574.19245
ร451

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ที่คัดเลือกได้

The Study of Optimal Conditions for Lysine Production by Selected Mutant

11 มิ.ย. 2544

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปีงบประมาณ 2542

คณะผู้ดำเนินงานวิจัย

สมใจ ศิริโภค
ขจีนาฏ โพธิเวชกุล
พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์
สุมาลี เหลืองสกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

15113 2

คำนำ

ไลซีน (Lysine) เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับมนุษย์และสัตว์ โปรตีนในอาหารพวกธัญพืชซึ่งเป็นอาหารหลักของมนุษย์และสัตว์โดยทั่วไปนั้น จะมีไลซีนอยู่ในปริมาณต่ำ ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย (4) ดังนั้นถ้าต้องการให้ได้ไลซีนเพียงพอจึงต้องรับประทานโปรตีนจากเนื้อสัตว์เข้าไปด้วย อย่างไรก็ตามอาหารสัตว์ส่วนใหญ่ใช้โปรตีนจากพืชเป็นหลัก เนื่องจากมีราคาถูกกว่าโปรตีนจากสัตว์มาก ดังนั้นการเติมไลซีนลงในอาหารสัตว์จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้สัตว์มีการเจริญเติบโตได้ดีในระยะเวลาสั้น ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์มีรายได้เพิ่มขึ้น และเป็นผลดีต่อเศรษฐกิจของประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย

การผลิตไลซีนในอุตสาหกรรมสามารถทำได้ทั้งโดยวิธีการทางเคมี และวิธีการทางชีววิทยา ในปัจจุบันประมาณร้อยละ 80 ของไลซีนที่ผลิตจำหน่ายนั้นผลิตโดยวิธีการหมัก มีเพียงร้อยละ 20 เท่านั้นที่ผลิตโดยวิธีการทางเคมี การใช้วิธีทางชีววิทยาโดยการหมักมีข้อดีกว่าการใช้วิธีการทางเคมี คือ ผลผลิตไลซีนที่ได้จะอยู่ในรูป L-lysine ซึ่งมนุษย์และสัตว์สามารถใช้ได้ทั้งหมด แต่การใช้วิธีทางเคมีจะทำให้ได้ทั้ง D- และ L-lysine ซึ่ง D-lysine นั้น มนุษย์และสัตว์ไม่สามารถใช้ได้ (16)

ปัจจุบันประเทศไทยมีโรงงานผลิตไลซีนจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์เพียงโรงงานเดียว คือ โรงงานของบริษัทอายิโนะโมะโต๊ะ จำกัด ซึ่งมีปริมาณการผลิตไม่เพียงพอต่อการใช้ภายในประเทศ ดังนั้นจึงต้องมีการนำเข้าไลซีนอีกส่วนหนึ่งจากต่างประเทศ ทำให้เสียเงินตราออกนอกประเทศเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้การผลิตไลซีนภายในประเทศ ก็ใช้จุลินทรีย์และเทคโนโลยีที่ซื้อมาจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูงมาก และยังมีปัญหาเรื่องการถ่ายทอดเทคโนโลยีอีกด้วย เนื่องจากจุลินทรีย์และเทคโนโลยีเหล่านี้ยังจำเป็นต้องมีการพัฒนาอยู่เสมอเพื่อให้ได้มาซึ่งจุลินทรีย์และวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งการพัฒนาจุลินทรีย์และเทคโนโลยีนี้ตามปกติจะทำในประเทศผู้สร้างเทคโนโลยี โดยที่เราไม่มีโอกาสมีส่วนร่วมในการพัฒนานี้เลย ประเทศไทยจึงไม่สามารถพึ่งพาตนเองได้ เพราะต้องซื้อเชื้อจุลินทรีย์และเทคโนโลยีจากต่างประเทศอยู่ตลอดเวลา ทำให้ต้นทุนในการผลิตมีราคาสูง

ในปีก่อนหน้านี้ คณะผู้วิจัยได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีนได้ในประเทศของเราเอง เพื่อเป็นแนวทางที่จะนำไปใช้ในการผลิตไลซีนในระดับอุตสาหกรรมในอนาคต ผลจากการวิจัยทำให้แยกได้แบคทีเรียที่ผลิตไลซีนสูงทั้งหมด 9 ไอโซเลท คือ KT 7.1, KT 9.3, KT9.4, KT21.1, KT21.2, KT22.2, KT25.1, NK1.5 และ PL2.2 (1) ซึ่งเมื่อนำมาปรับปรุงสายพันธุ์โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลท (UV) และ NTG แล้ว ปรากฏว่าได้มิวแตนท์ที่มีความสามารถในการผลิตไลซีนได้สูงขึ้นหลายไอโซเลท และไอโซเลทที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดได้แก่ PL2.2-UV3.1-N2.5.41 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 3.68 กรัมต่อลิตร (2)

อย่างไรก็ตามการคัดเลือกมิวแตนท์ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงขึ้นนี้ ท้าการทดลองโดยใช้อาหารและสภาวะมาตรฐานทั่ว ๆ ไป ซึ่งอาจจะยังไม่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไลซีนของมิวแตนท์

เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความต้องการปัจจัยต่าง ๆ ที่แตกต่างกันไป ดังนั้นในปีนี้คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลซีนของ PL2.2-UV3.1-N2.5.41 (ต่อไปจะใช้รหัส SWU41 แทน เพื่อความเหมาะสม) ซึ่งเป็นมิวแตนท์ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไลซีน

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายวางแผนและพัฒนา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

สมใจ ศิริโภค และคณะ

กุมภาพันธ์ 2544

บทคัดย่อ

จากการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 (PL2.2-UV3.1-N2.5.41) ซึ่งเป็น AEC resistant mutant (AEC^R) ที่ผลิตไลซีนได้สูง โดยการแปรผันส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตไลซีนมากที่สุดได้แก่ ปริมาณของแหล่งคาร์บอน และชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน และสูตรอาหารที่เหมาะสม (optimized medium) ที่ทำให้มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้สูงสุดมีส่วนประกอบเป็นร้อยละดังนี้คือ glucose 7.5, NH_4Cl 0.75, tryptone 0.6, yeast extract 0.1, KH_2PO_4 0.05, K_2HPO_4 0.075, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02, $FeSO_4.7H_2O$ 0.001, $MnSO_4.H_2O$ 0.001 และ $CaCO_3$ 0.25 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมโดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน สามารถผลิตไลซีนได้สูง 5.05 กรัมต่อลิตร

Abstract

Factors affecting lysine production of the mutant SWU41 (PL2.2-UV3.1-N2.5.41) which is an AEC resistant mutant (AEC^R) yielding high levels of lysine, were investigated. By varying medium compositions, it was found that the factors most affecting the production of lysine were the concentrations of carbon-sources, and the types and concentrations of nitrogen-sources. The optimized medium for lysine production by the mutant SWU41 contained 7.5% glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% tryptone, 0.1% yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$ and 0.25% $CaCO_3$. Growth conditions suitable for lysine production were determined. The highest level of lysine, 5.05 g/l, was achieved when cultured the mutant SWU41 in the optimized medium for 4 days at 30°C, with 250 rpm agitation.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	9
ขอบเขตของการวิจัย	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
อุปกรณ์และวิธีทดลอง	10
ผลการทดลอง	13
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	27
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	33

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทนำ

ไลซีน (Lysine) เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นจึงนิยมใช้เติมลงในอาหารกันอย่างกว้างขวางเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ ปัจจุบันความต้องการไลซีนเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมทั้งในมนุษย์และสัตว์มีปริมาณสูงมาก แต่ละปีมีการผลิตไลซีนประมาณ 130,000 ตัน (32) โดยผลผลิตส่วนใหญ่ได้มาจากการหมักโดยจุลินทรีย์ (38)

การใช้กระบวนการหมักเพื่อผลิตสารชนิดต่าง ๆ ในอุตสาหกรรม นอกจากจะต้องเลือกใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างผลผลิตที่ต้องการได้สูงแล้ว ยังจำเป็นต้องใช้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้จุลินทรีย์สร้างผลผลิตได้สูงสุด จึงจะทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำพอที่จะแข่งขันกับการผลิตโดยวิธีอื่น ๆ ได้ (24, 30, 36)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตไลซีนนั้น ได้มีผู้ศึกษาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตกรดอะมิโนของจุลินทรีย์ไว้ต่าง ๆ กันดังนี้

แหล่งคาร์บอน วัตถุดิบที่มีรายงานว่าใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไลซีนได้ผลดีมีหลายชนิด เช่น กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส (11, 21) อย่างไรก็ตามในอุตสาหกรรมนิยมใช้ในรูปของ starch hydrolysate หรือ cane molasses (38) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้กรดอะซิติก แอมโมเนียมอะซิเตท เมทานอล และเอทานอล เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไลซีนได้ผลดีอีกด้วย เมื่อใช้ชนิดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันไป (25, 31, 34)

แหล่งไนโตรเจน โดยทั่วไปนิยมใช้แก๊สแอมโมเนีย และเกลือแอมโมเนียม หรือยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนในกรณีที่จุลินทรีย์สามารถเมแทบอไลซ์ยูเรียไปเป็นแอมโมเนียได้ (36)

เกลือแอมโมเนียมที่มีรายงานว่าใช้ได้ผลดีในการผลิตไลซีนได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4Cl (10, 21, 25, 31-33) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้นสูงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้เชื้อผลิต ornithine แทนที่จะผลิตไลซีน (5)

นอกจากแหล่งไนโตรเจนที่กล่าวมาแล้ว ก็ยังมีการใช้สารอื่น ๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนอีก เช่น แอมโมเนียมอะซิเตท ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ด้วย และสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีรายงานว่าใช้ในการผลิตไลซีน ได้แก่ yeast extract, meat extract, peptone, polypeptone, NZ-amine (casein hydrolysate), soybean meal hydrolysate, corn steep liquor (11, 21, 25, 33)

เกลือแร่ โดยทั่วไปมักจะมีการเติม KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4$, $FeSO_4$, $MnSO_4$ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (8, 17, 20, 37, 38) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีการใช้เกลือแร่ชนิดอื่น ๆ อีกด้วย เช่น KCl, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$, H_3BO_3, $CuSO_4$, Na_2MoO_4, $CoNO_3$, NaH_2PO_4, $CoCl_2$ (10, 31)

วิตามิน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตไลซีนโดยทั่วไปจะเติมไบโอตินลงไปด้วย ยกเว้นในกรณีที่ใช้ cane molasses ไม่จำเป็นต้องเติมไบโอติน แต่ถ้าใช้ beet molasses ต้องเติมไบโอตินอย่างน้อย 30 ไมโครกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า homoserine auxotroph ของ

Corynebacterium glutamicum จะผลิตแลคเตทและซัคซิเนทแทนที่จะผลิตไลซีน ในสภาวะที่มีไบโอตินความเข้มข้นสูงมากเกินไป และถ้าใช้ไบโอตินความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของออกโซโทรปความเข้มข้นสูง ๆ เชื้อจะผลิตแลคเตทขึ้นแทนไลซีน โดยทรีโอนีนและโฮโมซีรีนจะมีผลมากกว่าเมทไธโอนีนและไอโซลิวซีน (19, 38)

อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าการเติมไบโอตินปริมาณสูง (200-500 ไมโครกรัมต่อลิตร) จะทำให้ *Brevibacterium lactofermentum* AJ3991 ผลิตไลซีนได้สูงขึ้น (37)

สำหรับวิตามินชนิดอื่น ๆ ที่มีการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลซีนได้แก่ ไทอะมีน นิโคตินาไมด์ แคลเซียมแพนโทธีเนท ไรโบฟลาวิน กรดโฟลิก และวิตามินบี 12 (10, 25, 31, 32)

กรดอะมิโน เนื่องจากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติส่วนใหญ่ จะสร้างไลซีนได้ปริมาณค่อนข้างต่ำ แม้แต่จุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วว่าสร้างไลซีนได้สูงคือ *Ustilago maydis* ก็ยังผลิตไลซีนได้น้อยกว่า 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยเกินไปที่จะใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าผลิตไลซีนได้สูงในปัจจุบันได้มาจากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีต่างๆ และสมบัติที่สำคัญของจุลินทรีย์เหล่านี้ก็คือ เป็นออกโซโทรปที่มีความต้องการกรดอะมิโนบางชนิดในการเจริญ ดังนั้นการที่จะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เหล่านี้ให้ผลิตไลซีนได้สูง จึงต้องเติมกรดอะมิโนที่เชื้อต้องการลงไปด้วยในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปได้แก่ โฮโมซีรีน หรือทรีโอนีนและเมทไธโอนีน และออกโซโทรปบางชนิดอาจมีความต้องการลิวซีน ไอโซลิวซีน อะลานีน หรือเฟนิลอะลานีนเพื่อการเจริญอีกด้วย (32, 33, 37)

ตามปกติแล้ว homoserine auxotroph จะผลิตไลซีนได้ดีในอาหารที่มีทรีโอนีนหรือโฮโมซีรีนปริมาณจำกัดและมีไบโอตินในระดับปานกลาง แต่ในสภาวะที่มีทั้งทรีโอนีนหรือโฮโมซีรีนและไบโอตินในปริมาณจำกัด จุลินทรีย์จะผลิตไลซีนและกรดกลูตามิกควบคู่กันในปริมาณน้อยลง การเติมทรีโอนีนหรือโฮโมซีรีนความเข้มข้นสูงและไบโอตินปริมาณเล็กน้อย จะส่งเสริมการผลิตกรดกลูตามิก และโดยทั่วไปการเติมกลูตาเมทหรือกลูตามีนปริมาณเล็กน้อยลงในอาหารจะช่วยส่งเสริมการผลิตไลซีน ซีสเทอีนจะยับยั้งการผลิตไลซีนได้เล็กน้อย แต่ในอาหารที่มีทรีโอนีนและโฮโมซีรีนความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ จะยับยั้งการสร้างไลซีนได้อย่างสมบูรณ์ (37, 38)

สภาพความเป็นกรดด่าง ตามปกติแล้วจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ pH เริ่มต้น 7-7.5 และปรับ pH ในระหว่างการหมักให้อยู่ในช่วงที่เป็นกลาง โดยเติมสารละลายแอมโมเนียหรือยูเรีย หรือใช้ $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5-1.0 เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (38)

อุณหภูมิ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไลซีนส่วนใหญ่ สามารถเจริญและผลิตไลซีนได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 28-33 องศาเซลเซียส (37, 38) แต่ก็มีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถผลิตไลซีนได้ที่อุณหภูมิสูงๆ เช่น *Bacillus* sp. (Hom^-, AEC^R) ผลิตไลซีนได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (31) และ *B. stearothermophilus* (AEC^R, Hom^-) ผลิตไลซีนได้ดีที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นต้น (10)

การให้อากาศ การสังเคราะห์ไลซีนเป็นกระบวนการที่ต้องการออกซิเจน ดังนั้นการให้อากาศจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากในกระบวนการหมักไลซีน ถ้าให้ออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอ จุลินทรีย์จะผลิตไลซีนได้ปริมาณสูง แต่ถ้าให้ออกซิเจนปริมาณไม่เพียงพอ จุลินทรีย์จะเกิดการสะสมกรดแลคติกแทน (13, 16, 28, 34)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อปรับปรุงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ที่คัดเลือกได้

2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ เช่น ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และการให้อากาศ

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ ใช้มิวแตนท์ของแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนสูงที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย UV และ NTG ในปีก่อนหน้านี้คือ PL2.2-UV3.1-N2.5.41 (SWU41) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว production medium ซึ่งแปรผันส่วนประกอบต่าง ๆ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามินและกรดอะมิโนบางชนิด และแปรผันสภาวะในการเพาะเลี้ยง คือ ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และการให้อากาศ เพื่อหาส่วนประกอบของอาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้ผลผลิตไลซีนสูงสุด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยที่ได้ คือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ที่คัดเลือกได้ในระดับ shake flask เพื่อเป็นแนวทางในการขยายขนาดการผลิตในระดับถังหมักต่อไป จนกระทั่งสามารถนำไปใช้ผลิตไลซีนในเชิงพาณิชย์ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย คือ เกษตรกร

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ มิวแตนท์ของแบคทีเรียที่ให้ผลผลิตไลซีนสูง ซึ่งได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย UV และ NTG ในปีก่อนหน้านี้ คือ PL2.2-UV3.1-N2.5.41 (2) และต่อไปจะใช้รหัส SWU41 แทน

2. การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไลซีน โดยใช้อาหาร production medium ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส หรือซูโครส (น้ำตาลทราย) ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 2.5-10

2.1 นำเชื้อ SWU41 จากข้อ 1 มาเลี้ยงใน inoculum medium เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า (Forma Scientific Orbital Shaker Model 4581) ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

2.2 ปิเปต inoculum จากข้อ 2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแปรผันแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสหรือซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5.0, 7.5 หรือ 10

2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

2.4 เก็บตัวอย่างทุกวัน นำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออก โดยใช้ refrigerated centrifuge (Sorvall รุ่น RC5) ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.5 นำ supernatant ไปวิเคราะห์หาปริมาณไลซีนเปรียบเทียบกัน โดยใช้วิธี paper chromatography ตามวิธีการในภาคผนวก ข้อ 2

2.6 เลือกชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด ไปใช้ในการทดลองข้อต่อไป

3. การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

3.1 ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตไลซีน โดยใช้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 2 แต่แปรผันแหล่งไนโตรเจนเป็น NH_4Cl หรือ $(NH_4)_2SO_4$ หรือ NH_4OAc หรือ KNO_3 หรือ urea โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.25-1.0

3.2 ศึกษาผลของ tryptone และ yeast extract ที่มีต่อการผลิตไลซีน โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 3.1 แต่แปรผันส่วนประกอบของ tryptone และ yeast extract ดังนี้คือ

3.2.1 แปรผันปริมาณ tryptone โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.2, 0.4, 0.6 0.8 และ 1.0

3.2.2 แปรผันปริมาณ yeast extract โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 และใช้ tryptone ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 3.2.1

4. การแปรผันชนิดและปริมาณของแร่ธาตุ

ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแร่ธาตุชนิดต่างๆที่มีต่อการผลิตไลซีนโดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 3 แต่แปรผันส่วนประกอบของแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ดังนี้คือ

4.1 แปรผันปริมาณ KH_2PO_4 โดยใช้ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

4.2 แปรผันปริมาณ K_2HPO_4 โดยใช้ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 กรัมต่อลิตร และใช้ KH_2PO_4 ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 4.1

4.3 แปรผันปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ โดยใช้ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, และ 0.4 กรัมต่อลิตร และใช้ KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 4.1 และ 4.2

4.4 แปรผันปริมาณ $FeSO_4.7H_2O$ โดยใช้ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.03, และ 0.04 กรัมต่อลิตร และใช้ KH_2PO_4, K_2HPO_4 และ $MgSO_4.7H_2O$ ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 4.1, 4.2 และ 4.3

4.5 แปรผันปริมาณ $MnSO_4.H_2O$ โดยใช้ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 กรัมต่อลิตร และใช้ KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$ และ $FeSO_4.7H_2O$ ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 4.1, 4.2, 4.3 และ 4.4

5. การแปรผันชนิดและปริมาณของวิตามิน

ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของวิตามินชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตไลซีน โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 4 แต่แปรผันวิตามินชนิดต่างๆ ดังนี้

5.1 แปรผันปริมาณ biotin โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อลิตร

5.2 แปรผันปริมาณ thiamine โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อลิตร และใช้ biotin ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 5.1

6. การแปรผันชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน

ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตไลซีน โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 5 แต่แปรผันส่วนประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ดังนี้คือ

6.1 แปรผันปริมาณ threonine โดยใช้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

6.2 แปรผันปริมาณ methionine โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้ threonine ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 6.1

6.3 แปรผันปริมาณ isoleucine โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้ threonine และ methionine ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 6.1 และ 6.2

6.4 แปรผันปริมาณ glutamic acid โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้ threonine, methionine และ isoleucine ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 6.1, 6.2 และ 6.3

7. การแปรผันความเป็นกรดด่าง

ศึกษาผลของความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตไลซีน โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 6 แต่แปรผันปริมาณ $CaCO_3$ เป็นร้อยละ ดังนี้คือ 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0

8. การแปรผันอุณหภูมิ

ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตไลซีน โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 6 ใช้ $CaCO_3$ ปริมาณที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 7 แต่แปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อดังนี้คือ 28, 30, 32 และ 35 องศาเซลเซียส

9. การแปรผันการให้อากาศ

ศึกษาผลของการให้อากาศในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ ที่มีต่อการผลิตไลซีน โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากการทดลองในข้อ 6 ใช้ $CaCO_3$ ปริมาณเหมาะสมที่สุดจากข้อ 7 และใช้อุณหภูมิที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงที่สุดที่ได้จากการทดลองในข้อ 8 แต่แปรผันอัตราความเร็วในการเขย่าดังนี้คือ 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที

ผลการทดลอง

1. การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส หรือซูโครส ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 2.5-10 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน พบว่ามิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการบ่มเชื้อ และผลิตไลซีนได้ปริมาณไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อใช้กลูโคสหรือซูโครสปริมาณเท่า ๆ กันเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้นตามลำดับปริมาณแหล่งคาร์บอนที่สูงขึ้นจากร้อยละ 2.5-7.5 และผลิตไลซีนได้สูงสุด 3.92 และ 3.85 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสหรือซูโครสร้อยละ 7.5 เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ แต่ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนสูงถึงร้อยละ 10 พบว่าปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จะลดลงดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้กลูโคสร้อยละ 7.5 เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 1 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

ความเข้มข้น (%)	ไลซีน (กรัมต่อลิตร)									
	กลูโคส					ซูโครส				
	1d	2d	3d	4d	5d	1d	2d	3d	4d	5d
2.5	0.97	1.55	1.73	2.19	1.86	0.92	1.64	1.96	2.29	1.88
5.0	0.94	1.90	3.20	3.60	3.07	0.89	2.11	3.17	3.52	3.10
7.5	1.12	2.20	3.55	3.92	3.53	0.94	2.26	3.48	3.85	3.25
10	1.01	1.75	3.31	3.68	3.36	0.81	2.09	3.21	3.54	3.27

Production medium : 1.0% NH_4Cl, 0.4% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.05% K_2HPO_4, 0.025% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

2. การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

2.1 การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตไลซีน

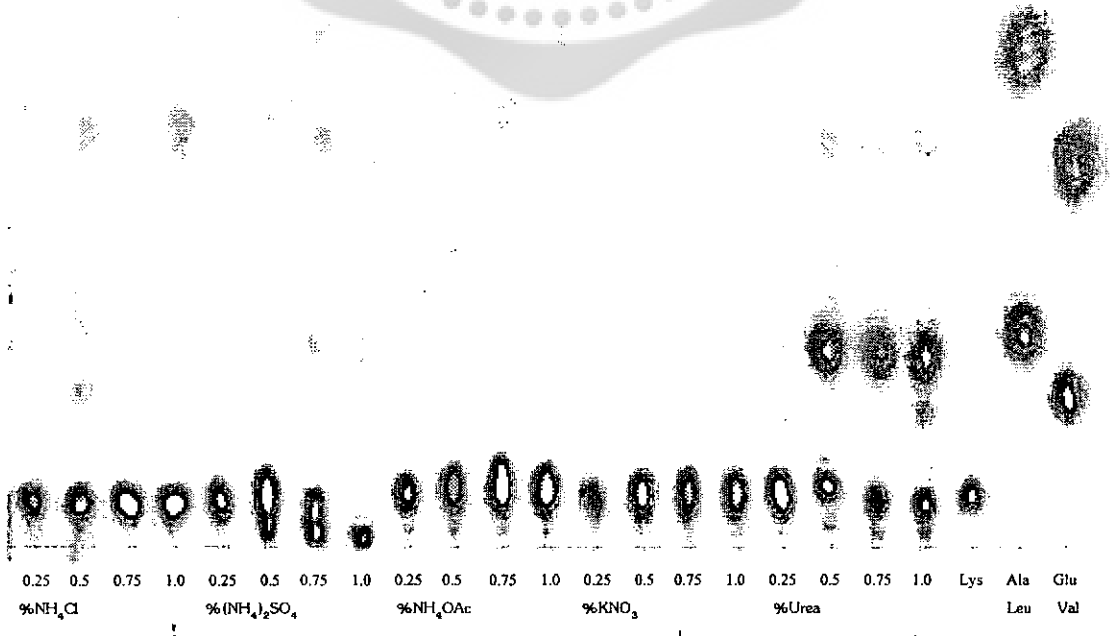
จากการศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 เป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันแหล่งไนโตรเจนเป็น NH_4Cl หรือ $(NH_4)_2SO_4$ หรือ NH_4OAc หรือ KNO_3 หรือ urea ความเข้มข้นร้อยละ 0.25-1.0 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่า มิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนได้ต่างกันในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 1 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการ

ผลิตไลซีนมากที่สุดได้แก่ NH_4Cl ร้อยละ 0.75 ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตไลซีนสูง 4.32 กรัมต่อลิตร ในกรณีที่ใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ร้อยละ 0.25-0.5 เป็นแหล่งไนโตรเจน มิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนได้น้อยกว่าเมื่อใช้ NH_4Cl ความเข้มข้นเท่ากันเพียงเล็กน้อย แต่ถ้าใช้ $(NH_4)_2SO_4$ สูงกว่าร้อยละ 0.5 มิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนลดลงอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อใช้ urea เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าความเข้มข้นของ urea ที่ใช้มีผลต่อชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่ผลิตได้ ถ้าใช้ urea ร้อยละ 0.5-1.0 มิวแตนท์ SWU41 จะผลิตอะลานีนได้ปริมาณสูงขึ้น แต่ผลิตไลซีนได้น้อยกว่าเมื่อใช้ urea ร้อยละ 0.25 และเมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อใช้ urea ความเข้มข้นสูงขึ้น จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมี pH สูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3 แสดงว่า pH มีผลต่อความสามารถในการผลิตกรดอะมิโนของมิวแตนท์ SWU41

ตารางที่ 2 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

ความเข้มข้น (%)	ไลซีน (กรัมต่อลิตร)				
	NH_4Cl	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4OAc	KNO_3	Urea
0.25	2.35	2.07	2.09	1.24	3.20
0.50	3.64	3.24	2.91	2.35	1.64
0.75	4.32	0.87	2.40	2.23	1.22
1.00	3.90	0	1.74	2.14	1.24

Production medium : 7.5% Glucose, 0.4% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.05% K_2HPO_4, 0.025% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$



ภาพที่ 1 Paper chromatogram ของกรดอะมิโนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลง pH ในอาหาร production medium ที่แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อมิวแตนท์ SWU41 เป็นเวลา 4 วัน

ความเข้มข้น (%)	PH																			
	NH_4Cl				$(NH_4)_2SO_4$				NH_4OAc				KNO_3				Urea			
	1d	2d	3d	4d	1d	2d	3d	4d	1d	2d	3d	4d	1d	2d	3d	4d	1d	2d	3d	4d
0.25	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	5	5	5
0.50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	5	5	6	6	6	7	7	7
0.75	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	5	5	6	6	6	8	9	9
1.00	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	5	5	6	6	6	8	9	9

หมายเหตุ : pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดคือ 6.5

2.2 การศึกษาผลของ tryptone ที่มีต่อการผลิตไลซีน

จากการศึกษาผลของ tryptone ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 แต่แปรผันปริมาณ tryptone โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.2, 0.4, 0.6 0.8 และ 1.0 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าการเติม tryptone มีผลทำให้มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้สูงขึ้นดังแสดงในตารางที่ 4 และจะผลิตไลซีนได้มากที่สุด 4.60 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ tryptone ร้อยละ 0.6 แต่ถ้าใช้ tryptone มากกว่านี้ ผลผลิตไลซีนที่ได้จะลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการมีกรดอะมิโนบางชนิดมากเกินไป เพราะ tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ได้มาจากการย่อยสลายเคซีน จึงมีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ จำนวนมาก รวมทั้งทรีโอนีน ดังนั้นถ้าใช้ tryptone ปริมาณสูง ก็อาจทำให้มีทรีโอนีนปริมาณสูง และมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ไลซีนได้ ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ tryptone ร้อยละ 0.6

ตารางที่ 4 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี tryptone ปริมาณต่างๆ กัน

ปริมาณ tryptone (%)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0	3.26
0.2	3.87
0.4	4.30
0.6	4.60
0.8	4.21
1.0	4.24

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.05% K_2HPO_4, 0.025% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

2.3 การศึกษาผลของ yeast extract ที่มีต่อการผลิตไลซีน

จากการศึกษาผลของ yeast extract ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 และ tryptone ร้อยละ 0.6 แต่แปรผันปริมาณ yeast extract โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้มากที่สุด 4.60 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ yeast extract ร้อยละ 0.1 แต่ถ้าใช้ yeast extract มากเกินไปจะทำให้ผลิตไลซีนได้ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก yeast extract มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เป็นส่วนประกอบอยู่เป็นจำนวนมาก รวมทั้งทรีโอนีน ดังนั้นถ้าใช้ yeast extract ปริมาณสูง ก็อาจทำให้มีทรีโอนีนปริมาณสูงจนกระทั่งมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ไลซีนได้ นอกจากนี้ใน yeast extract ยังมีวิตามินบีและแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งอาจมีผลต่อการผลิตไลซีนได้ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ yeast extract ร้อยละ 0.1

ตารางที่ 5 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ yeast extract (%)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0	2.79
0.1	4.60
0.2	4.06
0.3	2.23
0.4	1.16

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.05% KH_2PO_4, 0.05% K_2HPO_4, 0.025% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

3. การแปรผันชนิดและปริมาณของแร่ธาตุ

3.1 การแปรผันปริมาณ KH_2PO_4

จากการศึกษาผลของ KH_2PO_4 ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 tryptone ร้อยละ 0.6 yeast extract ร้อยละ 0.1 แต่แปรผันปริมาณ KH_2PO_4 โดยใช้ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 ปริมาณ KH_2PO_4 ที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ผลิตไลซีนได้ 4.62 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 6 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี KH_2PO_4 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ KH_2PO_4 (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0.10	2.78
0.25	3.72
0.50	4.62
0.75	4.09
1.00	3.54

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% K_2HPO_4, 0.025% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

3.2 การแปรผันปริมาณ K_2HPO_4

จากการศึกษาผลของ K_2HPO_4 ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 tryptone ร้อยละ 0.6 yeast extract ร้อยละ 0.1 KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณ K_2HPO_4 โดยใช้ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7 ปริมาณ K_2HPO_4 ที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.75 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ผลิตไลซีนได้ 4.71 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 7 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี K_2HPO_4 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ K_2HPO_4 (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0.10	3.46
0.25	3.95
0.50	4.60
0.75	4.71
1.00	4.24

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.025% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

3.3 การแปรผันปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$

การศึกษาผลของ $MgSO_4.7H_2O$ ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 tryptone ร้อยละ 0.6 yeast extract ร้อยละ 0.1 KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.75 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ โดยใช้ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3 และ 0.4 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 ปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ผลิตไลซีนได้ 4.85 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 8 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี $MgSO_4.7H_2O$ ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0	1.33
0.10	4.39
0.20	4.85
0.25	4.70
0.30	4.61
0.40	4.36

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

3.4 การแปรผันปริมาณ $FeSO_4.7H_2O$

การศึกษาผลของ $FeSO_4.7H_2O$ ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 tryptone ร้อยละ 0.6 yeast extract ร้อยละ 0.1 KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.75 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณ $FeSO_4.7H_2O$ โดยใช้ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9 ปริมาณ $FeSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ผลิตไลซีนได้ 4.85 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 9 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี $FeSO_4.7H_2O$ ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ $FeSO_4.7H_2O$ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0	3.76
0.01	4.85
0.02	4.31
0.03	3.85
0.04	3.81

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

3.5 การแปรผันปริมาณ $MnSO_4.H_2O$

การศึกษาผลของ $MnSO_4.H_2O$ ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 tryptone ร้อยละ 0.6 yeast extract ร้อยละ 0.1 KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.75 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณ $MnSO_4.H_2O$ โดยใช้ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 ปริมาณ $MnSO_4.H_2O$ ที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ผลิตไลซีนได้ 4.85 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 10 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี $MnSO_4.H_2O$ ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ $MnSO_4.H_2O$ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0	3.70
0.01	4.85
0.02	4.43
0.03	4.03
0.04	3.98
0.05	3.85

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

4. การแปรผันชนิดและปริมาณของวิตามิน

4.1 การแปรผันปริมาณ biotin

จากการศึกษาผลของ biotin ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 tryptone ร้อยละ 0.6 yeast extract ร้อยละ 0.1 KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.75 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร $MnSO_4.H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณ biotin โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าการเติม biotin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีผลช่วยให้มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้มากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 11 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงไม่เติม biotin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 11 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี biotin ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ biotin (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0	4.84
100	4.75
200	4.80
300	4.75
400	4.70
500	4.75

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

4.2 การแปรผันปริมาณ thiamine

จากการศึกษาผลของ thiamine ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 tryptone ร้อยละ 0.6 yeast extract ร้อยละ 0.1 KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.75 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร $MnSO_4.H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณ thiamine โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อลิตร

บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าการเติม thiamine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีผลทำให้มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้มากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 12 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงไม่เติม thiamine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 12 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี thiamine ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ thiamine (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0	4.85
100	4.80
200	4.75
300	4.78
400	4.80
500	4.78

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

5. การแปรผันชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน

5.1 การแปรผันปริมาณ threonine

จากการศึกษาผลของ threonine ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 tryptone ร้อยละ 0.6 yeast extract ร้อยละ 0.1 KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.75 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร $MnSO_4.H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณ threonine โดยใช้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13 มิวแตนท์ SWU41 สามารถผลิตไลซีนได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม threonine การเติม threonine 50-250 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในอาหาร ทำให้เชื้อผลิตไลซีนได้ลดลงตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงไม่เติม threonine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

#151131

ตารางที่ 13 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี threonine ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ threonine (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0	4.85
50	4.73
100	4.45
150	4.38
200	4.28
250	3.73

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

5.2 การแปรผันปริมาณ methionine

จากการศึกษาผลของ methionine ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 tryptone ร้อยละ 0.6 yeast extract ร้อยละ 0.1 KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.75 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร $MnSO_4.H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณ methionine โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าการเติม methionine ลงในอาหาร ไม่มีผลช่วยให้มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้มากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 14 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงไม่เติม methionine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 14 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี methionine ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ methionine (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0	4.85
100	4.82
200	4.80
300	4.73
400	4.75
500	4.70

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

5.3 การแปรผันปริมาณ isoleucine

จากการศึกษาผลของ isoleucine ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 tryptone ร้อยละ 0.6 yeast extract ร้อยละ 0.1 KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.75 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร $MnSO_4.H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณ isoleucine โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าการเติม isoleucine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีผลช่วยให้มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้มากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 15 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงไม่เติม isoleucine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 15 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี isoleucine ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ isoleucine (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0	4.85
100	4.75
200	4.80
300	4.85
400	4.83
500	4.80

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

5.4 การแปรผันปริมาณ glutamic acid

จากการศึกษาผลของ glutamic acid ที่มีต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยใช้อาหาร production medium ที่มีกลูโคสร้อยละ 7.5 NH_4Cl ร้อยละ 0.75 tryptone ร้อยละ 0.6 yeast extract ร้อยละ 0.1 KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.75 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร $MnSO_4.H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณ glutamic acid โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าการเติม glutamic acid ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีผลทำให้มิวแตนท์ SWU41

ผลิตไลซีนได้มากขึ้นดังแสดงในตารางที่ 16 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงไม่เติม glutamic acid ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 16 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี glutamic acid ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณ glutamic acid (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0	4.86
100	4.82
200	4.75
300	4.78
400	4.82
500	4.75

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.5% $CaCO_3$

6. การแปรผันความเป็นกรดด่าง

การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการผลิตไลซีน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร optimized medium ที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 5 แต่แปรผันปริมาณ $CaCO_3$ เป็นร้อยละดังนี้คือ 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 17 มิวแตนท์ SWU41 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 5.00 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.25 แต่เมื่อใช้ $CaCO_3$ ปริมาณสูงขึ้นจะทำให้มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้ลดลง ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.25

ตารางที่ 17 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี $CaCO_3$ ปริมาณต่างกัน

ปริมาณ $CaCO_3$ (%)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
0.25	5.00
0.50	4.84
0.75	4.40
1.00	4.08

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$

7. การแปรผันอุณหภูมิ

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไลซีนในอาหาร optimized medium ที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 6 แต่แปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อดังนี้คือ 28, 30, 32 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 18 มิวแตนท์ SWU41 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 5.05 กรัมต่อลิตร เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิต่ำหรือสูงเกินไปจะทำให้เชื้อผลิตไลซีนได้ลดลง ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 18 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกัน

อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
28	3.80
30	5.05
32	4.85
35	3.55

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.25% $CaCO_3$

8. การแปรผันการให้อากาศ

การศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตไลซีน โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร optimized medium ที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 6 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่แปรผันอัตราความเร็วในการเขย่า ดังนี้คือ 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที พบว่าการให้อากาศมีผลต่อการผลิตไลซีน เมื่อใช้ความเร็วรอบในการเขย่าต่ำ มิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนได้น้อยกว่าเมื่อใช้ความเร็วรอบในการเขย่าสูง ดังแสดงในตารางที่ 19 และจะผลิตไลซีนได้ปริมาณสูงใกล้เคียงกันเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 และ 300 รอบต่อนาที ดังนั้นการผลิตไลซีนจากมิวแตนท์ SWU41 จึงควรใช้เครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการประหยัดพลังงาน

ตารางที่ 19 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากมิวแตนท์ SWU41 เมื่อเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบต่าง ๆ กัน

ความเร็วของเครื่องเขย่า (รอบต่อนาที)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)
200	4.32
250	5.05
300	5.00

Production medium : 7.5% Glucose, 0.75% NH_4Cl, 0.6% Tryptone, 0.1% Yeast extract, 0.05% KH_2PO_4, 0.075% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, 0.001% $MnSO_4.H_2O$, 0.25% $CaCO_3$

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 โดยการแปรผันส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าได้ผลดังนี้

การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนโดยใช้กลูโคส หรือซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 2.5-10 พบว่ามิวแตนท์ SWU41 สามารถผลิตไลซีนได้ปริมาณไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อใช้กลูโคสหรือซูโครสปริมาณเท่า ๆ กันเป็นแหล่งคาร์บอน และผลิตไลซีนได้สูงสุด 3.92 และ 3.85 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วันในอาหารที่มีกลูโคสหรือซูโครสร้อยละ 7.5 เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ

การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ NH_4Cl หรือ $(NH_4)_2SO_4$ หรือ NH_4OAc หรือ KNO_3 หรือ urea ร้อยละ 0.25-1.0 พบว่ามิวแตนท์ SWU41 สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนทุกชนิดในการเจริญและผลิตไลซีนได้ และผลิตไลซีนได้สูงสุด 4.32 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ NH_4Cl ร้อยละ 0.75 เป็นแหล่งไนโตรเจน

ในกรณีที่ใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ร้อยละ 0.25-0.5 เป็นแหล่งไนโตรเจน มิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนได้น้อยกว่าเมื่อใช้ NH_4Cl ความเข้มข้นเท่ากันเพียงเล็กน้อย แต่ถ้าใช้ $(NH_4)_2SO_4$ สูงกว่าร้อยละ 0.5 มิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนลดลงอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่า SO_4^{-2} มีผลต่อการผลิตไลซีน เช่นเดียวกับการทดลองของ Chatterjee และ White (1982) ซึ่งรายงานว่าการใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณสูง จะทำให้ *Bacillus megaterium* ผลิตไลซีนได้ลดลง และเมื่อใช้ urea เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าความเข้มข้นของ urea จะมีผลต่อชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่ผลิตได้ ถ้าใช้ urea มากกว่าร้อยละ 0.25 มิวแตนท์ SWU41 จะผลิตอะลานีนได้ปริมาณสูงขึ้น แต่ผลิตไลซีนได้น้อยลง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อใช้ urea ความเข้มข้นสูง จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมี pH สูงขึ้น จึงมีการผลิตไลซีนได้ลดลง เนื่องจากโดยทั่วไปจุลินทรีย์จะผลิตไลซีนได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง (38)

การศึกษาผลของ tryptone และ yeast extract ต่อการผลิตไลซีน พบว่าการเติม tryptone และ yeast extract ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้สูงขึ้น และจะผลิตไลซีนได้สูงสุด 4.60 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ tryptone และ yeast extract ร้อยละ 0.6 และ 0.1 ตามลำดับ แต่ถ้าใช้ tryptone และ yeast extract มากเกินไป ผลผลิตไลซีนจะลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการมีกรดอะมิโนบางชนิดมากเกินไป เนื่องจาก tryptone และ yeast extract ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆ จำนวนมาก รวมทั้งทรีโอนีน ดังนั้นถ้าใช้ tryptone และ yeast extract ปริมาณสูง ก็อาจทำให้มีทรีโอนีนปริมาณสูงและมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ไลซีนได้ นอกจากนี้ใน yeast extract ยังมีวิตามินบีและแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งอาจมีผลต่อการผลิตไลซีนด้วย (15, 19, 37, 38)

การศึกษาผลของแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน พบว่ามิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนได้สูงสุด 4.85 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ดังนี้คือ KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.75, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 และ $MnSO_4.H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Nakayama และคณะ ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลซีนจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (26)

การศึกษาผลของวิตามินต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ SWU41 พบว่าการเติม biotin และ thiamine 100-500 ไมโครกรัมต่อลิตร ไม่มีผลช่วยให้เชื้อผลิตไลซีนได้สูงขึ้น ซึ่งต่างจากการผลิตไลซีนจากเชื้ออื่นโดยทั่วไป ที่ต้องมีการเติม biotin และ thiamine เพื่อให้มีการผลิตไลซีนได้ดีขึ้น (38) ดังนั้นการผลิตไลซีนจากมิวแตนท์ SWU41 จึงไม่จำเป็นต้องเติม biotin และ thiamine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาผลของกรดอะมิโนบางชนิดต่อการผลิตไลซีน พบว่าการเติม threonine 50-250 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในอาหาร จะทำให้มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้ลดลง แสดงว่า threonine มีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ไลซีนได้ และการเติม methionine, isoleucine และ glutamic acid 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็ไม่มีผลทำให้มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้มากขึ้น ดังนั้นจึงไม่ควรเติม threonine, methionine, isoleucine และ glutamic acid ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดลองแปรผันส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดนี้ พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไลซีนมากที่สุดได้แก่ ปริมาณของแหล่งคาร์บอน ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน และสูตรอาหารที่เหมาะสม (optimized medium) ที่ทำให้มิวแตนท์ SWU41 ผลิตไลซีนได้สูงสุด มีส่วนประกอบเป็นร้อยละดังนี้คือ glucose 7.5, NH_4Cl 0.75, tryptone 0.6, yeast extract 0.1, KH_2PO_4 0.05, K_2HPO_4 0.075, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02, $FeSO_4.7H_2O$ 0.001, $MnSO_4.H_2O$ 0.001

การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการผลิตไลซีน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร optimized medium ที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.25-1.0 พบว่ามิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนได้สูงสุด 5.00 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.25 เมื่อใช้ $CaCO_3$ ปริมาณสูงขึ้นมิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนได้ลดลง ซึ่งต่างไปจากการผลิตไลซีนจากเชื้ออื่น ๆ โดยทั่วไป ซึ่งนิยมใช้ $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5-1.0 (38)

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไลซีนในอาหาร optimized medium โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28-35 องศาเซลเซียส พบว่ามิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนได้สูงสุด 5.05 กรัมต่อลิตร เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตไลซีนจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ (38) การใช้อุณหภูมิต่ำหรือสูงเกินไปจะทำให้เชื้อผลิตไลซีนได้ลดลง

การศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตไลซีนในอาหาร optimized medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200-300 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อใช้ความเร็วรอบในการเขย่าต่ำ มิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนได้น้อยกว่าเมื่อใช้ความเร็วรอบในการเขย่าสูง และจะผลิตไลซีนได้ปริมาณใกล้เคียงกันเมื่อใช้ความเร็ว 250 และ 300 รอบต่อนาที ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ความเร็วในการเขย่า 250 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการประหยัดพลังงาน

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน พบว่ามิวแตนท์ SWU41 จะผลิตไลซีนได้สูงสุด 5.05 กรัมต่อลิตร ในอาหาร optimized medium ที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.25 เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

อย่างไรก็ตามการผลิตไลซีนจากมิวแตนท์ SWU41 แม้ว่าจะเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้แล้วก็ยังให้ผลผลิตไลซีนไม่สูงมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตไลซีนโดยใช้กระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบัน ซึ่งสามารถผลิตไลซีนได้สูงกว่า 40 กรัมต่อลิตร (38) สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในการทดลองนี้ทำในฟลาสก์ ดังนั้นจึงควบคุมสภาวะต่าง ๆ ได้ยาก โดยเฉพาะการควบคุม pH ซึ่งมีผลต่อการผลิตไลซีนค่อนข้างมาก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้วางแผนที่จะทดลองเพาะเลี้ยงมิวแตนท์ SWU41 ในถังหมักซึ่งสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในการหมักได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลซีนในถังหมักต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. สมใจ ศิริโภค, ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์ และ สุมาลี เหลืองสกุล. 2541. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลซีน. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.** 14 (1) : 39-94.
2. สมใจ ศิริโภค, ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์ และ สุมาลี เหลืองสกุล. 2543. **การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีนโดยวิธีการผ่าเหล่า.** รายงานการวิจัย: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
3. Ackerson , M., E. Clausen and J. Gaddy. 1989. Lysine Production in Continuous Culture. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 20/21 : 511-528.
4. Barrett , G. C. 1985. **Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids.** London : Chapman and Hall.
5. Chatterjee, S. P. and P. J. White. 1982. Activities and Regulation of the Enzymes of Lysine Biosynthesis in a Lysine-excreting Strain of *Bacillus megaterium*. **J. Gen. Microbiol.** 128 : 1073-1081.
6. Chinard , F. D. 1952. Photometric Estimation of Proline and Ornithine. **J. Biol. Chem.** 199 : 91-95.
7. Coello , N. , J. G. Pan and J. M. Lebeault. 1992. *Corynebacterium glutamicum* : Morphological and Ultrastuctural Changes of L-Lysine Producing Cells in Continuous Culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38 : 34-38.
8. Coello, N., J. G. Pan and J. M. Lebeault. 1992. Physiological Aspects of L-Lysine Production : Effect of Nutrition Limitations on Producing Strain of *Corynebacterium glutamicum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38 : 259-262.
9. Cremer , J. , L. Eggeling and H. Sahm. 1991. Control of the Lysine Biosynthesis Sequence in *Corynebacterium glutamicum* as Analyzed by Overexpression of the Individual Corresponding Genes. **Appl. Envi. Microbiol.** 57 (6) : 1746-1752.
10. Crociani, F., A. Selli , G. Crisetig , D. Di Gioia and D. Matteuzzi. 1991. L-Lysine Production at 65° C by Auxotrophic-Regulatory Mutants of *Bacillus stearothermophilus*. **J. Indus. Microbiol.** 8 : 127-132.
11. Crueger, W., A. Creuger. 1984. Strain Development. pp 9-48. In T. D. Brock (ed.), **Biotechnology : A Text Book of Industrial Microbiology.** Sunderland : Sinauer Associates.

12. Demain , A. L. and N. A. Solomon. 1985. **Biology of Industrial Microorganisms.** London : Benjamin/Cummins Publishing Company.

13. Demain , A. L. and N. A. Solomon. 1986. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.** Washington : American Society for Microbiology.

14. Erdmann, A., B. Weil and R. Kramer. 1994. Lysine Secretion by *Corynebacterium glutamicum* Wild Type : Regulation of Secretion Carrier Activity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42 : 604-610.

15. Halasz, A. and R. Lasztity. 1991. **Use of Yeast Biomass in Food Production.** Boston: CRC Press.

16. Hirose , Y. and H. Chibata. 1980. Amino Acid Fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 22 (1) : 115-125.

17. Hollander, J. A. de. 1994. Potential Metabolic Limitations in Lysine Production by *Corynebacterium glutamicum* as Revealed by Metabolic Network Analysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42 : 508-515.

18. Jayaraman , J. 1981. **Laboratory Manual in Biochemistry.** New Delhi : Wiley Eastern Limited.

19. Jetten , M. S. K. , M. E. Gubler, M. M. McCormick, G. E. Colon, M. T. Follettie and A. J. Sinskey. 1993. Molecular Organization and Regulation of the Biosynthetic Pathway for Aspartate-Derived Amino Acids in *Corynebacterium glutamicum* , pp. 97-104. In R. H. Baltz, G. D. Hegeman and P. L. Skatrud. (ed.) , **Industrial Microorganisms : Basic and Applied Molecular Genetics.** Washington DC : American Society for Microbiology.

20. Kinoshita, S. 1985. Glutamic Acid Bacteria. pp. 115-142. In A.L. Demain and N. A. Solomon (ed.) , **Biology of Industrial Microorganisms.** London : Benjamin / Cummings Publishing Company.

21. Kinoshita, S., K. Nakayama and S. Kitada. 1958. L-Lysine Production Using Microbial Auxotroph. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 4 (2) : 128-129.

22. Kinoshita , S. , U. Shigezo and S. Masakazu. 1957. Study on the Amino Acid Fermentation. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 3 (3) : 193-205.

23. Menkel, E. , G. Thierbach, L. Eggeling and H. Sahm. 1989. Influence of Increased Aspartate Availablility on Lysine Formation by a Recombinant Strain of *Corynebacterium glutamicum* and Utilization of Fumarate. **Appl. Environ. Microbiol.** 55 (3) : 684-688.

24. Miller , B. M. and W. Litsky. 1976. **Industrial Microbiology.** New York : McGraw-Hill Book Company.

25. Motoyama, H., H. Anazawa, R. Katsumata, K. Araki and S. Teshiba. 1993. Amino Acid Production from Methanol by *Methylobacillus glycogenes* Strains , and Derivation of L-Threonine and L-Lysine-producing Mutants from Them. **Biosci. Biotech. Biochem.** 57(1) : 82-87.

26. Nakayama, K., S. Kitada and S. Kinoshita. 1961. Studies on Lysine Fermentation I. The Control Mechanism on Lysine Accumulation by Homoserine and Threonine. **Gen. Appl. Microbiol.** 7(3) : 145-154.

27. Ohsumi , T. , H. Sato , Y. Yoshihara and S. Ikedaa. 1994. Selection and Breeding of Lysine-accumulating *Sacchaaromyces cerevisiae* as a Stable Source of Lysine in the Rumen. **Biosci. Biotech. Biochem.** 58 (7) : 1302-1305.

28. Peppler , H. J. and D. Perlman. 1979. **Microbial Technology.** London : Academic Press, Inc.

29. Plummer , D. T. 1978. **An Introduction to Practical Biochemistry.** 2nd ed. New York : McGraw-Hill Book Company.

30. Prescott, S. C. and C. G. Dunn. 1959. **Industrial Microbiology.** 3rd ed. New York : McGraw-Hill Book Company.

31. Schendel, F. J., C. E. Bremmon, M. C. Flickinger, M. Guettler and R.S. Hansson. 1990. L-Lysine Production at 50° C by Mutants of a Newly Isolated and Characterized Methylotrophic *Bacillus* sp. **Appl. Envi. Microbiol.** 56 (4) : 963-970.

32. Schrumpf, B. , L. Eggeling and H. Sahm. 1992. Isolation and Prominent Characteristics of an L-Lysine Hyperproducing Strain of *Corynebacterium glutamicum.* **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 37 (5) : 566-571.

33. Shiio, I., H. Yoshino and S. Sugimoto. 1990. Isolation and Properties of Lysine-producing Mutants with Feedback-resistant Aspartokinase Derived from a *Brevi-bacterium flavum* strain with Citrate Synthase - and Pyruvate Kinase-defects and Feedback-resistant Phosphoenolpyruvate Carboxylase. **Agric. Biol. Chem.** 54(12): 3275-3282.

34. Shvinka , J. , U. Viesturs and M. Ruklisha. 1980. Yield Regulation of Lysine Biosynthesis in *B. flavum* . **Biotechnol. Bioeng.** 22 : 897-9112.

35. Sikyta , B. 1983. **Methods in Industrial Microbiology.** Chichester : Ellis Horwood Limited.

36. Stanbury , P. F. and A. Whitaker. 1984. **Principles of Fermentation Technology.** Oxford : Pergamon Press.

37. Tosaka, O., H. Enei and Y. Hirose. 1983. The Production of L-Lysine by Fermentation. **Trends in Biotechnology.** 1(3) : 70-80.

38. Yamada , K . , S. Kinoshita , T. Tsunoda and K. Aida. 1972. **The Microbial Production of Amino Acids.** Tokyo : Kodansha Ltd.

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด หลังจากที่เตรียมใส่ในภาชนะที่เหมาะสมแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.1 Nutrient agar (NA)

ใช้ในการเก็บเชื้อไว้เป็น stock มีส่วนประกอบดังนี้คือ

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

1.2 Inoculum medium

ใช้ในการเตรียม inoculum ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Kinoshita *et al.*, 1957 (22) โดยใช้กลูโคสเพียง 1 % และใช้ yeast extract 0.1 % แทน meat extract 0.25 % มีส่วนประกอบดังนี้คือ

Glucose	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	7	

1.3 Production medium

ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีน ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Kinoshita *et al.*, 1958 (21) โดยใช้ tryptone (pancreatic digest of casein) แทน NZ-amine (casein hydrolysate) มีส่วนประกอบดังนี้คือ

Glucose*	50.00	กรัม
NH_4Cl	10.00	กรัม
Tryptone	4.00	กรัม
KH_2PO_4	0.50	กรัม
K_2HPO_4	0.50	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.01	กรัม
Yeast extract	1.00	กรัม
$CaCO_3$ **	5.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ (ยกเว้น กลูโคส และ $CaCO_3$) ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แบ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 40 มิลลิลิตร

หมายเหตุ

* เตรียมโดยชั่งกลูโคส 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 200 มิลลิลิตร แยกนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้

** เตรียมโดยชั่ง $CaCO_3$ 0.25 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ก่อนที่จะใส่อาหารเลี้ยงเชื้อลงไป

2. การวิเคราะห์ปริมาณไลซีนโดยวิธี paper chromatography

2.1 การเตรียมสารเคมี

2.1.1 ตัวทำละลาย

เตรียมโดยใช้ n-butanol, acetic acid และน้ำ ในอัตราส่วน 4:1:1 ผสมให้เข้ากัน เทลงใน chamber ที่มีฝาปิดสนิท แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง

2.1.2 สารละลายนินไฮดริน

เตรียมโดยชั่งนินไฮดริน 0.5 กรัม ละลายใน acetone : absolute ethanol อัตราส่วน 7:3 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

2.1.3 สารละลายไลซีนมาตรฐาน

เตรียมโดยชั่งไลซีน 0.125 กรัม ละลายในน้ำ 25 มิลลิลิตร

2.1.4 **0.005% $CuSO_4 . 5 H_2O$ ใน 75% ethanol**

เตรียมโดยชั่ง $CuSO_4 . 5 H_2O$ 0.05 กรัม ละลายในน้ำ 210 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม 95% ethanol ลงไป 790 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของไลซีน

2.2.1 ตัดกระดาษโครมาโตกราฟฟี Whatman No. 1 ให้มีขนาด กว้าง x สูง เท่ากับ 40 x 25 เซนติเมตร ใช้ดินสอขีดเส้นตรงให้ห่างจากขอบกระดาษด้านล่างขึ้นมา 2 เซนติเมตร และขีดเส้นห่างจากขอบด้านบนลงมา 3 เซนติเมตร

2.2.2 Spot สารละลายไลซีนมาตรฐานปริมาตร 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 และ 3.0 ไมโครลิตร (2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 15 ไมโครกรัมตามลำดับ) ลงบนเส้นที่ขีดไว้ด้านล่าง ให้มีระยะห่างกันจุดละ 1.5 เซนติเมตร (ทำ 3 ซ้ำ) รอให้แห้งสนิท

2.2.3 นำไป develop ใน chamber ที่บรรจุตัวทำละลายที่เตรียมไว้แล้ว จนกระทั่งตัวทำละลายซึมผ่านกระดาษขึ้นไปถึงเส้นที่ขีดไว้ด้านบน ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง

2.2.4 นำกระดาษออกจาก chamber ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

2.2.5 สเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดรินให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

2.2.6 นำกระดาษไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นแถบสีม่วงเกิดขึ้นในบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่

2.2.7 วัดระยะทางที่กรดอะมิโนและตัวทำละลายเคลื่อนที่ เพื่อนำไปหาค่า Rf

2.2.8 ตัดกระดาษบริเวณที่มีแถบสีม่วง ใส่ลงในหลอดที่มี 0.005% $CuSO_4 . 5H_2O$ ใน 75% ethanol 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้สีละลายออกมา

2.2.9 นำไปวัด OD ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโต-มิเตอร์ UV-1201V (Shimadzu)

2.2.10 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD ที่ได้กับปริมาณไลซีน

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณไลซีนในตัวอย่าง

2.3.1 เตรียมกระดาษโครมาโตกราฟฟีเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1

2.3.2 Spot ตัวอย่างปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร ลงบนเส้นที่ขีดไว้ด้านล่าง ให้แต่ละตัวอย่างอยู่ห่างกัน 1.5 เซนติเมตร (ทำ 3 ซ้ำ) รอให้แห้งสนิท

2.3.3 นำไป develop ใน chamber ที่บรรจุตัวทำละลาย เช่นเดียวกับข้อ 2.2.3

2.3.4 นำกระดาษออกจาก chamber ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

2.3.5 สเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดรินให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

2.3.6 นำกระดาษไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นแถบสีม่วงเกิดขึ้นในบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่

2.3.7 ตัดกระดาษบริเวณที่มีแถบสีม่วงซึ่งมีค่า Rf เท่าไลซีน ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มี 0.005% $CuSO_4 . 5H_2O$ ใน 75% ethanol 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้สีละลายออกมา

2.3.8 นำไปวัด OD ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

2.3.9 คำนวณหาปริมาณไลซีนในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.4 Calibration curve ของไลซีน