

เมื่อ NaOH ความหนาแน่น 2.13 กรัมต่อลิตร มวลโมเลกุล 39.99 กรัมต่อโมล

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

โดย g = น้ำหนักของ NaOH ที่ต้องการ หน่วยเป็นกรัม
MW = มวลโมเลกุลของ NaOH หน่วยเป็นกรัมต่อโมล
C = ความเข้มข้นที่ต้องการ หน่วยเป็นนอร์มอล
V = ปริมาตรที่ต้องการ หน่วยเป็นมิลลิลิตร

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

ชั่ง NaOH 3.99 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ด้วยการเติมน้ำกลั่นให้ครับ 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วยสาร

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

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

ชั่งสาร 3,5-Dinitrosalicylic acid 10 กรัม ลงในบีกเกอร์ ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และชั่ง NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมสารละลายด่างทีละน้อยลงไปในสารละลาย คนให้เข้ากันนำไปอังบนอ่างน้ำร้อนจนสารละลายใส 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

ก.5 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium phosphate pH 6.9 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ในสารละลาย 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสาร

Sodium hydrogen phosphste	0.7148	กรัม
Sodium dihydrogen phosphate	0.6898	กรัม
Sodium chloride	0.0980	กรัม

ชั่งสาร Sodium hydrogen phosphste 0.7148 กรัม Sodium dihydrogen phosphate 0.6898 กรัม และ Sodium chloride 0.0980 กรัม ลงในบีกเกอร์ ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.9 ด้วย Sodium hydroxide 1 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมกราฟมาตรฐาน

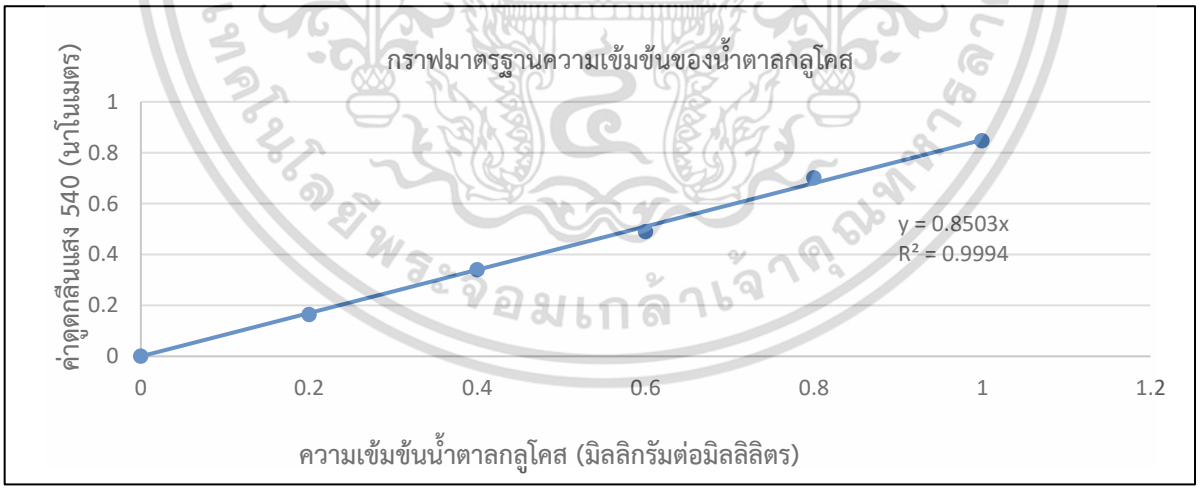
ข. 1 การเตรียมสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

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

ตาราง ข-1 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานและค่า OD_{540} ที่กลูโคสความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	การเจือจาง		ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัม/มล.)	OD_{540}
	สารมาตรฐาน (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)		
1	0	10	0	0
2	2	8	0.2	0.164
3	4	6	0.4	0.34
4	6	4	0.6	0.49
5	8	2	0.8	0.701
6	10	0	1	0.847

ปริมาณ PGA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$



ภาคผนวกที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

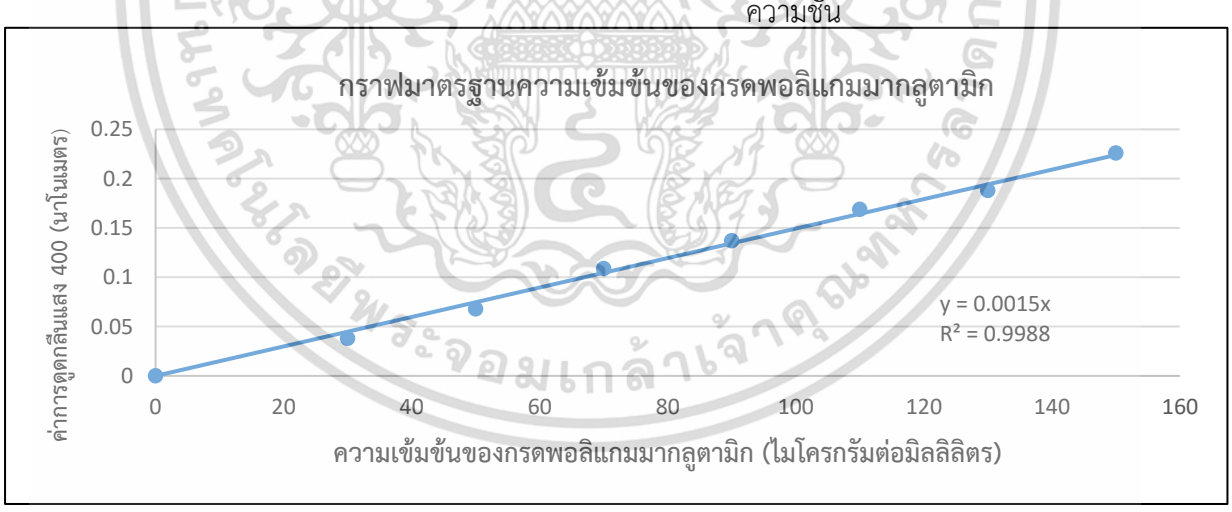
ข.2 การเตรียมสารมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดพอลิแกมากลูตามิก ความเข้มข้น 1900 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิก 0.019 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิก มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 30 50 70 90 110 130 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ข-2 การเจือจางสารละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิกมาตรฐานและค่า OD_{400} ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	การเจือจาง		ความเข้มข้นของกรดพอลิแกมมากลูตามิก (ไมโครกรัม/มล.)	OD400
	สารมาตรฐาน (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)		
1	0	5	0	0
2	0.08	4.92	30	0.038
3	0.13	4.87	50	0.068
4	0.18	4.82	70	0.109
5	0.24	4.76	90	0.137
6	0.29	4.71	110	0.169
7	0.34	4.66	130	0.188
8	0.4	4.6	150	0.226

ปริมาณ PGA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$



ภาคผนวกที่ ข-2 กราฟมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ค่าการดูดกลืนแสง 400 นาโนเมตร

ข.3 การเตรียมสารมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิก

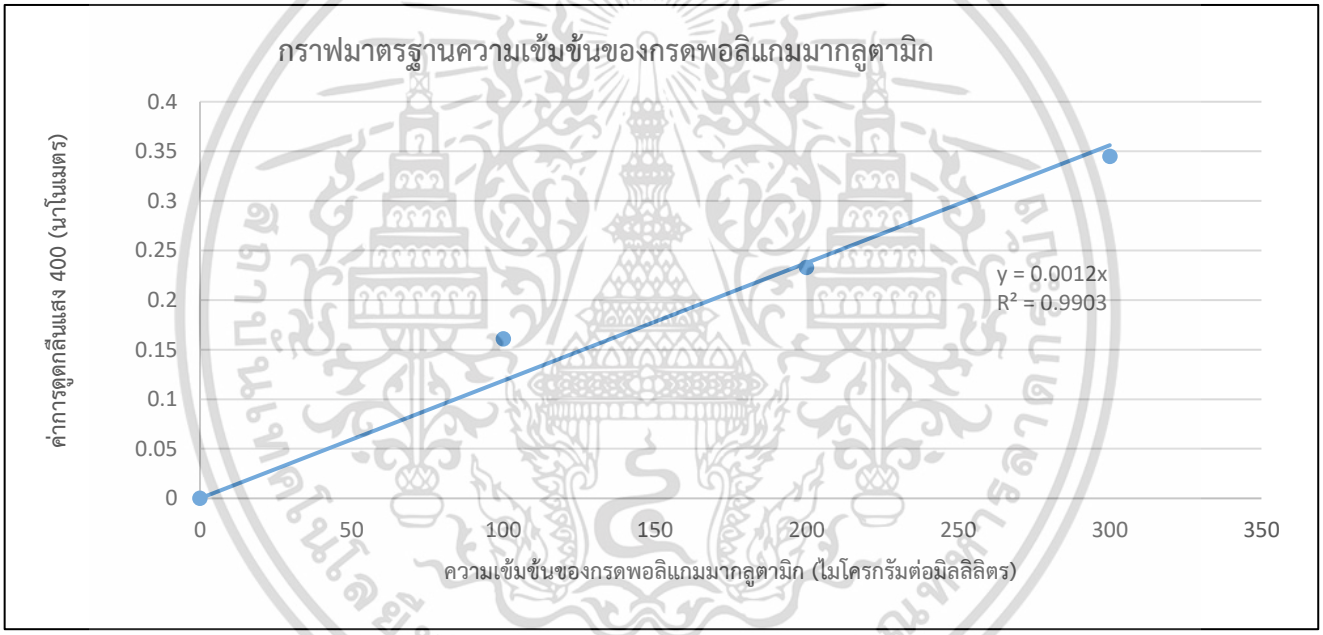
เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดพอลิแกมากลูตามิก ความเข้มข้น 1900 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิก 0.019 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิก มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 100 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-3 การเจือจางสารละลายกรดพอลิแกมมากลูตามิกมาตรฐานและค่า OD_{400} ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	การเจือจาง		ความเข้มข้นของกรดพอลิแกมมากลูตามิก (ไมโครกรัม/มล.)	OD400
	สารมาตรฐาน (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)		
1	0	5	0	0
2	0.26	4.74	100	0.161
3	0.53	4.47	200	0.233
4	0.79	4.42	300	0.345

ปริมาณ PGA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$



ภาคผนวกที่ ข-3 กราฟมาตรฐานกรดพอลิแกมมากลูตามิกที่ค่าการดูดกลืนแสง 400 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	วรวลัญช์ ถาจันทึก
วัน เดือน ปี เกิด	14 ตุลาคม 2541
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนจอมสุรางค์อุปถัมภ์ ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมอาหาร หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	บริษัท ยูนีซัน จำกัด
และผลงานวิจัย	การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลัง (Production of poly-γ-glutamic acid from cassava starch)

ชื่อ-นามสกุล	สาวิตรี บุญครอง
วัน เดือน ปี เกิด	13 กุมภาพันธ์ 2541
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนวัดพุทธบูชา ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมอาหาร หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	บริษัท ยูนีซัน จำกัด
และผลงานวิจัย	การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลัง (Production of poly-γ-glutamic acid from cassava starch)

ชื่อ-นามสกุล	สุพรรษา โคพระ
วัน เดือน ปี เกิด	16 ตุลาคม 2540
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนดัดดรุณี ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมอาหาร หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	บริษัท ยูนีซัน จำกัด
และผลงานวิจัย	การผลิตกรดพอลิแกมมากลูตามิกจากแป้งมันสำปะหลัง (Production of poly-γ-glutamic acid from cassava starch)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้