



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Weissella confusa* NH02 โดยใช้แหล่ง  
อาหารราคาถูก

Production of Exopolysaccharide from *Weissella confusa* NH02  
using Low-Cost Raw Materials

นาย ไกรยศ แซ่ลิ้ม  
นาย ศุภศิลป์ มณีรัตน์

หัวหน้าโครงการวิจัย  
ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560  
มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ 130/2560

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Weissella confusa* NH02 โดยใช้แหล่ง  
อาหารราคาถูก

Production of Exopolysaccharide from *Weissella confusa* NH02  
using Low-Cost Raw Materials

หัวหน้าโครงการวิจัย

นาย ไกรยศ แซ่ลี้ม

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

นาย ศุภศิลป์ มณีรัตน์

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตุลาคม 2559

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Weissella confusa* NH02 โดยคัดเลือกแหล่งอาหารราคาถูก โดยงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 130/2560

คณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ศุภศิลาป์ มณีรัตน์ ที่ปรึกษาโครงการวิจัยสำหรับคำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้

รวมทั้งขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย  
มีนาคม 2562

## บทคัดย่อ

*Weissella confusa* NH02 เป็นแบคทีเรียแล็กติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน และสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ อีกทั้งยังเป็นเชื้อที่ต้องการสารอาหารหลากหลายซึ่งมีราคาแพงต่อการเจริญ ดังนั้นจุดประสงค์ของการทดลองในครั้งนี้คือการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้แหล่งอาหารราคาถูกในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 โดยใช้วิธีทาคุชิ และวิธีพื้นผิวตอบสนองจากการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) จากการใช้วิธีทาคุชิในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ซึ่งมีปัจจัยทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งคาร์บอนหลัก แหล่งคาร์บอนเสริม แหล่งไนโตรเจน และพีเอช ผลการออกแบบโดยใช้ L9 orthogonal array พบว่า ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 คือ แหล่งคาร์บอนหลัก และแหล่งไนโตรเจน จากการวิเคราะห์ค่า signal to noise (S/N) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ประกอบด้วยน้ำอ้อย กากน้ำตาล กากถั่วเหลือง และพีเอชเท่ากับ 6.0 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้สามารถทำนายการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 5.94 กรัมต่อลิตร การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยมีปัจจัยทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ กากน้ำตาล กากถั่วเหลือง และอุณหภูมิ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ประกอบด้วย กากน้ำตาลความเข้มข้น 43.65 กรัมต่อลิตร กากถั่วเหลืองความเข้มข้น 1.87 กรัมต่อลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 39.64 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้สามารถทำนายการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 30.34 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 5.33 กรัมต่อลิตร

**คำสำคัญ:** เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์, วิธีทาคุชิ, วิธีพื้นผิวตอบสนอง, กากน้ำตาล, กากถั่วเหลือง

**Keywords:** exopolysaccharides, Taguchi method, Response surface methodology, molasses, soybean meal

## Abstract

*Weissella confusa confuse* NH02 isolated from Thai fermented sausages is one of the lactic acid bacteria that can produce exopolysaccharides (EPS). They require several growth factors for bioactivity which are expensive nutrients. Thus, the objective of this study was to investigate the optimum parameter from alternative low-cost substrates for the EPS production by *W. confusa* NH02 using Taguchi method and using Central Composite Design (CCD) and Response Surface Methodology (RSM). Taguchi experimental design technique was used to optimize the EPS production by *W. confusa* NH02. Four factors including major and minor carbon sources, nitrogen source and pH were investigated. Results of Taguchi design L9 orthogonal array showed that the most important parameters are a major carbon and nitrogen source. Based on signal to noise (S/N) analysis, the optimal conditions for EPS production by *W. confusa* NH02 were evaluated as follows: sugar cane juice, molasses, soybean meal and pH 6.0. Under optimum conditions the predicted maximum EPS production was 5.94 g/L. Three factors including molasses, soybean meal and temperature were subsequently optimized using RSM technique. The maximum EPS production was optimized for conditions like molasses (43.65 g/L), soybean meal (1.87 g/L) and incubated at 39.64 °C using RSM. Under optimum conditions the predicted maximum EPS production was 30.34 g/L, while biomass yield was 5.33 g/L.

**Keywords:** exopolysaccharides, Taguchi method, Response surface methodology, molasses, soybean meal

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	25
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	51
ผลผลิต (Output)	52
เอกสารอ้างอิง	53
ประวัตินักวิจัย	59

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 โครงสร้างของโฮโมโพลีแซคคาไรด์ของลีแวน (Levan) (A) และมิวแทน (Mutan) (B)	4
2-2 โครงสร้างของเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain GG	5
2-3 การสังเคราะห์ของกลุ่มโฮโมโพลีแซคคาไรด์	6
2-4 การสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติก	7
2-5 กลุ่มของยีนที่สังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMQ-461	8
4-1 การเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเชื้อ <i>W. confusa</i> NH02	26
4-2 ความสัมพันธ์ของระดับต่างๆ ของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองกับค่า S/N ratios ของปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้	31
4-3 ความสัมพันธ์ของระดับต่างๆ ของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองกับค่า S/N ratios ของปริมาณเซลล์ที่ได้	34
4.4 ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ <i>W. confusa</i> NH02 จากแผนการทดลองแบบ CCD	35
4-5 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	37
4-6 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	37
4-7 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัยของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	38
4-8 ผลการตอบสนองระหว่างกากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง (ก), ระหว่างกากน้ำตาลและอุณหภูมิ (ข) และระหว่างกากถั่วเหลืองกับอุณหภูมิ (ค) ต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	41
4-9 การทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อ <i>W. confusa</i> NH02	42
4-10 ปริมาณเซลล์ที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD	42
4-11 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของการผลิตเซลล์	43
4-12 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลการผลิตเซลล์	44
4-13 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัยของการผลิตเซลล์	44

ภาพที่	หน้า	
4.14	ผลการตอบสนองระหว่างกากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง (ก), ระหว่างกากน้ำตาลและอุนหนุมิ (ข) และระหว่างกากถั่วเหลืองกับอุนหนุมิ (ค) ต่อการผลิตเซลล์	47
4.15	การทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตเซลล์จากเชื้อ <i>W. confusa</i> NH02	48
4.16	การทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์สูงสุด และได้ปริมาณเซลล์มากที่สุดโดยเชื้อ <i>W. confusa</i> NH02	48



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1	5
2-2	10
2-3	11
2-4	11
2-5	13
2-6	16
3-1	22
3-2	22
3-3	23
3-4	24
4-1	25
4-2	27
4-3	28
4-4	30
4-5	31

ตารางที่	หน้า
4-6 การวิเคราะห์ผลของการทดสอบบอทกอนอลอะเรย์ (Orthogonal array) $L_9(3^4)$	33
4-7 ผลการทำนายปริมาณเซลล์ที่ได้และค่า S/N ratios จากสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีการทากูชิ	34
4-8 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะความเหมาะสมของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ <i>W. confusa</i> NH02 จากแผนการทดลองแบบ CCD พร้อมค่าการคาดคะเนกับค่าที่ได้จากการทดลอง	36
4-9 แสดงค่าความแปรปรวนของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ <i>W. confusa</i> NH02	39
4-10 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์สมการถดถอยของการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์	39
4-11 แสดงค่าความแปรปรวนของการผลิตเซลล์	45
4-12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์สมการถดถอยของการผลิตเซลล์	46

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในการเพิ่มเนื้อสัมผัส (Texture) ของโยเกิร์ต (Guzel-Seydim, Sezgin, & Seydim, 2005) อุตสาหกรรมทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ประโยชน์จากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพื่อลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

เชื้อ *Weissella confusa* NH02 เป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน และสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล และค่าความหนืดสูง (วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ, 2551) เมื่อนำมาผลิตฟิล์มชีวภาพ (Biofilms) และนำไปประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็น พบว่าสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูได้เพิ่มขึ้นจาก 2 วัน เป็น 9 วัน นอกจากนี้หากมีการเติมสารไทมอล (Thymol) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในฟิล์มชีวภาพ ก็จะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูได้เพิ่มขึ้นเป็น 11 วัน (ศุภศิลา มณีรัตน์ และธรรมนุญ โปรบราน, 2553) อย่างไรก็ตามการผลิตฟิล์มชีวภาพดังกล่าวมีต้นทุนในการผลิตสูง หลักๆ มาจากต้นทุนในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อหาแหล่งอาหารที่มีราคาถูกที่มีซูโครสเป็นองค์ประกอบมาใช้ในการผลิต *W. confusa* NH02 แทนการใช้อาหารตัดแปลงจาก De Man Rogosa Sharpe (MRS) ที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร (ของเดิม)

### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแหล่งอาหารที่มีราคาถูกในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดเลือกแหล่งอาหารที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำอ้อย น้ำสับปะรด กากน้ำตาล น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง น้ำกาฬสำ น้ำนึ่งปลาหุ่ และกากถั่วเหลือง เป็นต้น จากนั้นนำแหล่งอาหารที่ราคาถูกที่คัดเลือกได้มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยเทคนิค Taguchi method และเทคนิค Response surface methodology (RSM)

#### 1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

ถึงแม้ว่าการศึกษาก่อนหน้านี้จะแสดงให้เห็นว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 จะมีคุณสมบัติที่ดีต่อการนำมาผลิตเป็นฟิล์มชีวภาพ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมู อย่างไรก็ตามการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 เบื้องต้น ยังคงใช้อาหารตัดแปลงจาก MRS ซึ่งมีองค์ประกอบยุ่งยาก ซับซ้อน และมีราคาแพง ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นหากมีการศึกษาหาแหล่งของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกลงที่เป็นวัสดุเศษเหลือ หรือผลพลอยได้จากการเกษตร และนำมาใช้ทดแทนในการเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ก็จะช่วยลดต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของสินค้าทางการเกษตร และยังช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

#### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลพื้นฐานการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ และเซลล์จากเชื้อ *W. confusa* NH02
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยใช้แหล่งอาหารราคาถูกต่อไป
3. เพิ่มมูลค่าของให้กับสินค้าทางการเกษตร และเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร
4. ช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 เพื่อยกระดับในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

### 1. เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides, EPS)

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides, EPS) เป็นโพลีแซคคาไรด์สายยาว ส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบของน้ำตาลต่อกันเป็นสาย หรือเป็นกิ่ง และอาจมีส่วนประกอบของโปรตีน ไขมัน สารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ โลหะบางชนิด หรือดีเอ็นเอบ้างเล็กน้อย ถึงแม้ว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สามารถสร้างหรือผลิตขึ้นได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช สัตว์ เป็นต้น และเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา ยีสต์ สาหร่าย แบคทีเรีย เป็นต้น (Mahapatra & Banerjee, 2013; Patel et al., 2012) แต่ปัจจุบันเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ และไม่ก่อโรค นอกจากนี้ยังได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (Generally Recognize As Safe, GRAS)

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติก เป็นสารเมือก (Slime) หรือแคปซูล (Capsule) ที่แบคทีเรียแลคติกขับออกมาออกเซลล์ เพื่อเป็นเกาะป้องกันตัวเซลล์เองจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ความแห้งแล้ง (Desiccation) การโอบกั้น (Phagocytosis) และการทำลายของฟาจ (Phage) ยาปฏิชีวนะหรือสารที่มีพิษ (Antibiotics and toxic compounds) เป็นต้น นอกจากนี้ยังช่วยในการยึดเกาะกับพื้นผิว (De Vuyst & Degeest, 1999) แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ส่วนใหญ่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมนม เช่น การทำโยเกิร์ต (Yoghurt) ชีส (Cheese) นมเปรี้ยวแอสซิโดฟิลัส (Acidophilus milk) และขนมหวานที่มีนมเป็นองค์ประกอบหลัก (Milk based desserts) เป็นต้น (Patel, Majumder, & Goyal, 2012)

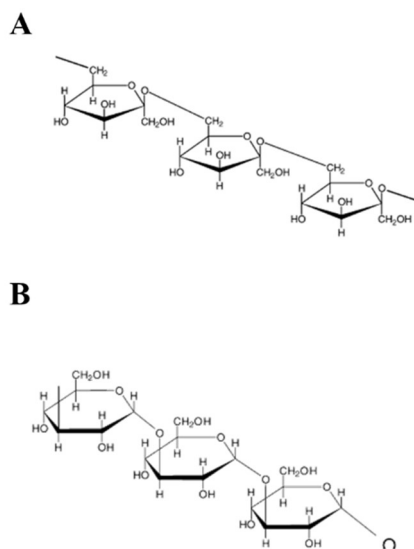
การใช้ประโยชน์ของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติกจะมีความหลากหลายแตกต่างกันไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แตกต่างกันออกไป แม้ว่าความหลากหลายของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติกจะขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ และขนาดน้ำหนักโมเลกุล แต่อย่างไรก็ตามเราสามารถจัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (Laws et al., 2001) คือ

1. กลุ่มโฮโมโพลีแซคคาไรด์ (Homopolysaccharides, HoPS) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลชนิดเดียวกันเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเกิดการเชื่อมต่อกันชนิด (linkage type) 1-2 หรือ 1-4 ของน้ำตาลเพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง หรือมีการเชื่อมต่อกันชนิดผสมรวมกันระหว่าง 1-2 และ 1-4 ก็ได้ (ภาพที่ 2-1) ความแตกต่างของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับลักษณะของโครงสร้างของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ไม่ว่าจะเป็นขนาดน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) และพันธะที่ใช้ในการเชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุล สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่ม ได้แก่

- 1.1. ฟรุคแทน (Fructans) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลฟรุคโตส (Fructose) เชื่อมต่อกัน เช่น ลีแวน (Levan) และฟรุคแทนชนิดอินนูลิน (inulin-type fructan) เป็นต้น

1.2. กลูแคน (Glucans) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลกลูโคส (Glucose) เชื่อมต่อกัน เช่น เดกซ์แทรน (Dextran) มิวแตน (Mutan) และอัลเทอเนน (alternan) เป็นต้น

Grosu-Tudor และคณะ (2013) คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากอาหารหมักพื้นบ้านจากประเทศโรมาเนีย พบว่าแบคทีเรียแลกติก 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus lactis* 1.8, *Leuconostoc citreum* 1.10, 1.11, 1.12, 2.8 และ 4.11, *Leuc mesenteroides*. 21.2, *Leuc. pseudomesenteroides* 20.6 และ *W. confusa/cibaria* 38.2 มีคุณสมบัติผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ และเมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มโฮโมโพลีแซคคาไรด์ โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ แต่อาจมีพันธะที่ใช้ในการเชื่อมต่อกันแตกต่างกันไป



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของโฮโมโพลีแซคคาไรด์ของลิแวน (Levan) (A) และมิวแตน (Mutan) (B) ที่มา: Monsan และคณะ (2001)

2. กลุ่มเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (Heteropolysaccharides, HePS) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 2-2) ซึ่งจะประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ (Monosaccharides) ตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไป และมีชนิดของน้ำตาลมากกว่า 1 ชนิด แบคทีเรียแลกติกที่ผลิตเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ *L. casei*, *L. buchneri*, *L. lactis*, *L. debrueckii*, *L. helveticus* และ *Streptococcus thermophilus* เป็นต้น (ตารางที่ 2-1)

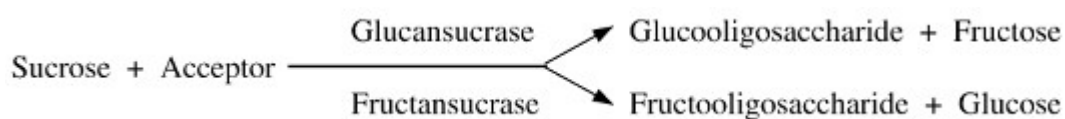


Dertli และคณะ (2013) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ทั้ง 2 ชนิดที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus johnsonii*. พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดที่ 1 (EPS1) จัดอยู่ในกลุ่ม HoEPS โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -(1,6) ในแกนหลัก (Backbone) และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -(1,2) ในสายกิ่ง (Branch) ในขณะที่เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดที่ 2 (EPS2) จัดอยู่ในกลุ่ม HeEPS โดยมีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลกาแลคโตสเชื่อมต่อกันซ้ำๆ กัน คือ  $-6)-\alpha\text{-Glc}p-(1-3)-\beta\text{-Glc}p-(1-5)-\beta\text{-Gal}f-(1-6)-\alpha\text{-Glc}p-(1-4)-\beta\text{-Gal}p-(1-4)-\beta\text{-Glc}p-(1-$

นอกจากนี้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ยังสามารถแบ่งได้ตามประจุที่มีในโครงสร้างของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (สุขใจ ชูจันทร์, 2557) ดังนี้

1. เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ประจุบวก (Cationic exopolysaccharides) ประกอบด้วยหมู่อะมิโนอิสระ (Free amino group) บางชนิด
2. เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ประจุเป็นกลาง (Neutral exopolysaccharides) ได้แก่ สิววนสเกอร์กูลูแคน พูลลูแลน (Pullulan) เดกซ์แทรน (Dextran) และเคิร์ดแลน (Curdlan) เป็นต้น
3. เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ประจุลบ (Anionic exopolysaccharides) มีหมู่แอซิดิก (Acidic groups) เช่น คาร์บอกซิลฟอสเฟต หรือซัลเฟต ได้แก่ แซนแทน (Xanthan) ฟอสโฟแมนแนน (Phosphomannan) และแอลจีเนต (Alginate)

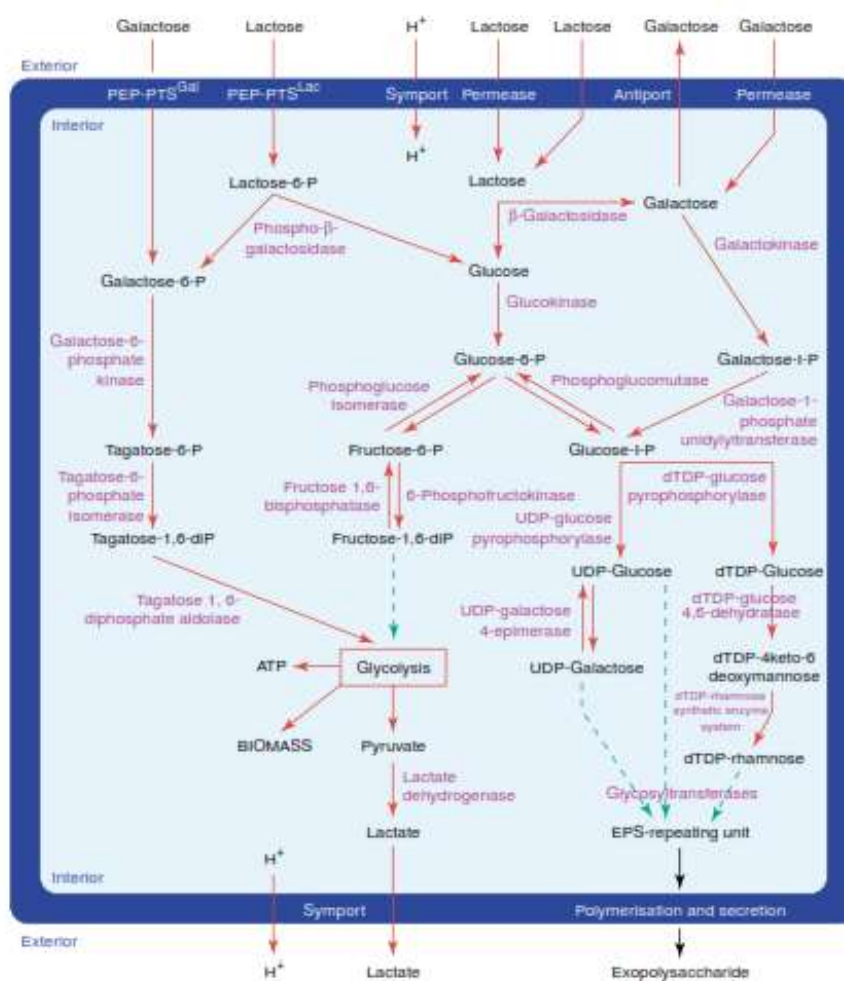
การสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลกติก มีความซับซ้อน และมีความเชื่อมโยงหรือเกี่ยวพันกับกลุ่มของยีน (Cluster gene) ไม่ว่าจะเป็นยีนที่ผลิตเอนไซม์และโปรตีนตัวควบคุม (regulatory protein) ที่แตกต่างกัน ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องนี้จะอยู่บริเวณพลาสมิด (Plasmid) ในกรณีของแบคทีเรียแลกติกที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic LAB) เช่น *Lactococcus* เป็นต้น และจะอยู่บริเวณโครโมโซม (Chromosome) ในกรณีของแบคทีเรียแลกติกที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophilic LAB) เช่น *Streptococcus* และ *Lactobacilli* เป็นต้น (Patel et al., 2012) โดยกลุ่มโฮโมโพลีแซคคาไรด์จะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์กลูแคนซูเครส (Glucansucrase) หรือเอนไซม์ฟรุคแตนซูเครส (Fructansucrase) โดยใช้ น้ำตาลซูโครสเป็นซับสเตรท (Substrate) และมีตัวรับ (Acceptor) เช่น น้ำตาลมอลโตส เป็นต้น



ภาพที่ 2-3 การสังเคราะห์ของกลุ่มโฮโมโพลีแซคคาไรด์  
ที่มา: Monsan และคณะ (2001)



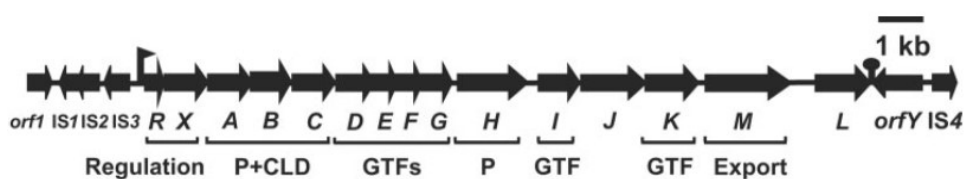
สำหรับการสังเคราะห์ของกลุ่มเฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์จะมีความซับซ้อนมากกว่ากลุ่มโฮโมโพลิแซคคาไรด์ โดยส่วนซ้ำๆ (Repeating unit) ของเฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์จะถูกสังเคราะห์ในส่วนของไซโทพลาส ได้เป็นนิวคลีโอไทด์น้ำตาล (Sugar nucleotides) ซึ่งใช้เป็นโมเลกุลส่วนต้น (Precursor molecules) ของการสังเคราะห์เฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์ จากนั้นจะถูกส่งออกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) โดยใช้เอนไซม์ไกลโคซิลทรานเฟอร์ส (Glycosyltransferases) แล้วนิวคลีโอไทด์น้ำตาลจะถูกเชื่อมต่อกันเป็นสายโพลิแซคคาไรด์ (Polymerization) ซึ่งจะยึดอยู่กับลิพิดแคริเออร์ (Lipid carrier) เพื่อควบคุมความยาวของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ แล้วจึงขับออกนอกเซลล์ (ภาพที่ 2-4) ซึ่งกลไกการสังเคราะห์เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์โดยหลักๆ จะประกอบด้วยขั้นตอน 4 ขั้นตอน ได้แก่ (i) การขนส่งน้ำตาลเข้าสู่ไซโทพลาส ซิม (Sugar transport into the cytoplasm), (ii) การสังเคราะห์ของ sugar-1-phosphates, (iii) การกระตุ้น และการจับคู่กันของน้ำตาล (Activation and coupling of sugar) และ (iv) การส่งออก (Export of EPS) (Patel และคณะ, 2012)



ภาพที่ 2-4 การสังเคราะห์เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแล็กติก  
ที่มา: Welman & Maddox (2003)

Dabour และ LaPointe (2005) ศึกษาากลุ่มของยีนที่สังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461 พบว่ากลุ่มของยีนสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อยู่บริเวณโครโมโซมของเซลล์ มีขนาดประมาณ 13.2 กิโลเบส (kb) โดยสามารถถอดรหัสเป็นลำดับกรอบอะมิโน (Open reading frames, ORFs) ทั้งหมด 15 ORFs ซึ่งประกอบด้วยยีนควบคุม (*epsR*) ยีน chain length determination (*epsABC*) ยีนสังเคราะห์ส่วนซ้ำๆ (*epsDEFG*, *epsI* และ *epsK*) ยีนที่ใช้ในการเชื่อมต่อกันเป็นสายโพลีแซคคาไรด์ (*epsH*) และยีนที่ช่วยในการส่งออก (*epsM*) (ภาพที่ 2-5)

อย่างไรก็ตามกลไกการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติกก็จะมีหลากหลายของกลุ่ของยีน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก นอกจากนี้แล้วเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะมีชนิด และสมบัติที่มีความหลากหลายแตกต่างกัน ยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ชนิดของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น (Malang et al., 2015) พบว่า *W. confusa* สายพันธุ์เดียวจะผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้หลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอน เช่น การเลี้ยง *W. confusa* 11GU-1 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน จะได้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดเดกซ์แทรน แต่หากเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะได้กลุ่มของเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ เป็นต้น



ภาพที่ 2-5 กลุ่มของยีนที่สังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461

ที่มา: Dabour และ LaPointe (2005)

นอกจากนี้แล้วยังมีปัจจัยทางกายภาพ เช่น พีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง เป็นต้น จะมีผลต่อผลผลิตของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (EPS yield) ที่ได้ โดยที่พีเอช และอุณหภูมิจะมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก และการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Zhang et al., 2011) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *S. thermophiles* ST1 พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้น 6.5 จะได้ปริมาณของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุด แต่ผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 5.0, 6.0 และ 7.0 ซึ่งการลดลงของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์นั้นมีความสอดคล้องกับการเจริญที่ลดลงของเชื้อ *S. thermophiles* ST1

Gassem, Schmidt และ Frank (1997) ได้ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR พบว่าการควบคุมพีเอชมีอิทธิพลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มากกว่าองค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

Vijayendra และ Babu (2008) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Leuconostoc* sp. CFR-2181 พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Leuconostoc* sp. CFR-2181 ในอาหารมีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโดยปริมาตร ที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.7 และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จะได้ปริมาณของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 18.38 กรัมต่อลิตร

การประยุกต์ใช้ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น ทางทางการแพทย์ เครื่องสำอาง ทางเภสัช เป็นต้น โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ถูกนำไปใช้เพื่อประโยชน์หลายอย่าง (Sanalibaba & Cakmak, 2016) ได้แก่

1. การควบคุมความหนืดและการไหล
2. การพัฒนาเนื้อสัมผัส (texture) ความรู้สึกจากการชิม (mouth feel) และความคงตัวของอาหารต่อการแช่แข็ง-ละลาย (freeze-thaw stability)
3. สารเพิ่มความข้นหนืด thickeners softeners)
4. สารแขวนลอย (suspending agents)
5. ผลิตภัณฑ์อาหารควบคุมแคลอรี (low calories food products)
6. ไฟเบอร์อาหาร (dietary fiber)
7. ฟิ์มส์และสารเคลือบ (films and coating agent)
8. น้ำสลัด (salad dressing)
9. ไอซิ่งในอาหารแช่แข็ง (frozen food icing)
10. สารให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว (moisturizing agent)

แม้ว่าการศึกษาดังเดิมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 โดย Wongsuphachat และคณะ (2010) จะพบว่าเชื้อ *W. confusa* NH02 มีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารตัดแปลง MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0 ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร น้ำหนักโดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีทริปโตเนน (Tryptone) 10 กรัมต่อลิตร น้ำหนักโดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง จะได้ปริมาณของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 18.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นการทดลองแบบทีละปัจจัย (One factor at a time) โดยศึกษาปัจจัยที่สนใจ (Factor) แล้วกำหนดให้ปัจจัยอื่นๆ คงที่ และเมื่อได้ค่าผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจึงเปลี่ยนระดับของปัจจัยที่ศึกษาและเมื่อให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้ว จึงเปลี่ยนไปศึกษาปัจจัยตัวที่สอง และทำอย่างนี้ไปเรื่อยๆ จนครบปัจจัยที่ต้องการศึกษา ซึ่งวิธีการทดลองนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ เนื่องจากมีข้อดี คือ ขั้นตอนการทดลองไม่ยุ่งยาก แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อเสีย คือ ไม่สามารถทราบผลของปัจจัยที่มีร่วมกันได้ รวมทั้งใช้ระยะเวลานานหากทำการศึกษาหลายปัจจัย นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากวิธีดังกล่าวอาจให้ผลการทดลองได้ไม่ดีที่สุด (Box, 2006; Giesbrecht and Gumpertz, 2004)

## ตารางที่ 2-2 การประยุกต์ใช้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	การประยุกต์ใช้
เดกซ์แทรน (dextran)	สารเสริมฤทธิ์ อิมัลซิไฟเออร์ สารให้ความคงตัวและสารเหนียวนำในอาหารและยา
อัลเทอแนน (akternan)	พรีไบโอติก สารให้ความหวาน สารเพิ่มปริมาณในการลดความหนืด
รอยเทอเรน (reuteran)	ในเบเกอรี่
ลีแวน (levan)	พรีไบโอติก คุณสมบัติต้านมะเร็ง กาว สารเพิ่มความข้นหนืด
อินนูลิน (inulin)	พรีไบโอติก ยับยั้งเชื้อก่อโรค สารแทนไขมัน
คีฟิเรน (kefiran)	คุณสมบัติหยุดยั้งหนืด ยับยั้งจุลินทรีย์ ความสามารถในการลดความดันในเลือด
โอลิโกแซคคาไรด์	พรีไบโอติก โภชนเภสัช วัตถุเจือปนอาหาร สารป้องกันมะเร็ง ลดระดับไขมันในเลือด เครื่องสำอางสำหรับผิว
กลูแคน	สารเสริมในซีต
เบต้า และอัลฟา กลูแคน	สารตั้งต้น

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Sanalibaba & Cakmak (2016)

การทดลองทางสถิติ (Experimental design) ซึ่งเป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยที่สนใจ โดยใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์มาประยุกต์ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีความครอบคลุม รวมทั้งลดระยะเวลาและทรัพยากรในการทดลอง เช่น การทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial) เป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ต้องการศึกษาได้ในเวลาเดียว นอกจากนี้ยังทราบผลของปัจจัยที่มีผลร่วมกัน (Interaction) (Box et al., 2005) แต่การทดลองแบบนี้จะมีชุดทดลองเป็นจำนวนมากหากมีระดับของปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายระดับ ดังนั้นจึงนิยมทำการทดลองเพียงสองระดับเท่านั้น

## 2. การวางแผนการทดลองแบบวิธีการทาคุชิ (Taguchi method)

การวางแผนการทดลองแบบวิธีการทาคุชิ (Taguchi method) เป็นวิธีการออกแบบการทดลองที่ให้ความสำคัญกับการออกแบบที่ทำให้สถานะของกระบวนการหรือผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ต้องมีคุณภาพสูง ด้วยค่าใช้จ่ายในการพัฒนาและการผลิตที่ต่ำ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีการทดลองที่สามารถศึกษาปัจจัยหลายๆ อย่างพร้อมกัน โดยมีวิธีการคำนวณที่ไม่ยุ่งยาก และใช้จำนวนการทดลองน้อยกว่าการออกแบบการทดลองแบบอื่นๆ เช่น การออกแบบแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลสมบูรณ์ (Full factorial design) และการออกแบบแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลบางส่วน (Fractional factorial design) เป็นต้น โดยการใช้เครื่องมือที่เรียกว่า ออกทอกอนอลอะเรย์ (Orthogonal array) โดยกำหนดให้ปัจจัยที่ควบคุมได้เป็น Outer array และปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้เป็น Inner array เช่น ถ้ามีปัจจัยศึกษา 4 ปัจจัย และมี 3 ระดับ ดังนั้นจะได้ออกทอกอนอลอะเรย์ ใช้ L9 ดังแสดงในตารางที่ 2-3 สามารถออกแบบการทดลองได้ 9 ชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-3 ตัวแปร (Parameter) และระดับ (Level) ที่ใช้ในการออกแบบวิธีการทากูชิ (Taguchi's experimental design)

		Number of Parameters (P)													
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Number of Levels	2	L4	L4	L8	L8	L8	L8	L12	L12	L12	L12	L16	L16	L16	L16
	3	L9	L9	L9	L18	L18	L18	L18	L27	L27	L27	L27	L27	L36	L36
	4	L16	L16	L16	L16	L32	L32	L32	L32	L32					
	5	L25	L25	L25	L25	L25	L50	L50	L50	L50	L50	L50			

ตารางที่ 2-4 ออทอกอนอลอะเรย์ (Orthogonal array)  $L_9(3^4)$  ของการออกแบบวิธีการทากูชิ (Taguchi's experimental design)

Experiment	P1	P2	P3	P4	Response	S/N ratio
1	1	1	1	1	Y1	Z1
2	1	2	2	2	Y2	Z2
3	1	3	3	3	Y3	Z3
4	2	1	2	3	Y4	Z4
5	2	2	3	1	Y5	Z5
6	2	3	1	2	Y6	Z6
7	3	1	3	2	Y7	Z7
8	3	2	1	3	Y8	Z8
9	3	3	2	1	Y9	Z9

อัตราส่วนสัญญาณไปยังสิ่งรบกวน (Signal-to-noise ratio; S/N) เป็นเครื่องมือวัดประสิทธิภาพของกระบวนการร่วมกันระหว่างค่าเฉลี่ยกับค่าผันแปร (Single performance measure) จึงได้ค่าที่เหมาะสมโดยการลดความผันแปรของกระบวนการ ซึ่งความสัมพันธ์ของสมการอัตราส่วนไปยังสิ่งรบกวนนั้น เลขเศษหรือสัญญาณของอัตราส่วน คือ ความสามารถของกระบวนการในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ดี หรือความสามารถของผลิตภัณฑ์เพื่อการดำเนินการได้ถูกต้อง ตัวส่วน คือ ผลรวมของผลกระทบของปัจจัยแทรกซ้อนที่มีต่อกระบวนการหรือผลิตภัณฑ์

การวิเคราะห์อัตราส่วนสัญญาณไปยังสิ่งรบกวน (Signal-to-noise ration; S/N) สามารถคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$S/N = -\log(MSD)$$

โดยที่ MSD (mean square deviation) คือ ตัวแปรค่าหนึ่งที่ได้มาจากการคำนวณตามแนวทางของทากูชิ ซึ่งมีอยู่ 3 วิธี ได้แก่

(1) กรณีต้องการค่าน้อยกว่าเป็นค่าที่ดีที่สุด (Lower is Better) คำนวณได้จาก

$$MSD = \frac{1}{n} \sum y^2$$

(2) กรณีต้องการค่ามากกว่าเป็นค่าที่ดีที่สุด (Higher is Better) คำนวณได้จาก

$$MSD = \frac{1}{n} \sum \frac{1}{y^2}$$

(3) กรณีต้องการค่าตามต้องการเป็นค่าที่ดีที่สุด (Nominal is Best) คำนวณได้จาก

$$MSD = \frac{1}{n} \sum (y - m)^2$$

โดยที่ T คือ Target value

สำหรับการประมาณอิทธิพลของแต่ละปัจจัย (analysis of means) โดยการใช้ค่าเฉลี่ยในการวิเคราะห์ โดยคำนวณค่าเฉลี่ยรวมของ S/N ratio ในการทดลองโดยใช้สูตร

$$S/N \text{ ratio} = \frac{1}{n} \sum S/N_i$$

สำหรับการหาอิทธิพลของระดับต่างๆ ในแต่ละปัจจัยต่อค่าตอบสนองที่สนใจ สามารถคำนวณได้จากค่าเฉลี่ยในแต่ละระดับที่มีอยู่ในชุดการทดลอง (Mean of one factor at level,  $ML_{F,i}$ ) เช่น หากสนใจว่าระดับใดของปัจจัย P2 ที่เหมาะสม สามารถคำนวณได้ ดังนี้

$$ML_{P2,1} = \frac{Z_1 + Z_4 + Z_7}{3}$$

$$ML_{P2,2} = \frac{Z_2 + Z_5 + Z_8}{3}$$

$$ML_{P2,3} = \frac{Z_3 + Z_6 + Z_9}{3}$$

ค่าเฉลี่ยที่ได้ในแต่ละระดับของแต่ละปัจจัย สามารถแจกแจงดังแสดงในตารางที่ 2-5

ตารางที่ 2-5 การวิเคราะห์ผลของการทดสอบอรรถกอนอละเรย์ (Orthogonal array)  $L_9(3^4)$

Level	P1	P2	P3	P4
K1	$ML_{P1,1}$	$ML_{P2,1}$	$ML_{P3,1}$	$ML_{P4,1}$
K2	$ML_{P1,2}$	$ML_{P2,2}$	$ML_{P3,2}$	$ML_{P4,2}$
K3	$ML_{P1,3}$	$ML_{P2,3}$	$ML_{P3,3}$	$ML_{P4,3}$
$R = \max(k_i) - \min(k_i)$	$R_{P1}$	$R_{P2}$	$R_{P3}$	$R_{P4}$
Rank	.....	.....	.....	.....

ผลต่างของค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของระดับ (R) ในแต่ละปัจจัย สามารถนำมาอธิบายอิทธิพลของปัจจัยนั้นๆ ได้ กล่าวคือ หากค่า R มีค่ามากแสดงว่าปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อค่าตอบสนองที่เราสนใจนั้นมาก และสามารถจัดอันดับความสำคัญในแต่ละปัจจัยได้

Yu, Chen และคณะ (2018) ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาร์ไรต์จากเชื้อ *Weissella cibaria* 27 โดยวิธาทากูชิ พบว่า อิทธิพลที่มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาร์ไรต์จากเชื้อ *Weissella cibaria* 27 มากที่สุด คือ อุณหภูมิ รองลงคือ เวลา และพีเอชเริ่มต้น โดยสภาวะที่เหมาะสม คือ การเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีพีเอช 6.3 และบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

### 3. การวางแผนการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM)

สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) เป็นการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของผลตอบสนอง ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์และสถิติในการวางแผนการทดลอง และมีการประยุกต์ใช้ RSM อย่างกว้างขวางในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และด้านอุตสาหกรรม นอกจากนี้วิธี RSM มีแผนการทดลองที่นิยมใช้อยู่ 2 แผนการทดลอง คือ (i) แผนการทดลองแบบบ็อกซ์วิลสัน (Box-Wilson experimental design) และ (ii) แผนการทดลองแบบบ็อกซ์เบห์นเคน (Box-Behnken design) แต่ที่นิยมใช้คือแผนการทดลองแบบบ็อกซ์วิลสัน เนื่องจากการทดลองดังกล่าวสามารถแก้ปัญหาของการออกแบบ  $3^n$  factorial designs ในการศึกษาปัจจัยที่มากกว่า 2 ตัวแปรเชิงปริมาณ และให้การทดลองที่ครอบคลุมกว่าแผนการทดลองแบบบ็อกซ์เบห์นเคน ซึ่งต้องทำการทดลองค่อนข้างมากในการออกแบบ  $3^n$  factorial designs ดังนั้นเพื่อลดจำนวนของการทดลอง (Box & Wilson, 1992) ได้คิดค้นแผนการทดลองประกอบศูนย์กลาง (Central Composite Design, CCD) ซึ่งพัฒนาจากแผนการทดลองแบบแฟคเทอเรียลที่มีระดับปัจจัย 2 ระดับ ( $2^n$  factorial design) อย่างไรก็ตามแผนการทดลองแบบ CCD จึงเพิ่มระดับการทดลองแฟคเทอเรียลที่จุดศูนย์กลาง

(Center) และแนวแกน (Axial) โดยแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ระดับต่ำสุด ( $-\alpha$ ) ต่ำ (-1) กลาง (0) สูง (+1) และระดับสูงสุด ( $+\alpha$ ) (Cochran & Cox, 1992) เพื่อสร้างรูปแบบความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งหรือตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสองได้ และในการวางแผนการทดลอง CCD มีจำนวนการทดลองเท่ากับ  $2^n + (2n + 6)$  สำหรับการทดลองที่มีปัจจัยหรือตัวแปรต้น 4 ตัวแปร ดังแสดงในตารางที่ 2-5 มีจำนวนการทดลองทั้งหมด 30 การทดลอง เปรียบเทียบกับ  $3^n$  factorial designs มีจำนวนการทดลองทั้งหมด 81 การทดลอง สำหรับรหัสของปัจจัยหรือตัวแปรอิสระในการวางแผนการทดลองสามารถคำนวณจากสมการ

$$x_i = (X_i - X_{cp}) / \Delta X_i$$

$x_i$  คือ รหัสที่ใช้ในการวางแผนการทดลองแบบ CCD

$X_i$  คือ ค่าจริงของระดับปัจจัยในการทดลอง

$X_{cp}$  คือ ค่าจริงของระดับกลางของปัจจัยในการทดลอง

$\Delta X_i$  คือ ผลต่างของระดับปัจจัย

นอกจากนี้วิธีการนี้ให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นกับผลตอบสนอง ความสัมพันธ์ดังกล่าวแสดงเป็นสมการพหุนามกำลังสอง (Myers & Montgomery, 1995) ดังแสดงในสมการ คือ

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i,j=1}^4 \beta_{ij} X_i X_j$$

โดยที่  $\beta_0$  คือ ค่าคงที่

$\beta_i$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงโดย  $i$  คือ ลำดับของตัวแปร

$\beta_{ii}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นโค้งโดย  $i$  คือ ลำดับของตัวแปร

$\beta_{ij}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีผลร่วมกันโดย  $i$  และ  $j$  คือ ลำดับของตัวแปร

คำนวณผลความคลาดเคลื่อนผลรวมของกำลังสอง (Sum square) ความเบี่ยงเบนความคลาดเคลื่อนของผลรวมกำลังสอง (Mean square) และความมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value) โดยใช้ ANOVA ผลรวมกำลังสองทั้งหมดคำนวณได้จากสมการ (Sum Square total, SSto)

$$SSto = \sum y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{N}, (Df = N-1)$$

$Y_i$  คือ ผลการตอบสนองที่ได้แต่ละชุดการทดลอง

$N$  คือ จำนวนการทดลองทั้งหมด



ผลรวมกำลังสองของเชิงเส้นตรง (Sum square regression linear, SSrl) เชิงเส้นโค้ง (Sum square regression quadratic, SSrq) และผลร่วมนกัน (Sum square regression interaction, SSri) ของรูปแบบความสัมพันธ์ลำดับที่สอง คำนวณได้ดังนี้

$$SSrl = \sum_{i=1}^n b_i g_i \quad (Df = n)$$

$b_i$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรง โดย  $i$  คือ ลำดับของตัวแปร

$g$  คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคุณกับเมตริก  $X'$  ในเทอมของเชิงเส้นตรงโดย  $i$  คือ ลำดับของตัวแปร

$n$  คือ จำนวนปัจจัย

$$SSrq = \sum_{i=1}^n b_{ii} g_i^2 \quad (Df = n)$$

$b_{ii}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นโค้ง โดย  $i$  คือ ลำดับของตัวแปร

$g_i$  คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคุณกับเมตริก  $X'$  ในเทอมของเชิงเส้นโค้งโดย  $i$  คือ ลำดับของตัวแปร

$n$  คือ จำนวนปัจจัยหรือตัวแปรในการศึกษา

$$SSri = \sum_{i,j=1}^n b_{ij} g_i g_j \quad (Df = m \frac{(m-1)}{2})$$

$b_{ij}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีผลร่วมนกัน โดย  $i$  และ  $j$  คือ ลำดับของตัวแปร

$g_i g_j$  คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคุณกับเมตริก  $X'$  ในเทอมที่มีผลร่วมนกัน โดย  $i$  คือ ลำดับของตัวแปร

$m$  คือ จำนวนตัวแปรที่มีผลร่วมนกัน

ผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Sum Square regression, SSr) คำนวณได้จาก

$$SSr = SSrl + SSrq + SSri \quad (Df = n \frac{(n+3)}{2})$$

ผลรวมความคลาดเคลื่อนกำลังสองของการทดลอง (Sum Square error, SSe) คำนวณได้

จาก

$$SSe = SSto - SSr \quad (Df = N \frac{(n+3)}{2})$$

ตารางที่ 2-6 แผนการทดลองประกอบศูนย์กลาง (Central Composite Design, CCD) ของตัวแปรอิสระ (Independent variables)

Run	Independent variables			
	A	B	C	D
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

ที่มา: (Song, Zhang, Kuang, Zhu, & Guo, 2007)

คำนวณความเบี่ยงเบนกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Mean square regression, MSr) คำนวณได้จาก

$$MSr = \frac{SSr}{Df_{SSr}}$$

SSr คือ ผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย

Df<sub>SSr</sub> คือ องศาอิสระของผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย

ความแตกต่างมีนัยสำคัญ (p-value) ของสมการพหุนามกำลังสองหรือรูปแบบสมการถดถอย คำนวณได้จากสมการ

$$F = \frac{MSr}{MSe}$$

ผลจากการคำนวณความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสมการพหุนามกำลังสองโดยสมการข้างต้นสามารถคำนวณค่า F-value เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเทียบค่าที่ได้จากการคำนวณโดยสมการกับค่าที่ได้จากตารางแจกแจง F ซึ่งกำหนดค่าองศาความอิสระ (Degree of freedom) เท่ากับจำนวนองศาอิสระของผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Df<sub>1</sub>) และจำนวนองศาอิสระของผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อนกำลังสอง (Df<sub>2</sub>) (ไพโรโรจน์ วิริยจारी, 2544) โดยกำหนดให้ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ดังนั้นหากค่า F-value ที่ได้จากการคำนวณมากกว่าค่า F-value จากตาราง F แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนอง (Y) และปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษาสามารถอธิบายด้วยความสัมพันธ์ลำดับที่สอง (Quadratic model)

Prathima และคณะ (2014) ได้ศึกษาปัจจัยที่ผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *L. lactis* NCDC 191 โดยการมีการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยมีปัจจัยการศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิของการเลี้ยง พีเอช ปริมาณของน้ำตาลกลูโคส และปริมาณของเคซีนไฮโดรไลซิส (Casein hydrolysate) พบว่าการเลี้ยง *L. lactis* NCDC 191 ในอาหาร DP whey ที่มีปริมาณของน้ำตาลกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณของเคซีนไฮโดรไลซิส 1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีพีเอช 6.8 และนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะให้การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณสูงสุดเท่ากับ 153.39 มิลลิกรัมต่อลิตร

Seesuriyachan และคณะ (2012) ใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง แบบ CCD ในการศึกษาผลของปริมาณของเกลือ ปริมาณของน้ำตาลซูโครส และระยะเวลาของการเลี้ยงต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *L. confusus* TISTR1498 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วย อาหารที่มีปริมาณของเกลือ 4.97 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณของน้ำตาลซูโครส 136.5 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 86.36 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 40.79 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Moghannem และคณะ (2018) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Bacillus velezensis* KY471306 โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองวางแผนการทดลองแบบบล็อกซ์เป็นเกณฑ์ โดยศึกษาปัจจัยของสารอาหาร และสภาพแวดล้อม ประกอบด้วย กากน้ำตาล ยีสต์สกัด และอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. velezensis* KY471306 คือ ปริมาณกากน้ำตาลเท่ากับ 12 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณยีสต์สกัดเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

อย่างไรก็ตามการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ในการศึกษาดั้งเดิมยังพบข้อบกพร่องในเรื่องต้นทุนในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เนื่องจากต้องใช้อาหารดัดแปลง MRS ซึ่งมีความซับซ้อนขององค์ประกอบของอาหาร และองค์ประกอบบางชนิดมีราคาแพง เช่น น้ำตาลซูโครส ยีสต์สกัด (Yeast extract) และทริปโตน เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการแก้ไขปัญหา เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่ประกอบอาชีพเกษตรกรรมเป็นหลัก

น้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดต่อการเจริญ และผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ซึ่งต้องใช้ปริมาณ 40 กรัมต่อลิตร (Wongsuphachat et al., 2010) แหล่งของน้ำตาลซูโครสจากการเกษตรซึ่งอาจนำมาใช้เป็นซับสเตรท (Substrate) ราคาถูกในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำอ้อย น้ำสับปะรด เป็นต้น อย่างไรก็ตามแหล่งของน้ำตาลซูโครสจากการเกษตรอาจมีปริมาณของน้ำตาลซูโครสที่น้อยเกินกว่าปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 เช่น น้ำมะพร้าวมีองค์ประกอบของน้ำตาลซูโครส 6.7 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 5.0 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลฟรุคโตส 7.1 กรัมต่อลิตร (Unagul et al, 2007) เป็นต้น ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ อาจมีการเติมแหล่งของน้ำตาลซูโครสราคาถูกอื่นเพิ่มเข้าไป เช่น กากน้ำตาล น้ำตาลทราย เป็นต้น

Tayuan และคณะ (2011) ศึกษาปัจจัยของแหล่งคาร์บอนราคาถูก ได้แก่ กากน้ำตาล และน้ำตาลทรายขาว เพื่อใช้ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Weissella* sp. เปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครสเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) พบว่าการใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Weissella* sp. PSMS4-4

Kuntiya และคณะ (2010) พบว่าเชื้อ *L. confusus* TISTR1498 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 31.5 กรัมต่อลิตร ในอาหารดัดแปลง MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส และน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบ

ทริปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดต่อการเจริญ และผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ซึ่งต้องใช้ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร (Wongsuphachat et al., 2010) แม้ว่าในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจะเป็นแหล่งของคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติก แต่อาจมีปริมาณไม่พอเหมาะต่อการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ดังนั้นการใช้กากถั่วเหลือง น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำกากสำ เป็นแหล่ง

ไนโตรเจนราคาถูก จึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (Altaf et al., 2007) เลือกใช้ถั่วเลนทิล (Red lentil) และเซลล์เบเกอร์ยีสต์ (Baker's yeast cells) เป็นแหล่งของไนโตรเจนราคาถูกในการเลี้ยงเชื้อ *L. amylophilus* GV6 ในการผลิตกรดแลกติก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร รวมทั้งของเสีย (Wastes) หรือผลิตผลพลอยได้ (By-product) จากโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 เพื่อลดต้นทุนในกระบวนการผลิต ได้ผลคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ใช้ผลิตในเชิงพาณิชย์ได้

## บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 การเตรียมเชื้อ *W. confusa* NH02

เลี้ยงเชื้อ *W. confusa* NH02 ที่เก็บในกลีเซอรอลที่ -20 องศาเซลเซียส ในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบนอาหารตัดแปลงจาก De Man Rogosa Sharpe (MRS) agar ที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร คัดเลือกโคโลนีที่สร้างเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยใช้ลูปแตะแล้วดึง แล้วนำไปทดสอบสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของ *W. confusa* NH02 โดยการย้อมแกรม แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เชื้อ *W. confusa* NH02 ต้องติดสีแกรมบวกและไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส นำโคโลนีที่คัดเลือกได้มาเก็บเชื้อไว้ในอาหาร MRS broth ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร (% v/v) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อ *W. confusa* NH02 ที่เก็บในกลีเซอรอลที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อได้ที่ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หรือ 1 % v/v ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำซ้ำประมาณ 1-2 ครั้ง นำเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโดยปริมาตร (0.85% w/v NaCl) ประมาณ 2-3 ครั้ง แล้วจึงละลายตะกอนเซลล์กลับในสารละลาย 0.85% w/v NaCl ในปริมาตรเท่าเดิม จากนั้นนำมาปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD<sub>600</sub>) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ให้ได้เท่ากับ 0.5 แล้วนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อไป

### 3.3 การศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 1 % v/v ลงใน อาหารตัดแปลงจาก De Man Rogosa Sharpe (MRS) broth ที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หาการเจริญของเซลล์โดยการวัดค่าการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

#### 3.3.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dye weight)

นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลาย 0.85% w/v NaCl ประมาณ 2-3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส

เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียดชนิดทศนิยม 3 ตำแหน่ง

### 3.3.2 การหาปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาเติมด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนระหว่างเอทานอลต่อสารละลายส่วนใสที่ได้ 0.5 ต่อ 1 (0.5:1) ทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ล้างตะกอนเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นจำนวน 2-3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำไปทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccator) แล้วนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียดชนิดทศนิยม 3 ตำแหน่ง

## 3.4 การเตรียมวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งอาหาร

### 3.4.1 น้ำมะพร้าว

เป็นน้ำมะพร้าวที่ได้จากมะพร้าวแก่ที่เหลือจากร้านขายมะพร้าวขูด และน้ำกะทิ ในตลาดที่อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว นำน้ำมะพร้าวที่มาเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

### 3.4.2 น้ำอ้อย

เป็นน้ำอ้อยที่ได้จากตลาดที่อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว นำน้ำอ้อยที่มาเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

### 3.4.3 น้ำสับปะรด

เป็นน้ำสับปะรดที่คั้นมาจากเศษวัสดุเหลือจากร้านขายผลไม้ ได้แก่ เปลือกสับปะรด แกนสับปะรด และเศษเหลืออื่นๆ ที่ได้จากสับปะรด เป็นต้น นำน้ำที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง และนำน้ำที่ได้ที่มาเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

## 3.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

โดยชั่งแหล่งคาร์บอนเสริม (C2) ปริมาณ 40 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน (N) ปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนหลัก (C1) 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้า แล้วนำไปปรับค่าพีเอชที่ต้องการโดยการใช้สารละลายไฮโดรเจนคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1M HCl) หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (1N NaOH) แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยแหล่งคาร์บอนหลัก ใส่ลงในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอร์นต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 20 นาที

### 3.6 การคัดเลือกแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกต้องการผลิตเอ็กซ์โพสิทีแซคคาไรด์โดยวิธีทาคุชิ

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 1 % v/v ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3-1 และ 3-2 ตามแผนการทดลองแบบ Taguchi method ที่ได้จากโปรแกรม Design Expert soft ware แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นไปวิเคราะห์หาการเจริญของเซลล์โดยการวัดค่าการหาค่าการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณเอ็กซ์โพสิทีแซคคาไรด์

**ตารางที่ 3-1** ตัวแปรของแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ และค่าพีเอชที่เลือกใช้ในการผลิตเอ็กซ์โพสิทีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	Symbol	ระดับ (Level)		
		ระดับที่ 1	ระดับที่ 2	ระดับที่ 3
แหล่งคาร์บอนหลัก (100% v/v)	C1	น้ำมะพร้าว	น้ำอ้อย	น้ำสับปะรด
แหล่งคาร์บอนเสริม (40 g/L)	C2	กากน้ำตาล	น้ำตาลทรายขาว	น้ำตาลมะพร้าว
แหล่งไนโตรเจน (2 g/L)	N	กากถั่วเหลือง	แอมโมเนียมซัลเฟต	ผงชูรส
พีเอช	pH	5	6	7

**ตารางที่ 3-2** ค่ากำหนด Orthogonal array แบบ 4 ตัวแปร ซึ่งมีระดับของการศึกษาในแต่ละตัวแปร 3 ระดับ (L9 (3<sup>4</sup>))

Experiments	Factors			
	C1	C2	N	pH
1	2	1	2	3
2	1	3	3	3
3	3	2	1	3
4	1	1	1	1
5	2	2	3	1
6	3	1	3	2
7	3	3	2	1
8	1	2	2	2
9	2	3	1	2



### 3.7 การคัดเลือกปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ด้วยเทคนิค Response surface methodology (RSM)

สำหรับการศึกษาปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 โดยการวางแผนการทดลองแบบ Response surface methodology (RSM) โดยใช้เทคนิค Central Composite Design (CCD) ซึ่งมีที่กำหนดค่าสูงสุดและต่ำสุดเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -1.68, -1, 0, +1 และ +1.68 จากนั้นนำไปบ่มเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาการเจริญของเซลล์โดยการวัดค่าการหาค่านักเซลล์แห้ง และปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

**ตารางที่ 3-3** ตัวแปรของแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ และค่าพีเอชที่เลือกใช้ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02

Variables	Symbol	Unit	ระดับ (Level)				
			-1.68	-1	0	+1	+1.68
กากน้ำตาล	$X_1$	g/L	6.4	20	40	60	73.6
กากถั่วเหลือง	$X_2$	g/L	0.3	1	2	3	3.7
อุณหภูมิ	$X_3$	°C	28.6	32	37	42	45.4

ตารางที่ 3-4 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาร์ไรด์ และเซลล์โดยเชื้อ *W. confusa* NH02 จากแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

Run	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1.68	0	0
10	1.68	0	0
11	0	-1.68	0
12	0	1.68	0
13	0	0	-1.68
14	0	0	1.68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

#### 4.1 การศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02

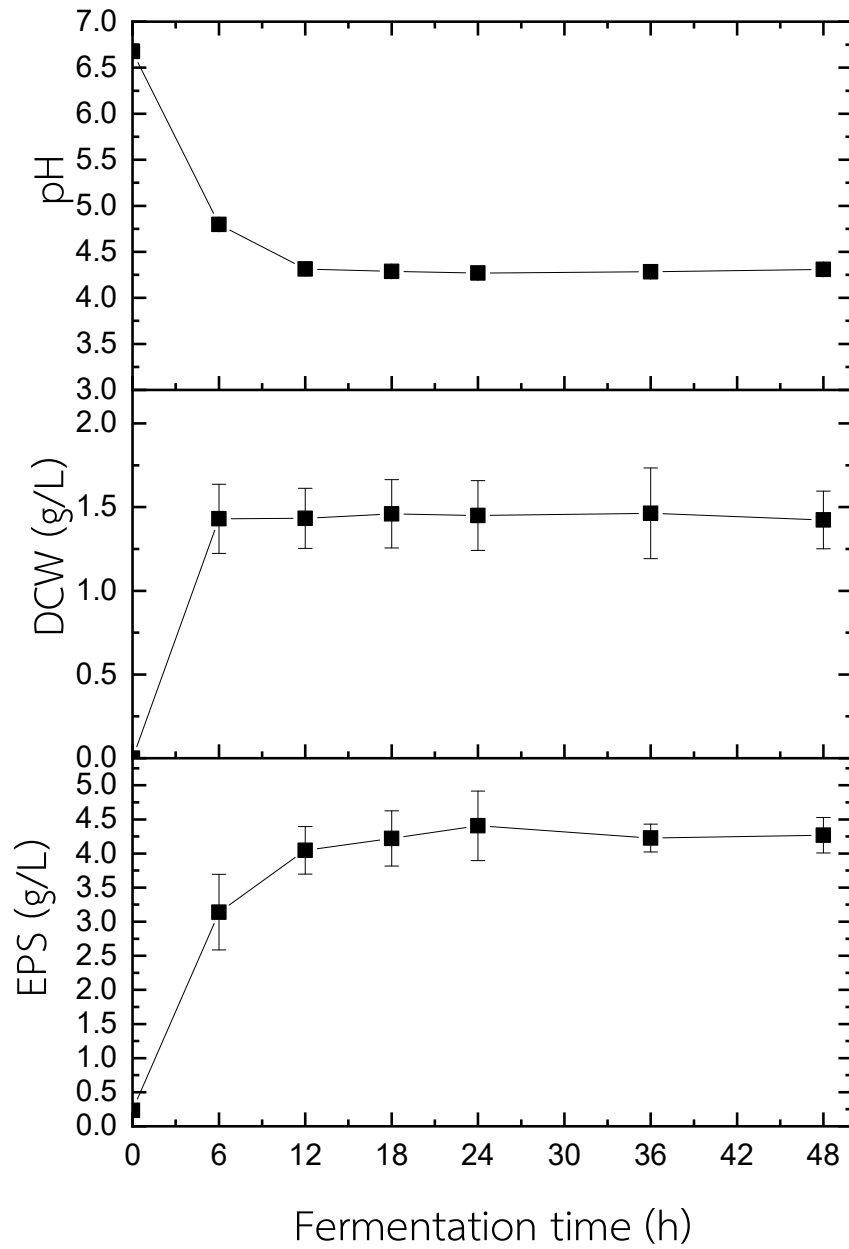
การศึกษาการเจริญ และการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อ *W. confusa* NH02 ในอาหาร MRS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และทริปโตเนน (tryptone) ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเท่ากับ 7.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-1 พบว่า เชื้อ *W. confusa* NH02 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญจะเริ่มช้าลง และเข้าสู่ระยะคงที่ โดยเชื้อจะมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง และพบว่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชมีความสัมพันธ์ในทางผกผันกับการเจริญของเชื้อ โดยพีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการเจริญ โดยพีเอชจะลดลงจาก  $6.68 \pm 0.02$  เป็น  $4.80 \pm 0.03$  จากนั้นการเจริญจะเริ่มลดลงอย่างช้าๆ และเข้าสู่ระยะคงที่ โดยพบว่าค่าพีเอชต่ำสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ  $4.31 \pm 0.02$

ตารางที่ 4-1 การเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเชื้อ *W. confusa* NH02

Fermentation times (h)	pH	Cell Dry weight (g/L)	Exopolysaccharides production (g/L)
0	$6.68 \pm 0.02^a$	$0.00 \pm 0.00^b$	$0.23 \pm 0.09^c$
6	$4.80 \pm 0.03^b$	$1.43 \pm 0.21^a$	$3.14 \pm 0.55^b$
12	$4.31 \pm 0.02^c$	$1.43 \pm 0.18^a$	$4.05 \pm 0.35^a$
18	$4.29 \pm 0.04^c$	$1.46 \pm 0.20^a$	$4.22 \pm 0.40^a$
24	$4.27 \pm 0.01^c$	$1.45 \pm 0.21^a$	$4.41 \pm 0.51^a$
36	$4.28 \pm 0.03^c$	$1.46 \pm 0.27^a$	$4.23 \pm 0.20^a$
48	$4.31 \pm 0.04^c$	$1.42 \pm 0.17^a$	$4.27 \pm 0.26^a$

\* Means with different superscripts in the same column are significantly at  $P < 0.05$

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อ *W. confusa* NH02 มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ พบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 6 ชั่วโมงแรก และพบการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อย่างรวดเร็วใน 6 ชั่วโมงแรก เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามภายหลังจากเวลาที่ 6 ชั่วโมง แม้ว่าจะพบการเจริญของเชื้อคงที่ แต่ยังคงพบการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อย่างช้า จนเข้าสู่ระยะคงที่ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งจากการทดลองพบว่าปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยมีค่าปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เท่ากับ  $4.05 \pm 0.35$  กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-1 การเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเชื้อ *W. confusa* NH02

#### 4.2 การคัดเลือกแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกต้องการผลิตเอ็กซ์โพสิทีแซคคาไรด์โดยวิธีทาคุชิ

จากแผนการทดลองตามวิธีทาคุชิ (Taguchi) ซึ่งกำหนดปัจจัย 4 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ ต่อการผลิตเอ็กซ์โพสิทีแซคคาไรด์ และปริมาณเซลล์ ได้แก่ แหล่งคาร์บอนหลัก (C1) แหล่งคาร์บอนเสริม (C2) แหล่งไนโตรเจน (N) และพีเอช (pH) เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 3-2 ใช้ Orthogonal array (OAc) แบบ L9 (3<sup>4</sup>) ดังนั้นจึงได้การทดลองทั้งหมด 9 การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4-3

**ตารางที่ 4-2** ตัวแปรของแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ และค่าพีเอชที่เลือกใช้ในการผลิตเอ็กซ์โพสิทีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02

ปัจจัย	ระดับที่ 1	ระดับที่ 2	ระดับที่ 3
แหล่งคาร์บอนหลัก (100% v/v) (C1)	น้ำมะพร้าว	น้ำอ้อย	น้ำสับปะรด
แหล่งคาร์บอนเสริม (40 g/L) (C2)	กากน้ำตาล	น้ำตาลทรายขาว	น้ำตาลทรายแดง
แหล่งไนโตรเจน (2 g/L) (N)	น้ำกากส่า	น้ำนึ่งปลาทูน่า	กากถั่วเหลือง
พีเอช (pH)	5	6	7

จากการผลิตเอ็กซ์โพสิทีแซคคาไรด์ที่ปัจจัยและระดับแตกต่างกันได้ปริมาณผลิตเอ็กซ์โพสิทีแซคคาไรด์แสดงในตารางที่ 4-2 สามารถนำไปคำนวณหาค่าอัตราส่วน S/N ratios ชนิดค่าตอบสนองที่มากที่สุดคือค่าที่ดีที่สุด (the larger – the better) ตามสมการ

$$S/N = 10 \log\{\sum(1/y^2)/n\}$$

เมื่อ	$S/N$	คือ	อัตราส่วนของ S/N ในแต่ละ Experiment number
	$n$	คือ	จำนวนการทดลองซ้ำในแต่ละ Experiment number
	$1/y^2$	คือ	ค่าตอบสนอง (Response) ในแต่ละครั้งของการทดลองของแต่ละ Experiment number

#### คำนวณอัตราส่วนของ S/N ratios ของปริมาณเอ็กซ์โพสิทีแซคคาไรด์ ได้จาก

ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 1	=	$-10 \log (1/3.10^2)/3$	= 9.83
ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 2	=	$-10 \log (1/1.10^2)/3$	= 0.83
ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 3	=	$-10 \log (1/1.49^2)/3$	= 3.46
ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 4	=	$-10 \log (1/2.17^2)/3$	= 6.73
ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 5	=	$-10 \log (1/3.63^2)/3$	= 11.20
ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 6	=	$-10 \log (1/2.16^2)/3$	= 6.69
ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 7	=	$-10 \log (1/0.74^2)/3$	= -2.62

$$\begin{aligned} \text{ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 8} &= -10 \log (1/0.89^2)/3 &= -1.01 \\ \text{ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 9} &= -10 \log (1/6.12^2)/3 &= 15.74 \end{aligned}$$

**คำนวณอัตราส่วนของ S/N ratios ของปริมาณเซลล์ที่ได้จาก**

$$\begin{aligned} \text{ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 1} &= -10 \log (1/3.36^2)/3 &= 10.53 \\ \text{ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 2} &= -10 \log (1/1.01^2)/3 &= 0.09 \\ \text{ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 3} &= -10 \log (1/8.51^2)/3 &= 18.60 \\ \text{ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 4} &= -10 \log (1/1.75^2)/3 &= 4.86 \\ \text{ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 5} &= -10 \log (1/3.00^2)/3 &= 9.64 \\ \text{ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 6} &= -10 \log (1/3.58^2)/3 &= 11.08 \\ \text{ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 7} &= -10 \log (1/3.02^2)/3 &= 9.60 \\ \text{ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 8} &= -10 \log (1/0.99^2)/3 &= -0.09 \\ \text{ค่า S/N ratio ของ Experiment ที่ 9} &= -10 \log (1/6.35^2)/3 &= 16.06 \end{aligned}$$

ตารางที่ 4-3 ค่ากำหนด Orthogonal array แบบ 4 ตัวแปร ซึ่งมีระดับของการศึกษาในแต่ละตัวแปร 3 ระดับ (L9 (3<sup>4</sup>))

Experiments	Factors				Response		S/N ratio	
	C1	C2	N	pH	EPS (g/L)	CDW (g/L)	EPS (g/L)	CDW (g/L)
1	2	1	2	3	3.10	3.36	9.83	10.53
2	1	3	3	3	1.10	1.01	0.83	0.09
3	3	2	1	3	1.49	8.51	3.46	18.60
4	1	1	1	1	2.17	1.75	6.73	4.86
5	2	2	3	1	3.63	3.00	11.20	9.54
6	3	1	3	2	2.16	3.58	6.69	11.08
7	3	3	2	1	0.74	3.02	-2.62	9.60
8	1	2	2	2	0.89	0.99	-1.01	-0.09
9	2	3	1	2	6.12	6.35	15.74	16.06
Average							5.65	8.92

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อยู่ในช่วงระหว่าง 0.74 – 6.12 กรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์ที่ได้อยู่ในช่วงระหว่าง 0.99 – 8.51 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนของ S/N ratios ที่ได้ของปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อยู่ในช่วงระหว่าง -1.01 – 15.74 โดยมีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของ S/N ratios เท่ากับ 5.65 ในขณะที่อัตราส่วนของ S/N ratios ที่ได้ของปริมาณเซลล์ที่ได้อยู่ในช่วงระหว่าง -0.09 – 18.60 โดยมีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของ S/N ratios เท่ากับ 8.92

ถ้าค่าอัตราส่วนของ S/N ratios มีค่ามาก จะหมายความว่าที่ระดับปัจจัยนั้นจะให้ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ออกมามากด้วย โดยได้ผลการวิเคราะห์หือทธิพลของปัจจัยโดยอาศัยค่าอัตราส่วนของ S/N ratios เฉลี่ยของปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ดังต่อไปนี้

ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย C1 ระดับที่ 1 = $[0.83 + 6.73 + (-1.01)] / 3$	= 2.18
ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย C1 ระดับที่ 2 = $[9.83 + 11.20 + 15.74] / 3$	= 12.25
ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย C1 ระดับที่ 3 = $[3.46 + 6.69 + (-2.62)] / 3$	= 2.51
ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย C2 ระดับที่ 1 = $[9.83 + 6.73 + 6.69] / 3$	= 7.75
ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย C2 ระดับที่ 2 = $[3.46 + 11.20 + (-1.01)] / 3$	= 4.55
ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย C2 ระดับที่ 3 = $[0.83 + (-2.62) + 15.74] / 3$	= 4.65
ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย N ระดับที่ 1 = $[3.46 + 6.73 + 15.74] / 3$	= 8.64
ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย N ระดับที่ 2 = $[9.83 + (-2.62) + (-1.01)] / 3$	= 2.07
ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย N ระดับที่ 3 = $[0.83 + 11.20 + 6.69] / 3$	= 6.24
ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย pH ระดับที่ 1 = $[6.73 + 11.20 + (-2.62)] / 3$	= 5.10
ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย pH ระดับที่ 2 = $[6.69 + (-1.01) + 15.74] / 3$	= 7.14
ค่า S/N ratio เฉลี่ยของปัจจัย pH ระดับที่ 3 = $[9.83 + 0.83 + 3.46] / 3$	= 4.71

ดังนั้นได้ค่า S/N ratios เฉลี่ยของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากการทดลองทั้ง 4 ปัจจัย และ 3 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 การวิเคราะห์ผลของการทดสอบอรรถกอนอโลหะเรย์ (Orthogonal array)  $L_9(3^4)$

Level	C1	C2	N	pH	
K1	2.18	7.75	8.64	5.10	
K2	12.25	4.55	2.07	7.14	
K3	2.51	4.65	6.24	4.71	<b>Total</b>
R = max (k <sub>i</sub> ) – min (k <sub>i</sub> )	10.07	3.20	6.58	2.43	22.28
%R	45.20	14.36	29.53	10.91	100
Rank	1	3	2	4	

จากตารางเมื่อนำค่า S/N ratios เฉลี่ย มาใช้วิเคราะห์หาอิทธิพลของปัจจัย จากผลต่างของค่าของระดับปัจจัยที่สูง (Kmax) และต่ำ (Kmin) และทำการวิเคราะห์ร้อยละของอิทธิพล (%R) ของแต่ละปัจจัยจะสามารถคำนวณได้ ดังนี้

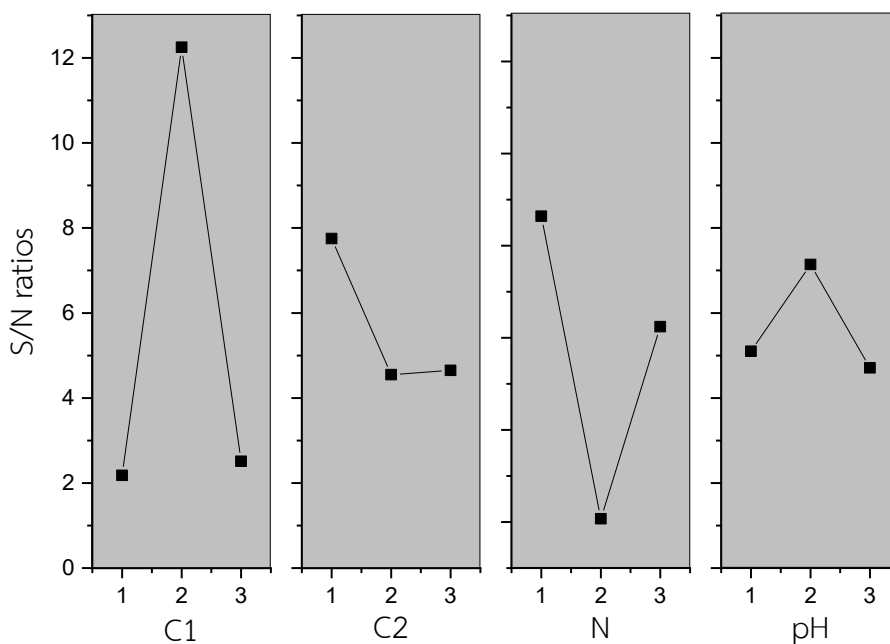
$$\begin{aligned} \%R \text{ ของปัจจัย C1} &= (10.07 / 22.28) \times 100 = 45.20\% \\ \%R \text{ ของปัจจัย C2} &= (3.20 / 22.28) \times 100 = 14.36\% \\ \%R \text{ ของปัจจัย N} &= (6.58 / 22.28) \times 100 = 29.53\% \\ \%R \text{ ของปัจจัย pH} &= (2.43 / 22.28) \times 100 = 10.91\% \end{aligned}$$

พบว่าปัจจัย C1 หรือแหล่งคาร์บอนหลัก เป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่า S/N ratios เฉลี่ยของปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มากที่สุด คิดเป็น 45.20 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ N หรือแหล่งไนโตรเจน C2 หรือแหล่งคาร์บอนเสริม และพีเอช คิดเป็น 29.53, 14.36 และ 10.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3-4

ความสัมพันธ์ของระดับต่างๆ ของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองกับค่า S/N ratios ของปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ ดังแสดงในภาพที่ 3-2 พบว่าปัจจัย C1 หรือแหล่งคาร์บอนหลัก ในแต่ละระดับมีผลต่อค่า S/N ratios ของปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มาก โดยที่ระดับที่ 2 จะทำให้ได้ค่า S/N ratios สูงสุด ในขณะที่ปัจจัย C2 หรือแหล่งคาร์บอนเสริม ระดับที่ 1 จะทำให้ได้ค่า S/N ratios สูงสุด ปัจจัย N หรือแหล่งไนโตรเจน ระดับที่ 1 จะทำให้ได้ค่า S/N ratios สูงสุด และพีเอช (pH) ระดับที่ 2 จะทำให้ได้ค่า S/N ratios สูงสุด ดังนั้นสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ให้ได้ปริมาณสูงสุด



ปัจจัย C1	ระดับที่ 2	คือ	น้ำอ้อย
ปัจจัย C2	ระดับที่ 1	คือ	กากน้ำตาล
ปัจจัย N	ระดับที่ 1	คือ	กากถั่วเหลือง
ปัจจัย pH	ระดับที่ 2	คือ	6



ภาพที่ 4-2 ความสัมพันธ์ของระดับต่างๆ ของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองกับค่า S/N ratios ของปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้

จากการทำนายปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ให้ได้ปริมาณสูงสุด จะได้ค่า S/N ratios เท่ากับ 18.83 และได้ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เท่ากับ 5.94 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4-5 ผลการทำนายปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์และค่า S/N ratios จากสภาวะที่เหมาะสม โดยวิธีการทากูชิ

	Prediction
S/N ratio	18.83
EPS production (g/L)	5.94

เมื่อผลที่ได้ไปวิเคราะห์หือทธิพลของปัจจัยโดยอาศัยค่าอัตราส่วนของ S/N ratios เฉลี่ยของ ปริมาณเซลล์ที่ได้ดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย C1 ระดับที่ 1} &= [0.09 + 4.86 + (-0.09)] / 3 &= 1.62 \\ \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย C1 ระดับที่ 2} &= [10.53 + 9.54 + 16.06] / 3 &= 12.04 \\ \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย C1 ระดับที่ 3} &= [18.60+ 11.08 + 9.60] / 3 &= 13.09 \\ \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย C2 ระดับที่ 1} &= [10.53+ 4.86+ 11.08] / 3 &= 8.82 \\ \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย C2 ระดับที่ 2} &= [18.60+ 9.54+ (-0.09)] / 3 &= 9.35 \\ \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย C2 ระดับที่ 3} &= [0.09 + 9.60 + 16.06] / 3 &= 8.58 \\ \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย N ระดับที่ 1} &= [18.60 + 4.86 + 16.06] / 3 &= 13.17 \\ \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย N ระดับที่ 2} &= [10.53 + 9.60 + (-0.09)] / 3 &= 6.68 \\ \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย N ระดับที่ 3} &= [0.09+ 9.54 + 11.08] / 3 &= 6.90 \\ \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย pH ระดับที่ 1} &= [4.86 + 9.54 + 9.60] / 3 &= 8.00 \\ \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย pH ระดับที่ 2} &= [11.08+ (-0.09) + 16.06] / 3 &= 9.01 \\ \text{ค่า S/N ration เฉลี่ยของปัจจัย pH ระดับที่ 3} &= [10.53 + 0.09+ 18.60] / 3 &= 9.74 \end{aligned}$$

ดังนั้นได้ค่า S/N ratios เฉลี่ยของการผลิตเซลล์จากการทดลองทั้ง 4 ปัจจัย และ 3 ระดับ ดัง แสดงในตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 การวิเคราะห์ผลของการทดสอบออกดอกนอลอะเรีย (Orthogonal array)  $L_9(3^4)$

Level (EPS)	C1	C2	N	pH	
K1	1.62	8.82	13.17	8.00	
K2	12.04	9.35	6.68	9.01	
K3	13.09	8.58	6.90	9.74	<b>Total</b>
R = max (k <sub>i</sub> ) – min (k <sub>i</sub> )	11.47	0.77	6.49	1.74	20.47
%R	56.03	3.76	35.47	8.50	100
Rank	1	4	2	3	

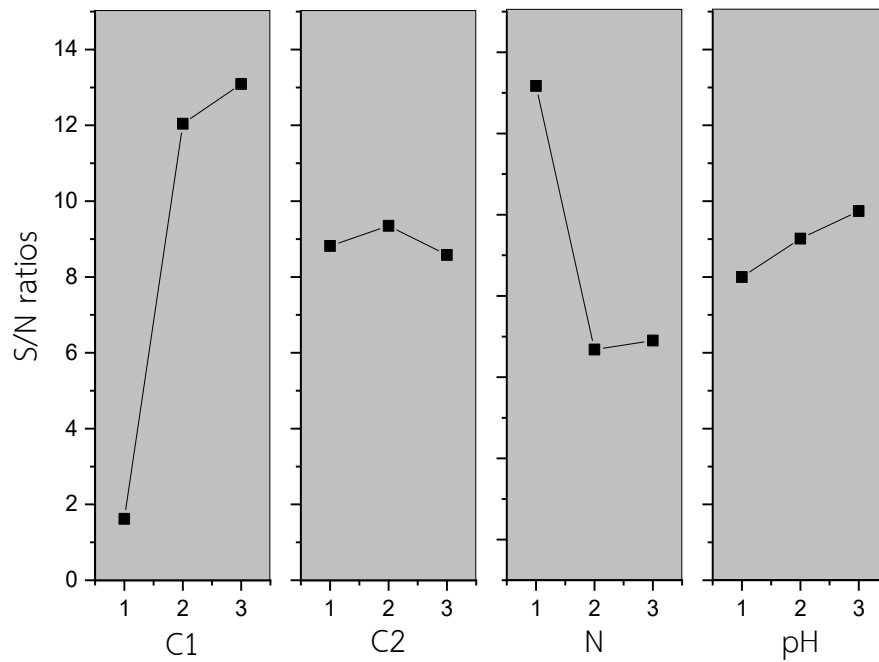
จากตารางเมื่อนำค่า S/N ratios เฉลี่ย มาใช้วิเคราะห์หาอิทธิพลของปัจจัย จากผลต่างของค่าของระดับปัจจัยที่สูง (Kmax) และต่ำ (Kmin) และทำการวิเคราะห์ร้อยละของอิทธิพล (%R) ของแต่ละปัจจัยจะสามารถคำนวณได้ ดังนี้

%R ของปัจจัย C1	=	$(11.47 / 20.47) \times 100$	=	56.03%
%R ของปัจจัย C2	=	$(0.77 / 20.47) \times 100$	=	3.76%
%R ของปัจจัย N	=	$(6.49 / 20.47) \times 100$	=	35.47%
%R ของปัจจัย pH	=	$(1.74 / 20.47) \times 100$	=	8.50%

พบว่าปัจจัย C1 หรือแหล่งคาร์บอนหลัก เป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่า S/N ratios เฉลี่ยของปริมาณเซลล์ที่ได้มากที่สุด คิดเป็น 56.03 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ N หรือแหล่งไนโตรเจน พีเอช และ C2 หรือแหล่งคาร์บอนเสริม คิดเป็น 35.47, 8.50 และ 3.76 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-4

ความสัมพันธ์ของระดับต่างๆ ของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองกับค่า S/N ratios ของเซลล์ที่ได้ ดังแสดงในภาพที่ 3-2 พบว่าปัจจัย C1 หรือแหล่งคาร์บอนหลัก ในแต่ละระดับมีผลต่อค่า S/N ratios ของปริมาณเซลล์ที่ได้มากที่สุด โดยที่ระดับที่ 3 จะทำให้ได้ค่า S/N ratios สูงสุด ในขณะที่ปัจจัย C2 หรือแหล่งคาร์บอนเสริม ระดับที่ 2 จะทำให้ได้ค่า S/N ratios สูงสุด ปัจจัย N หรือแหล่งไนโตรเจน ระดับที่ 1 จะทำให้ได้ค่า S/N ratios สูงสุด และพีเอช (pH) ระดับที่ 3 จะทำให้ได้ค่า S/N ratios สูงสุด ดังนั้นสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ให้ได้ปริมาณสูงสุด

ปัจจัย C1	ระดับที่ 3	คือ	น้ำสับปะรด
ปัจจัย C2	ระดับที่ 2	คือ	น้ำตาลทรายขาว
ปัจจัย N	ระดับที่ 1	คือ	กากถั่วเหลือง
ปัจจัย pH	ระดับที่ 3	คือ	7



ภาพที่ 4-3 ความสัมพันธ์ของระดับต่างๆ ของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองกับค่า S/N ratios ของปริมาณเซลล์ที่ได้

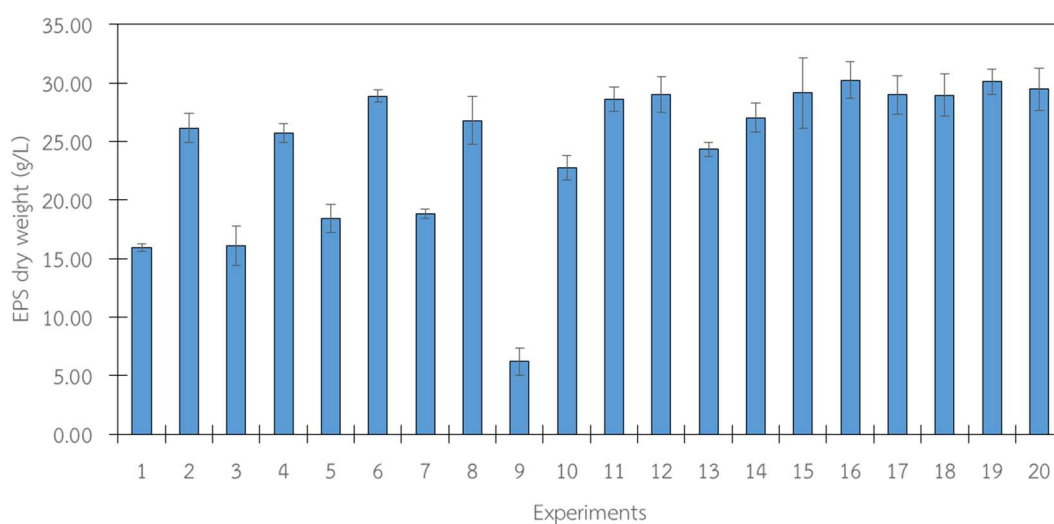
จากการทำนายปริมาณเซลล์ที่ได้ จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ให้ได้ปริมาณสูงสุด จะได้ค่า S/N ratios เท่ากับ 16.30 และได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 5.79 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4-7 ผลการทำนายปริมาณเซลล์ที่ได้และค่า S/N ratios จากสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีการ ทากูชิ

	Prediction
S/N ratio	16.30
Cell dry weight (g/L)	5.79

#### 4.3 การคัดเลือกปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ด้วยเทคนิค Response surface methodology (RSM)

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ในครั้งนี้ใช้การออกแบบแบบ Central composite design (CCD) ซึ่งมีที่กำหนดค่าสูงสุดและต่ำสุดเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -1.68, -1, 0, +1 และ +1.68 จากนั้นนำไปบ่มที่เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4-8 และภาพที่ 4-4 พบว่า การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 อยู่ในช่วงระหว่าง 6.21 – 30.23 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดคือ ชุดการทดลองที่ 16 และปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่ำสุดคือ ชุดการทดลองที่ 9



ภาพที่ 4-4 ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 จากแผนการทดลองแบบ CCD

ตารางที่ 4-8 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะความเหมาะสมของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 จากแผนการทดลองแบบ CCD พร้อมค่าการคาดคะเนกับค่าที่ได้จากการทดลอง

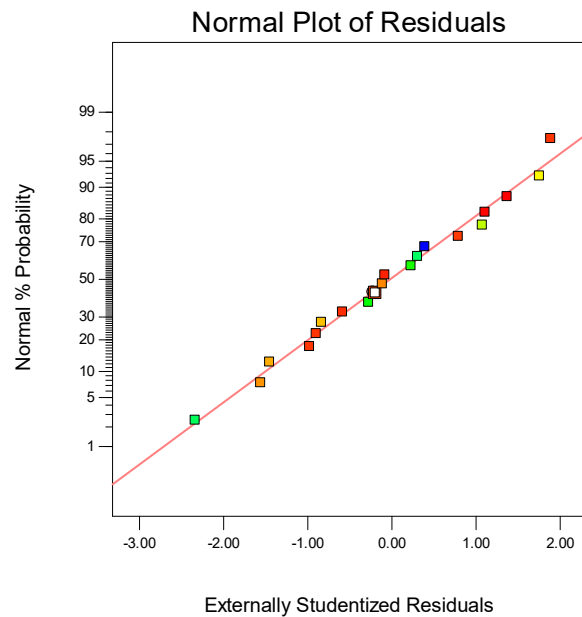
Experiments	Factors			Response	
	กากน้ำตาล (g/L)	กากถั่วเหลือง (g/L)	อุณหภูมิ (g/L)	EPS (g/L)	CDW (g/L)
1	20	1	32	15.93	8.30
2	60	1	32	26.17	13.97
3	20	3	32	16.09	11.62
4	60	3	32	25.73	12.08
5	20	1	42	18.41	8.96
6	60	1	42	28.89	4.30
7	20	3	42	18.85	16.19
8	60	3	42	26.78	7.34
9	6.4	2	37	6.21	11.30
10	73.6	2	37	22.73	7.31
11	40	0.3	37	28.62	6.48
12	40	3.7	37	29.02	13.50
13	40	2	28.6	24.35	13.35
14	40	2	45.4	27.04	8.58
15	40	2	37	29.18	6.16
16	40	2	37	30.23	5.84
17	40	2	37	29.01	6.62
18	40	2	37	28.97	6.22
19	40	2	37	30.11	6.38
20	40	2	37	29.46	5.76

การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลเบื้องต้น ประกอบด้วย

1. การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ ซึ่งเป็นการตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูลว่ามีการกระจายของค่าส่วนตกค้าง ดังแสดงในภาพที่ 4-5 พบว่าข้อมูลมีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง แสดงให้เห็นว่าส่วนตกค้างจากการทดลองการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ไม่แสดงสิ่งผิดปกติสรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงปกติ

Design-Expert® Software  
EPS

Color points by value of  
EPS:  
30.23  
6.20625

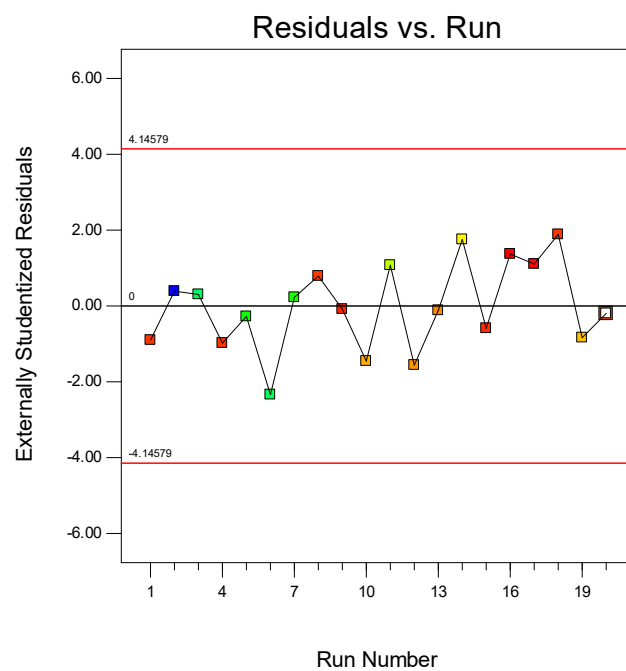


ภาพที่ 4-5 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

2. การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล ดังแสดงในภาพที่ 4-6 พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ไม่มีรูปแบบแน่นอนหรือไม่สามารถประมาณรูปที่แน่นอนได้ มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ แสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ

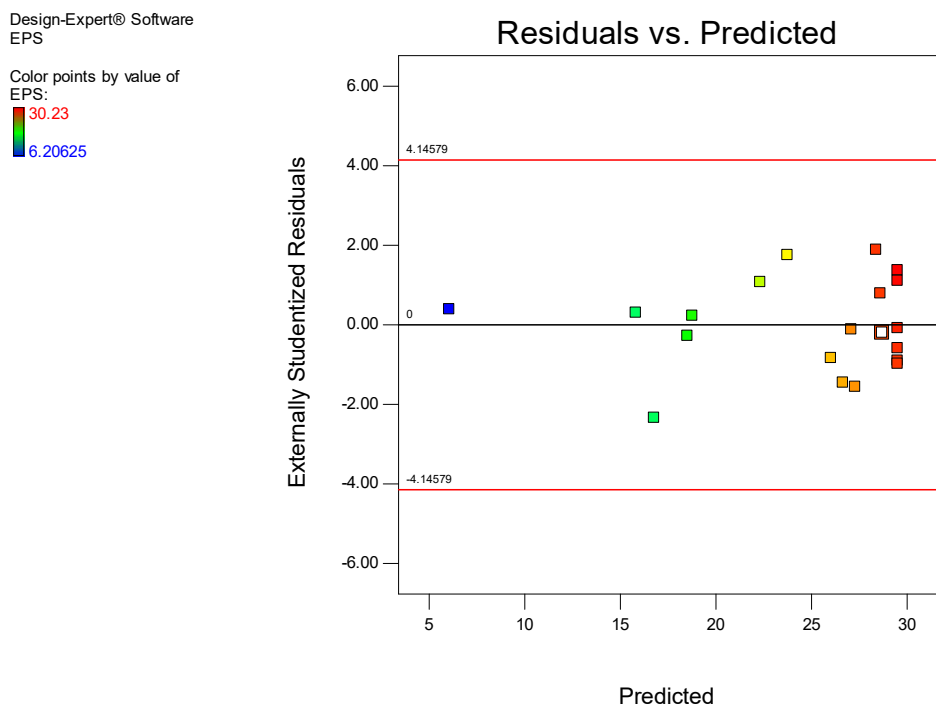
Design-Expert® Software  
EPS

Color points by value of  
EPS:  
30.23  
6.20625



ภาพที่ 4-6 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

3. การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน ดังแสดงในภาพที่ 4-7 พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและลบ แสดงให้เห็นว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน



ภาพที่ 4-7 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัยของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq) เป็นค่าที่บอกร้อยละการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามที่สามารถอธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระในสมการถดถอย ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4-8 พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจเท่ากับ 0.9953 หรือ 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าผลตอบสนองได้

จากตารางที่ 4-9 ตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งมีค่า p-value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 ได้แก่ ปริมาณของกากน้ำตาล ( $X_1$ ) อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ( $X_3$ ) อิทธิพลของกำลังสองของปริมาณของกากน้ำตาล ( $X_1^2$ ) และอิทธิพลของกำลังสองของอุณหภูมิ ( $X_3^2$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าสมการกำลังสอง (quadratic equations) เป็นสมการที่ใช้ศึกษาปัจจัยและการตอบสนองแบบพื้นผิวที่ดีที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงผลดังตารางที่ 4-9



ตารางที่ 4-9 แสดงค่าความแปรปรวนของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	770.88	9	85.65	236.68	< 0.0001	significant
A-X1	319.56	1	319.56	883.03	< 0.0001	
B-X2	0.12	1	0.12	0.33	0.5801	
C-X3	13.42	1	13.42	37.09	0.0001	
AB	1.25	1	1.25	3.44	0.0933	
AC	0.27	1	0.27	0.75	0.4083	
BC	0.24	1	0.24	0.67	0.4318	
A <sup>2</sup>	422.86	1	422.86	1168.45	< 0.0001	
B <sup>2</sup>	1.69	1	1.69	4.66	0.0561	
C <sup>2</sup>	30.18	1	30.18	83.39	< 0.0001	
Residual	3.62	10	0.36			
Lack of Fit	2.09	5	0.42	1.36	0.3718	not significant
Pure Error	1.53	5	0.31			
Cor Total	774.50	19				
Std. Dev.	0.60	R-Squared	0.9953			
Mean	24.59	Adj R-Squared	0.9911			
C.V. %	2.45	Pred R-Squared	0.9758			
PRESS	18.75	Adeq Precision	55.142			
-2 Log Likelihood	22.57	BIC	52.52			
		AICc	67.01			

ตารางที่ 4-10 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์สมการถดถอยของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	
Linear	0.0261	< 0.0001	0.3232	0.0957	
2FI	0.9967	< 0.0001	0.1704	-0.2912	
<u>Quadratic</u>	<u>&lt; 0.0001</u>	<u>0.3718</u>	<u>0.9911</u>	<u>0.9758</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	0.5418	0.1725	0.9906	0.7763	Aliased

รูปแบบสมการถดถอยของการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ที่เหมาะสมที่ได้ ดังนี้

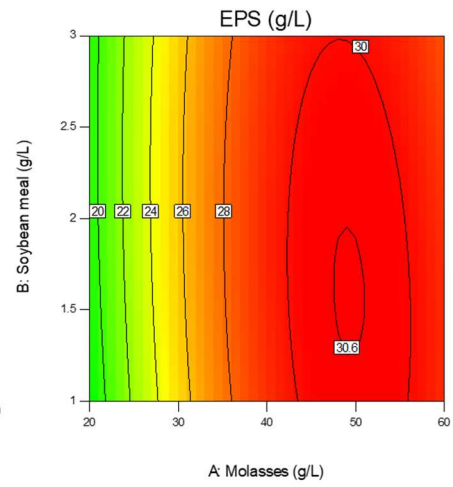
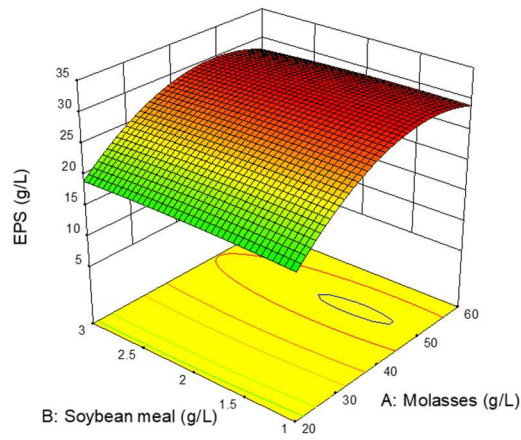
$$Y_{EPS} = 29.51 + 4.84X_1 - 0.093X_2 + 0.99X_3 - 0.39X_1X_2 - 0.18X_1X_3 - 0.17X_2X_3 - 5.42X_1^2 - 0.34X_2^2 - 1.45X_3^2$$

จากสมการสังเกตได้ว่าตัวแปร  $X_1$  และ  $X_3$  มีอิทธิพลทางบวก (มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง ( $Y$ ) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าว จะทำให้ค่าปริมาณการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์จะมีค่าสูงขึ้นตามไปด้วย

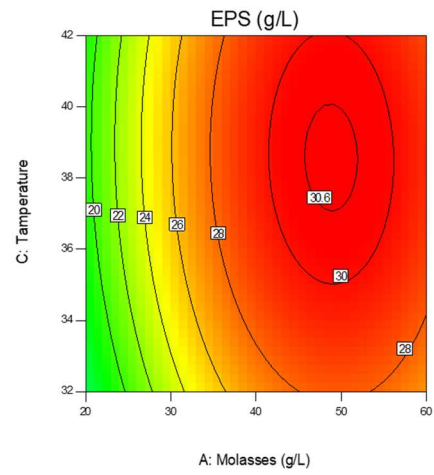
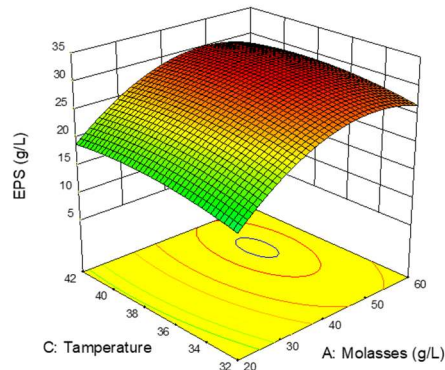
เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์กับตัวแปรอิสระต่างๆ ได้แก่ ระหว่างกากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง (ก), ระหว่างกากน้ำตาลและอุณหภูมิ (ข) และระหว่างกากถั่วเหลืองกับอุณหภูมิ (ค) แสดงดังภาพที่ 4-8 พบว่าการเพิ่มปริมาณกากน้ำตาลมีผลทำให้การผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณของกากน้ำตาลและอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แม้ว่าการร่วมกันระหว่างปริมาณของกากน้ำตาลและอุณหภูมิจะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสามารถทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ โดยเชื้อ *W. confusa* NH02 จากโปรแกรม Design Expert แสดงดังภาพที่ 4-9 พบว่าระดับที่เหมาะสมของการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อ *W. confusa* NH02 คือ ปริมาณกากน้ำตาลความเข้มข้น 43.65 กรัมต่อลิตร ปริมาณกากถั่วเหลือง 1.87 กรัมต่อลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 39.64 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณเอ็กโพลีแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 30.34 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณเซลล์ที่ได้ 5.33 กรัมต่อลิตร

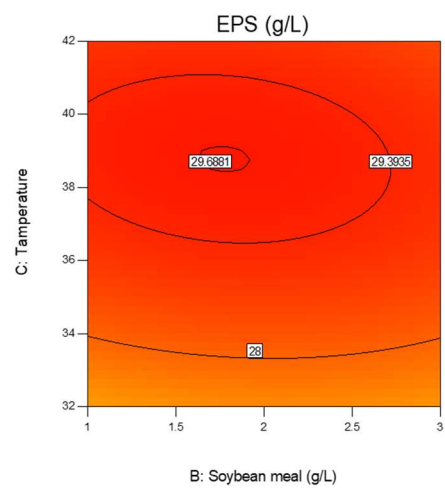
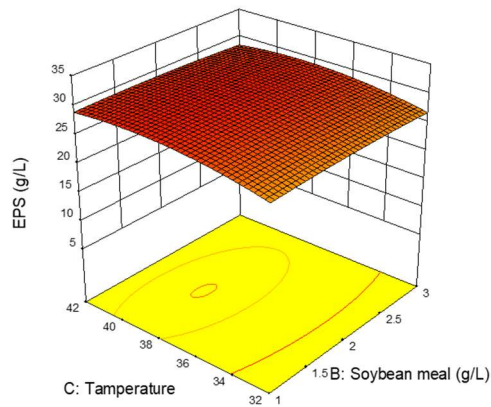
ก.



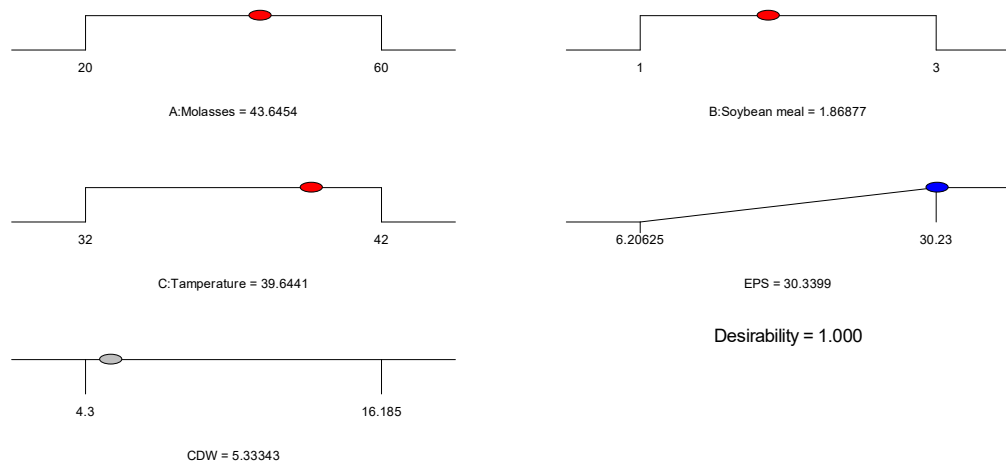
ข.



ค.

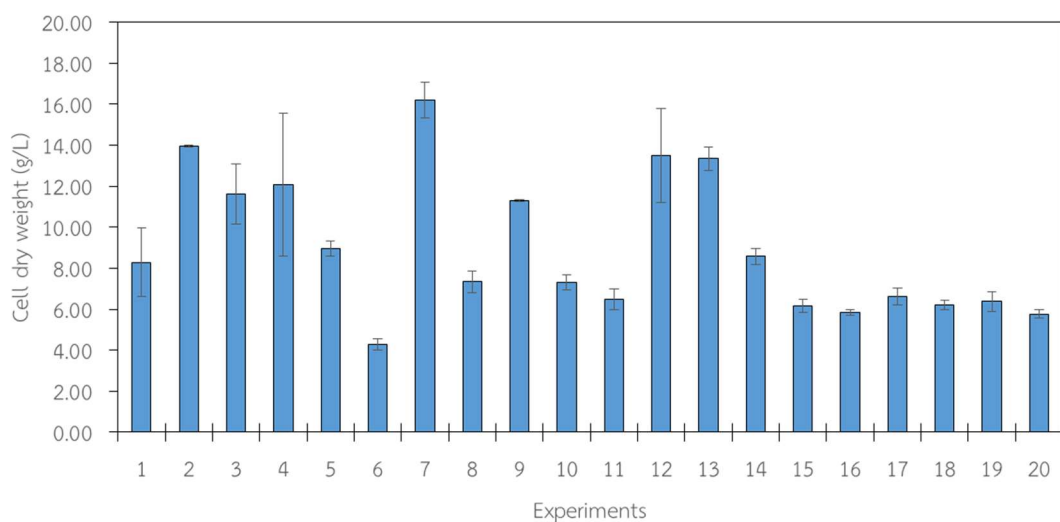


ภาพที่ 4-8 ผลการตอบสนองระหว่างกากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง (ก), ระหว่างกากน้ำตาลและอุนหนุมิ (ข) และระหว่างกากถั่วเหลืองกับอุนหนุมิ (ค) ต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์



ภาพที่ 4-9 การทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อ *W. confusa* NH02

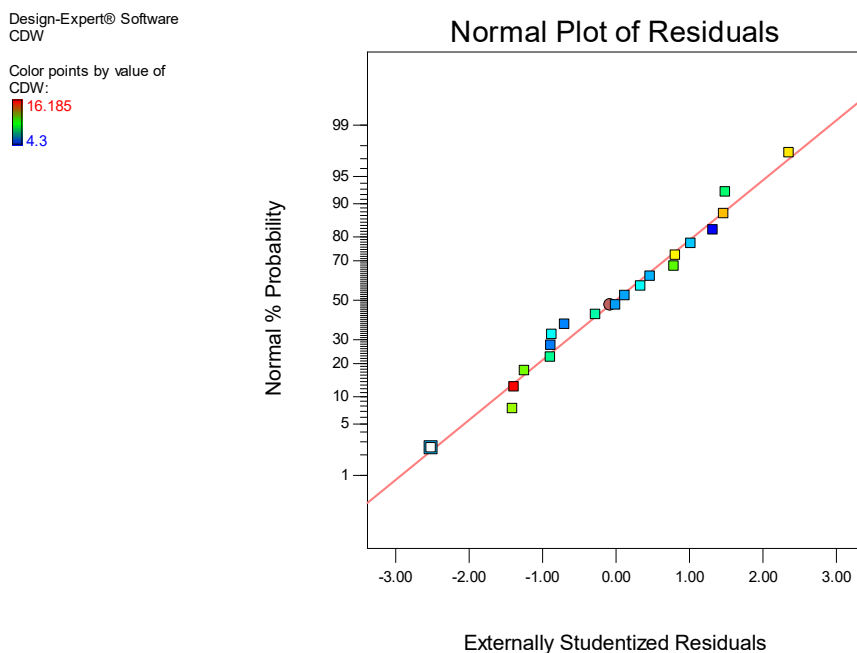
เมื่อการศึกษาผลของสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ในครั้งนี้ใช้การออกแบบแบบ Central composite design (CCD) ซึ่งมีก็กำหนดค่าสูงสุดและต่ำสุดเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -1.68, -1, 0, +1 และ +1.68 จากนั้นนำไปบ่มเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4-8 และภาพที่ 4-10 พบว่าปริมาณเซลล์ที่ได้อยู่ในช่วงระหว่าง 4.30 – 16.19 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณเซลล์ที่ได้สูงสุดคือ ชุดการทดลองที่ 7 และปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่ำสุดคือ ชุดการทดลองที่ 6



ภาพที่ 4-10 ปริมาณเซลล์ที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD

การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลเบื้องต้น ประกอบด้วย

1. การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ ซึ่งเป็นการตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูล ว่ามีการกระจายของค่าส่วนตกค้าง ดังแสดงในภาพที่ 4-11 พบว่าข้อมูลมีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง แสดงให้เห็นว่าส่วนตกค้างจากการทดลองการผลิตเซลล์ไม่แสดงสิ่งผิดปกติ สรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงปกติ

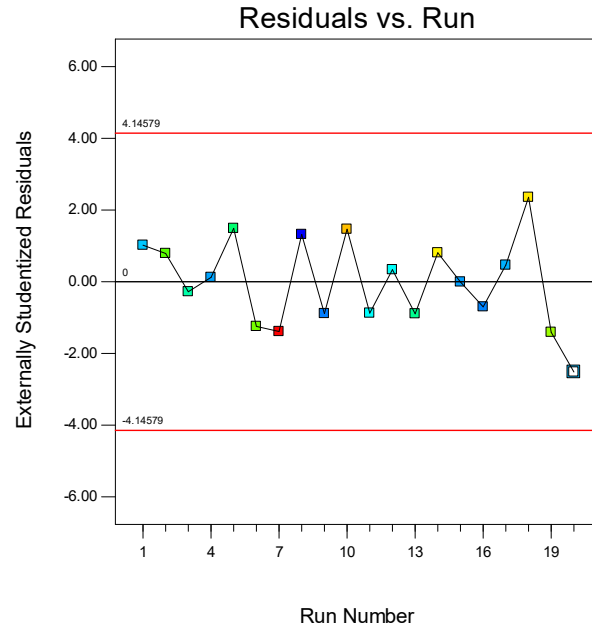


ภาพที่ 4-11 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของการผลิตเซลล์

2. การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล ดังแสดงในภาพที่ 4-12 พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองของการผลิตเซลล์ไม่มีรูปแบบแน่นอนหรือไม่สามารถประมาณรูปที่แน่นอนได้ มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ แสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ

Design-Expert® Software  
CDW

Color points by value of  
CDW:  
16.185  
4.3

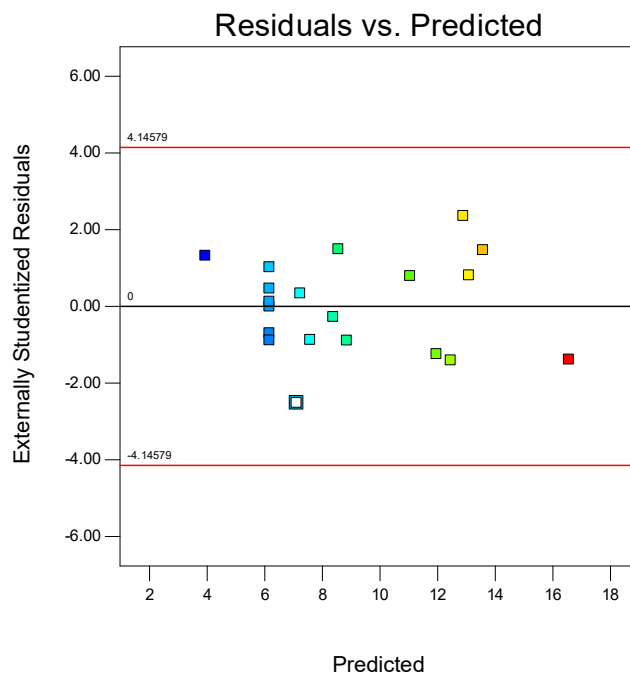


ภาพที่ 4-12 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลการผลิตเซลล์

3. การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน ดังแสดงในภาพที่ 4-13 พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองการผลิตเซลล์มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและลบ แสดงให้เห็นว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน

Design-Expert® Software  
CDW

Color points by value of  
CDW:  
16.185  
4.3



ภาพที่ 4-13 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัยของการผลิตเซลล์

ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq) เป็นค่าที่บอกร้อยละการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามที่สามารถอธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระในสมการถดถอย ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4-10 พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจเท่ากับ 0.9890 หรือ 98.9 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าผลตอบสนองได้

จากตารางที่ 4-11 ตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเซลล์ ซึ่งมีค่า p-value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 ได้แก่ ปริมาณของกากน้ำตาล ( $X_1$ ) กากถั่วเหลือง ( $X_2$ ) อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ( $X_3$ ) อิทธิพลร่วมระหว่างกากน้ำตาลกากถั่วเหลือง ( $X_1X_2$ ) อิทธิพลร่วมระหว่างกากน้ำตาลและอุณหภูมิ ( $X_1X_3$ ) อิทธิพลร่วมระหว่างปริมาณของกากถั่วเหลืองและอุณหภูมิ ( $X_2X_3$ ) อิทธิพลของกำลังสองของปริมาณของกากน้ำตาล ( $X_1^2$ ) อิทธิพลของกำลังสองของปริมาณของกากถั่วเหลือง ( $X_2^2$ ) และอิทธิพลของกำลังสองของอุณหภูมิ ( $X_3^2$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าสมการกำลังสอง (quadratic equations) เป็นสมการที่ใช้ศึกษาปัจจัยและการตอบสนองแบบพื้นผิวที่ดีที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงผลดังตารางที่ 4-12

ตารางที่ 4-11 แสดงค่าความแปรปรวนของการผลิตเซลล์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	218.14	9	24.24	100.12	< 0.0001	significant
A-X1	14.53	1	14.53	60.01	< 0.0001	
B-X2	40.41	1	40.41	166.93	< 0.0001	
C-X3	21.68	1	21.68	89.55	< 0.0001	
AB	11.08	1	11.08	45.77	< 0.0001	
AC	48.19	1	48.19	199.06	< 0.0001	
BC	9.76	1	9.76	40.30	< 0.0001	
A <sup>2</sup>	17.87	1	17.87	73.81	< 0.0001	
B <sup>2</sup>	26.52	1	26.52	109.55	< 0.0001	
C <sup>2</sup>	41.67	1	41.67	172.12	< 0.0001	
Residual	2.42	10	0.24			
Lack of Fit	1.90	5	0.38	3.60	0.0929	not significant
Pure Error	0.53	5	0.11			
Cor Total	220.57	19				
Std. Dev.	0.49	R-Squared			0.9890	
Mean	9.01	Adj R-Squared			0.9791	
C.V. %	5.46	Pred R-Squared			0.9304	
PRESS	15.36	Adeq Precision			36.275	
-2 Log Likelihood	14.53	BIC			44.48	
		AICc			58.97	

ตารางที่ 4-12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์สมการถดถอยของการผลิตเซลล์

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	
Linear	0.0710	< 0.0001	0.2250	-0.0496	
2FI	0.0322	< 0.0001	0.5036	0.1249	
<u>Quadratic</u>	<u>&lt; 0.0001</u>	<u>0.0929</u>	<u>0.9791</u>	<u>0.9304</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	0.0346	0.9097	0.9924	0.9951	Aliased

รูปแบบสมการถดถอยของการผลิตเซลล์ที่เหมาะสมที่ได้ ดังนี้

$$Y_{DCW} = 6.16 - 1.03X_1 + 1.72X_2 - 1.26X_3 - 1.18X_1X_2 - 2.45X_1X_3 + 1.10X_2X_3 + 1.11X_1^2 + 1.36X_2^2 + 1.70X_3^2$$

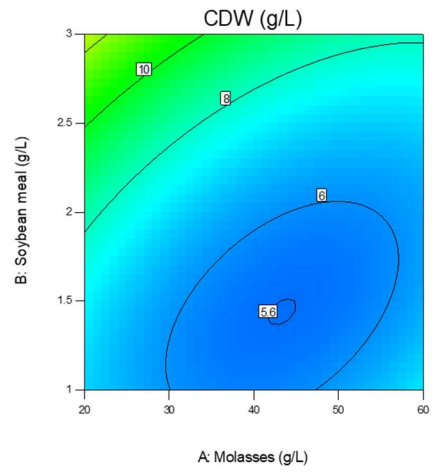
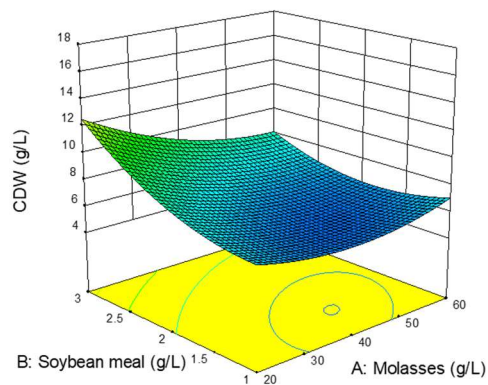
จากสมการสังเกตได้ว่าตัวแปร  $X_2$  มีอิทธิพลทางบวก (มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง ( $Y$ ) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าว จะทำให้ค่าปริมาณการผลิตเซลล์จะมีความสูงขึ้นตามไปด้วย

เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเซลล์กับตัวแปรอิสระต่างๆ ได้แก่ ระหว่างกากน้ำตาลและกากหัวเหลือง (ก), ระหว่างกากน้ำตาลและอุณหภูมิ (ข) และระหว่างกากหัวเหลืองกับอุณหภูมิ (ค) แสดงดังภาพที่ 4-14 พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างกากน้ำตาลกากหัวเหลือง ( $X_1X_2$ ) อิทธิพลร่วมระหว่างกากน้ำตาลและอุณหภูมิ ( $X_1X_3$ ) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

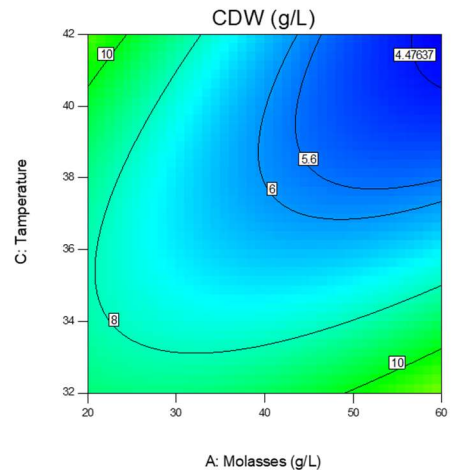
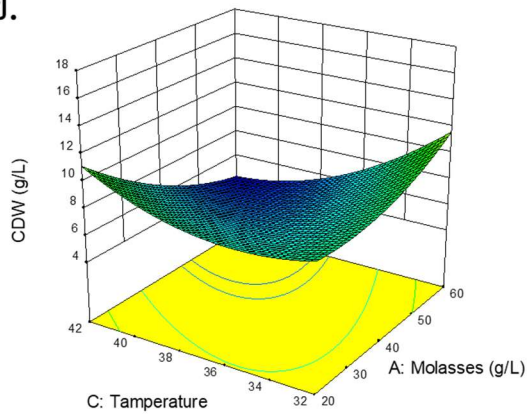
ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสามารถทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตเซลล์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 จากโปรแกรม Design Expert แสดงดังภาพที่ 4-15 พบว่าระดับที่เหมาะสมของการผลิตเซลล์ คือ ปริมาณกากน้ำตาลความเข้มข้น 20.31 กรัมต่อลิตร ปริมาณกากหัวเหลือง 2.97 กรัมต่อลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 41.97 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณเอ็กโพลีแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 19.03 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณเซลล์ที่ได้ 16.20 กรัมต่อลิตร



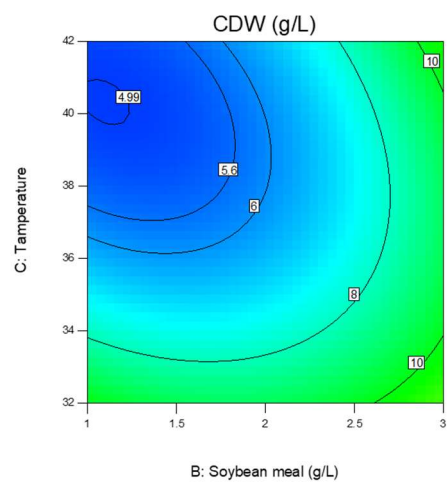
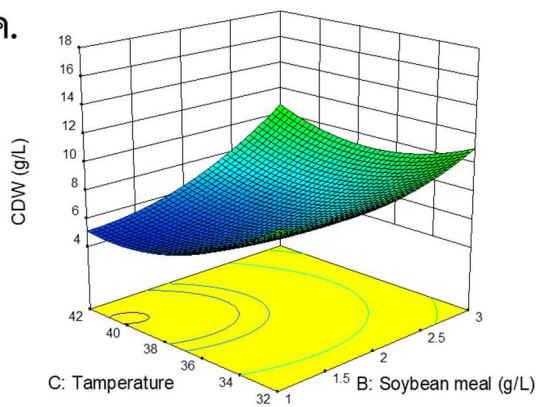
ก.



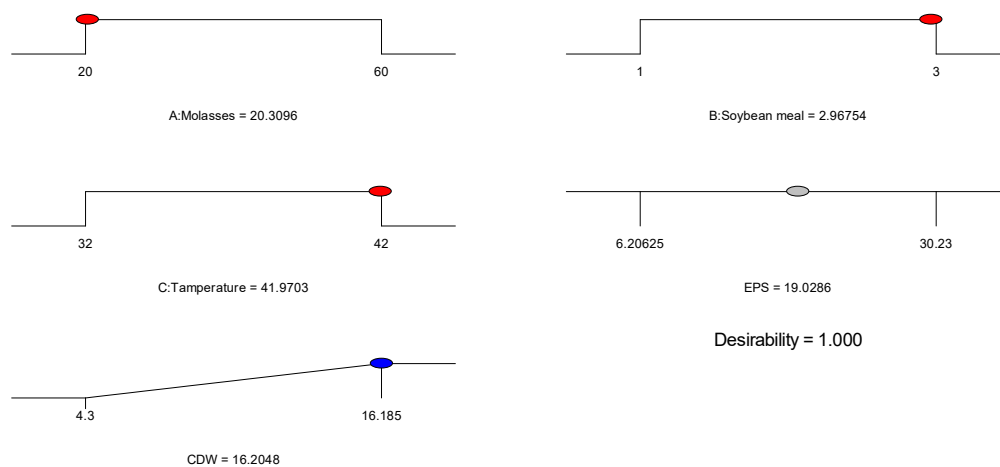
ข.



ค.

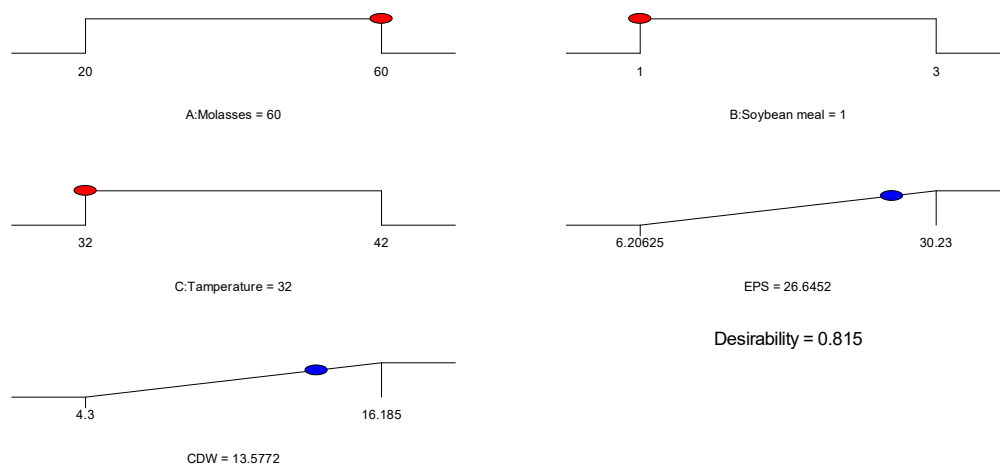


ภาพที่ 4-14 ผลการตอบสนองระหว่างกากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง (ก), ระหว่างกากน้ำตาลและอุณหภูมิ (ข) และระหว่างกากถั่วเหลืองกับอุณหภูมิ (ค) ต่อการผลิตเซลล์



ภาพที่ 4-15 การทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตเซลล์จากเชื้อ *W. confusa* NH02

อย่างไรก็ตาม หากต้องการทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์สูงสุด และได้ปริมาณเซลล์มากที่สุด จากโปรแกรม Design Expert แสดงดังภาพที่ 4-16 พบว่าระดับที่เหมาะสมของการผลิต คือ ปริมาณกากน้ำตาลความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ปริมาณกากถั่วเหลือง 1 กรัมต่อลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณเอ็กโพลีแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 26.65 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณเซลล์ที่ได้ 13.58 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-16 การทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์สูงสุด และได้ปริมาณเซลล์มากที่สุดโดยเชื้อ *W. confusa* NH02

การผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ส่วนใหญ่ผลิตในสภาวะต้องการอากาศ (aerobic condition) นอกจากนี้การสังเคราะห์เอ็กโพลีแซคคาไรด์จะเกิดขึ้นในสภาวะอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนสูงๆ และมีสารอาหารจำกัด เช่น แหล่งไนโตรเจน และออกซิเจน เป็นต้น (Freitas et al., 2011) นอกจากนี้ยังมี

ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ เช่น ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ชนิดและปริมาณของแหล่งธาตุอาหารเสริม เป็นต้น จากการทดลองครั้งนี้พบว่าแหล่งคาร์บอนหลักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 คือ น้ำอ้อย โดยทั่วไปน้ำอ้อยประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุสโตสเป็นส่วนใหญ่ การศึกษาของ (Kim & Day, 2011) พบว่าในน้ำอ้อยประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุสโตส ประมาณ 9.6, 0.1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยจะเปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับชนิด พันธุ์ และฤดูกาล นอกจากนี้น้ำอ้อยยังประกอบด้วยสารอาหารอื่นๆ อีกมากมาย เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส และโซเดียม เป็นต้น

ส่วนแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 คือ กากน้ำตาล แม้ว่ากากน้ำตาลจะเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย มีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลดำ มีน้ำตาลอยู่ประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด กรรมวิธีของโรงงาน ฤดูกาล และสภาพการเก็บเกี่ยว น้ำตาลที่พบ เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวิร์ต น้ำตาลราฟิโนส เป็นต้น แต่การใช้อากน้ำตาลในปริมาณมากจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ สารประกอบพวก hydroxyl methylfurfural เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาปริมาณที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ แม้ว่าจากการทดลองครั้งนี้กากน้ำตาลจะเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมต่อการเอ็กโพลีแซคคาไรด์ อย่างไรก็ตามจากสังเกตคุณสมบัติเบื้องต้นของเอ็กโพลีแซคคาไรด์ที่ได้พบว่าเอ็กโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มีลักษณะสีดำ และมีความหนืดต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็กโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม องค์ประกอบและคุณสมบัติของเอ็กโพลีแซคคาไรด์จะเปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับชนิดและสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ (Ates, 2015) การศึกษาของ (Cerning et al., 1994) พบว่าแหล่งใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ได้แก่ น้ำตาลแลกโตส และน้ำตาลกลูโคส มีผลต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Lactobacillus casei* นอกจากนี้ยังมีผลต่อองค์ประกอบของเอ็กโพลีแซคคาไรด์ อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ (Muhammadi & Afzal, 2014) ก็พบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Bacillus* strain CMG1403 แต่ไม่มีผลต่อองค์ประกอบของโมโนแซคคาไรด์ของผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ที่ได้

Xu และคณะ (2017) พบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำน้ำตาลฟรุสโตส มีผลต่อการผลิตและคุณลักษณะของเอ็กโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Pellinus vaninii* โดยพบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้เอ็กโพลีแซคคาไรด์ที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) กว่าที่ใช้แหล่งคาร์บอนอื่น

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 คือ กากถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองเป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำเต้าหู้ หรือเรียกอีกอย่างว่า กากเต้าหู้ กากถั่วเหลืองแห้งมีองค์ประกอบของโปรตีนประมาณ 31.27 เปอร์เซ็นต์ ไขมันประมาณ 16.22 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรตประมาณ 20.10 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใยประมาณ 22.70 เปอร์เซ็นต์ แคล

เชื้อสประมาณ 1.22 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสประมาณ 0.48 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นประมาณ 5.85 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงถือได้ว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูกที่เหมาะสมต่อการเอ็กโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ได้เป็นอย่างดี

แม้ว่าส่วนใหญ่สภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงเชื้อจะไม่มีผลต่อคุณสมบัติและคุณลักษณะเบื้องต้นของเอ็กโพลีแซคคาไรด์อีก แต่พบว่ามีผลต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ เช่น พีเอช อุณหภูมิ เป็นต้น (Macedo et al., 2002) พบว่าเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M จะไม่สามารถผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ได้ หากเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่า 32-42 องศาเซลเซียส

Gorret, และคณะ (2001) พบว่าอุณหภูมิ พีเอช และความชื้นของยีสต์สกัด มีผลต่อการเจริญ การผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ และการผลิตกรดอินทรีย์โดยเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* โดยเฉพาะพีเอช พบว่าเชื้อ *Propionibacterium acidipropionici* จะผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ในสภาวะที่พีเอชอยู่ในช่วง 5.3-6.5 เท่านั้น

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ด้วยวิธีทากูชิ พบว่า การใช้แหล่งคาร์บอนหลัก (C1) คือ น้ำอ้อย แหล่งคาร์บอนเสริม (C2) คือ กากน้ำตาล แหล่งไนโตรเจน (N) คือ กากถั่วเหลือง และพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0 จะสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุด โดยได้ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากการทำนายเท่ากับ 5.94 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้แหล่งคาร์บอนหลัก (C1) คือ น้ำสับปะรด แหล่งคาร์บอนเสริม (C2) คือ น้ำตาลทรายขาว แหล่งไนโตรเจน (N) คือ กากถั่วเหลือง และพีเอช (pH) เท่ากับ 7.0 จะได้ปริมาณเซลล์สูงสุด โดยได้ปริมาณเซลล์จากการทำนายเท่ากับ 5.79 กรัมต่อลิตร

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ด้วยวิธีพินฉิวตอปสนองโดยใช้หลักการของวิธี Central composite design (CCD) พบว่า สามารถทำนายสมการการเจริญเติบโต และการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ดังนี้

$$Y_{EPS} = 29.51 + 4.84X_1 - 0.093X_2 + 0.99X_3 - 0.39X_1X_2 - 0.18X_1X_3 - 0.17X_2X_3 - 5.42X_1^2 - 0.34X_2^2 - 1.45X_3^2$$

$$Y_{DCW} = 6.16 - 1.03X_1 + 1.72X_2 - 1.26X_3 - 1.18X_1X_2 - 2.45X_1X_3 + 1.10X_2X_3 + 1.11X_1^2 + 1.36X_2^2 + 1.70X_3^2$$

จากการทำนายโดยโปรแกรม Design Expert ระดับที่เหมาะสมของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อ *W. confusa* NH02 คือ ปริมาณกากน้ำตาลความเข้มข้น 43.65 กรัมต่อลิตร ปริมาณกากถั่วเหลือง 1.87 กรัมต่อลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 39.64 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 30.34 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณเซลล์ที่ได้ 5.33 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ระดับที่เหมาะสมของการผลิตเซลล์ คือ ปริมาณกากน้ำตาลความเข้มข้น 20.31 กรัมต่อลิตร ปริมาณกากถั่วเหลือง 2.97 กรัมต่อลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 41.97 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 19.03 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณเซลล์ที่ได้ 16.20 กรัมต่อลิตร

## ผลผลิต (Output)

### บทความวิจัย

Krairot Saelim and Suppasil Maneerat (2019). Optimization of Exopoly-saccharide Production by *Weissella confusa* NH02 by Taguchi Method. Proceedings of the Seoul International Conference on Applied Science and Engineering. Seoul, Korea.

## เอกสารอ้างอิง

- ไพโรโรจน์ วิริยจาโร. 2544. การออกแบบพื้นที่ที่ตอบสนอง. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่
- วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากอาหารหมักพื้นบ้านและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา
- ศุภศิลา มณีรัตน์ และธรรมบุญ โปรบราน. 2553. การพัฒนาฟิล์มและสารเคลือบจากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของ *Weissella confusa* NH02 ที่ผสมสารยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อยืดอายุการเก็บเนื้อหมูแช่เย็น. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา
- สุขใจ ชูจันทร์. 2557. ฟิลิเมอร์จากจุลินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ
- Altaf, M., Naveena, B. J., & Reddy, G. (2007). Use of inexpensive nitrogen sources and starch for l(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bioresource Technology*, 98( 3) , 498– 503. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.013>
- Ates, O. (2015). Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200>
- Box, G.E.P. (2006). *Improving Almost Anything: Ideas and Essays*, Revised Edition, Revised Edition edition. ed. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ.
- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1992). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. in S. Kotz & N. L. Johnson (e.d.), *Breakthroughs in Statistics: Methodology and Distribution* (น. 270–310). [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9_23)
- Box, G.E.P., Hunter, J.S., & Hunter, W.G. (2005). *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery*, 2nd Edition, 2nd edition. ed. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- Cerning, J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., & Topisirovic, L. (1994). Carbon Source Requirements for Exopolysaccharide

- Production by *Lactobacillus casei* CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(11), 3914–3919.
- Cochran, W.G., & Cox, G.M. (1992). *Experimental Designs*, 2nd Edition, 2 edition. ed. Wiley, New York.
- Dabour, N., & LaPointe, G. (2005). Identification and Molecular Characterization of the Chromosomal Exopolysaccharide Biosynthesis Gene Cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7414–7425. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7414-7425.2005>
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 153–177. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x>
- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Gunning, A. P., Bongaerts, R. J., Le Gall, G., Bonev, B. B., ... Narbad, A. (2013). Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(44), 31938–31951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507418>
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>
- Galle, S., Schwab, C., Arendt, E. K., & Gänzle, M. G. (2011). Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. *Food Microbiology*, 28(3), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.006>
- Gassem, M. A., Schmidt, K. A., & Frank, J. F. (1997). Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Food Science*, 62(1), 171–173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04393.x>
- Giesbrecht, F.G., & Gumpertz, M.L. (2004). *Planning, Construction, and Statistical Analysis of Comparative Experiments*, 1 edition. ed. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- Gorret, N., Maubois, J. L., Engasser, J. M., & Ghoul, M. (2001). Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidipropionici* on milk microfiltrate using a



- response surface methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 90(5), 788–796. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01310.x>
- Grosu-Tudor, S.-S., Zamfir, M., Van der Meulen, R., & De Vuyst, L. (2013). Isolation of novel homopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from Romanian raw milk and fermented dairy products. *European Food Research and Technology*, 237(4), 609–615. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2038-2>
- Guzel-Seydim, Z. B., Sezgin, E., & Seydim, A. C. (2005). Influences of exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt. *Food Control*, 16(3), 205–209.
- Kim, M., & Day, D. F. (2011). Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38( 7) , 803– 807. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0812-8>
- Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., Techapun, C., Sasaki, K., & Seesuriyachan, P. (2010). Influence of pH, sucrose concentration and agitation speed on exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as a raw material substitute. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 4(2), 318–330.
- Landersjö, C., Yang, Z., Huttunen, E., & Widmalm, G. (2002). Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). *Biomacromolecules*, 3(4), 880–884.
- Laws, A., Gu, Y., & Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 19(8), 597–625.
- Macedo, M. G., Lacroix, C., & Champagne, C. P. (2002). Combined Effects of Temperature and Medium Composition on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a Whey Permeate Based Medium. *Biotechnology Progress*, 18(2), 167–173. <https://doi.org/10.1021/bp0101637>
- Mahapatra, S., & Banerjee, D. (2013). Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. *Microbiology Insights*, 6, 1– 16. <https://doi.org/10.4137/MBI.S10957>

- Malang, S. K., Maina, N. H., Schwab, C., Tenkanen, M., & Lacroix, C. (2015). Characterization of exopolysaccharide and rropy capsular polysaccharide formation by *Weissella*. *Food Microbiology*, *46*, 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.022>
- Moghannem, S. A. M., Farag, M. M. S., Shehab, A. M., & Azab, M. S. (2018). Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(3), 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.012>
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., & Remaud-Siméon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, *11*(9), 675–685. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00113-3)
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E. M., Van der Meulen, R., Foulquié Moreno, M. R., Font de Valdez, G., & De Vuyst, L. (2006). Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(6), 4431–4435. <https://doi.org/10.1128/AEM.02780-05>
- Muhammadi, & Afzal, M. (2014). Optimization of water absorbing exopolysaccharide production on local cheap substrates by *Bacillus* strain CMG1403 using one variable at a time approach. *Journal of Microbiology*, *52*(1), 44–52. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-2622-6>
- Myers, R.H., & Montgomery, D.C. (1995). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments*. Wiley.
- Patel, S., Majumder, A., & Goyal, A. (2012). Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, *52*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0148-8>
- Prathima, P. C., Lule, V. K., Tomar, S. K. & Singh, A. K. (2014). Optimization of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* NCDC191 by response surface methodology. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *3*(5): 835-854.
- Sanalibaba, P., & Cakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology: Open Access*, *2*(2). <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000115>

- Seesuriyachan, P. , Kuntiya, A. , Hanmoungjai, P. , Techapun, C. , Chaiyaso, T. , & Leksawasdi, N. (2012). Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid state fermentation under high salinity stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76( 5) , 912– 917. <https://doi.org/10.1271/bbb.110905>
- Song, X., Zhang, X., Kuang, C., Zhu, L., & Guo, N. (2007). Optimization of fermentation parameters for the biomass and DHA production of *Schizochytrium limacinum* OUC88 using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 42(10), 1391–1397. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.014>
- Tayuan, C. , Tannock, G. , & Rodtong, S. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Weissella* sp. from low-cost substitutes for sucrose. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22), 3693–3701.
- Wongsuphachat, W. , H- Kittikun, A. , & Maneerat, S. (2010) . Optimization of exopolysaccharides production by *Weissella confusa* NH 02 isolated from Thai fermented sausages. *Songklanakarin Journal Science and Technology*, 32(1), 27-35.
- Unagul, P., Assantachai, C., Phadungruengluij, S., Suphantharika, M., Tanticharoen, M., & Verduyn, C. (2007). Coconut water as a medium additive for the production of docosaheptaenoic acid (C22:6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. *Bioresource Technology*, 98( 2) , 281– 287. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.013>
- Vijayendra, S. V. N., & Babu, R. S. S. (2008). Optimization of a new heteropolysaccharide production by a native isolate of *Leuconostoc* sp. CFR-2181. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 643–648. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02361.x>
- Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21( 6) , 269– 274. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00107-0)
- Xu, C., Yu, J., Zhao, S., Wu, S., He, P., Jia, X., ... Mao, D. (2017). Effect of carbon source on production, characterization and bioactivity of exopolysaccharide produced by *Phellinus vaninii* Ljup. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(3), 2033–2041. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150786>
- Yu, Y.-J., Chen, Z., Chen, P. T., & Ng, I.-S. (2018). Production, characterization and antibacterial activity of exopolysaccharide from a newly isolated *Weissella*

*cibaria* under sucrose effect. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(6), 769–777. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.05.028>

Zhang, T., Zhang, C., Li, S., Zhang, Y., & Yang, Z. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42( 4) , 1470– 1478. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110004000033>