

การคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตไลซีนได้จากดิน

ปริญญานิพนธ์
ของ
ศรีอัมพร หนูกลับ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
กุมภาพันธ์ 2544
ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตไลซีนได้จากดิน

บทคัดย่อ
ของ
ศรีอัมพร หนูกลับ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
กุมภาพันธ์ 2544

ศรีอัมพร หนูกลับ. (2544). การคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตไลซีนได้จากดิน. วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมใจ ศิริโชค, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์วิทยา ตันสุวรรณนนท์, รองศาสตราจารย์ สุมาลี เหลืองสกุล.

การแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะมิโนได้ จากตัวอย่างดินที่นำมาจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร minimal medium พบว่าแบคทีเรียที่สร้างกรดอะมิโนได้จำนวน 93 ไอโซเลท และเมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้นี้ไปเลี้ยงในอาหาร production medium โดยเฉพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไลซีน โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ พบว่ามี 5 ไอโซเลท ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงกว่าไอโซเลทอื่น ๆ และเชื้อที่ผลิตไลซีนได้สูงสุด 0.70 กรัมต่อลิตร ได้แก่ เชื้อรหัส SK2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนาข้าว บริเวณหมู่บ้านไสกุณ อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง มีรูปร่างท่อน ดิสคีย้อมแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ได้ จัดอยู่ในจีนัส *Bacillus*

เมื่อนำ SK2 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) แล้วคัดเลือก Met+Thr auxotroph ที่ผลิตไลซีนได้สูงสุด ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยรังสี UV ซ้ำอีก พบว่าเชื้อรหัส SK2M5 เป็นมิวแทนท์ที่ผลิตไลซีนได้สูงสุด 1.08 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำ SK2M5 ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดย N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ซ้ำอีก พบว่าเชื้อรหัส SK2M5N4 ซึ่งเป็นมิวแทนท์ที่มีความต้านทานต่อ S-2-aminoethyl-L-cysteine (AEC^R) สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 1.56 กรัมต่อลิตร

การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลซีนของ SK2M5N4 พบว่า SK2M5N4 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 3.64 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร optimized production medium ที่มีส่วนประกอบดังนี้คือ 5% glucose, 1% NH₄Cl, 1.6% tryptone, 0.15% yeast extract, 0.05% KH₂PO₄, 0.05% K₂HPO₄, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 0.02% MnSO₄·H₂O, 100 µg/l biotin, 250 µg/l thiamine-HCl, 0.05% L-methionine, 0.01% L-threonine, 0.25% CaCO₃ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

SCREENING AND IMPROVEMENT OF LYSINE PRODUCING STRAIN OF BACTERIA FROM SOIL

AN ABSTRACT

BY

SRIAMPORN HNUKLUB

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Biology
at Srinakharinwirot University
February 2001

Sriamporn Hnuklub. (2001). *Screening and improvement of lysine producing strain of bacteria from soil*. Master thesis, M.Ed. (Biology). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Assist. Prof. Somjai Siripoke, Assist. Prof. Dr. Wittaya Tonsuwonnont, Assoc. Prof. Sumalee Leungsakul.

Thirty soil samples from several sources were screened for amino acid producing bacteria by growing on a minimal medium. Ninety-three bacterial isolates were achieved. In order to determine the production of lysine, these bacteria were cultivated in a production medium, at 30°C for 3 days with 200 rpm agitation on a rotary shaker. The presence of lysine in the culture supernatants was determined by using paper chromatography method. Five isolates were found to produce high levels of lysine. Among these isolates, SK2 (a Gram positive endospore-forming bacterium, supposedly of the genus *Bacillus*) which was isolated from farming-soil in Muban-Saikun Phapayom Patthalung, yielded the highest amount of lysine at 0.70 g/l.

The improvement of lysine production of SK2 was performed by UV mutagenesis. Subsequently, the best lysine-producing mutant was selected and remutagenized. Following consecutive UV irradiation, SK2M5, a derivative of SK2, yielded the highest amount of lysine at 1.08 g/l. SK2M5 was further treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). The best lysine-producing mutant (S-2-aminoethyl-L-cysteine resistant mutant, AEC^R), designated SK2M5N4, derived from SK2M5, produced 1.56 g/l of lysine.

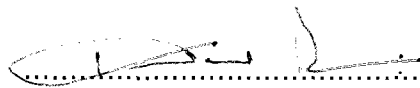
The factors affecting lysine production of SK2M5N4 were investigated. It was found that SK2M5N4 can produce the highest amount of lysine at 3.64 g/l in the optimized production medium (5% glucose, 1% NH₄Cl, 1.6% tryptone, 0.15% yeast extract, 0.05% KH₂PO₄, 0.05% K₂HPO₄, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 0.02% MnSO₄·H₂O, 100 µg/l biotin, 250 µg/l thiamine-HCl, 0.05% L-methionine, 0.01% L-threonine, 0.25% CaCO₃) after incubation at 30°C for 3 days with 200 rpm agitation.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

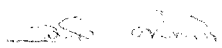
การคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตไลซีนได้จากดิน

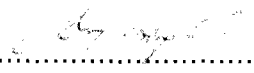
ของ
นางสาวศรีอัมพร หนูกลับ

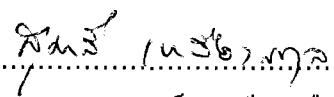
ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

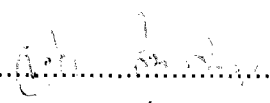
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. เสริมศักดิ์ วิชาลาภรณ์)
วันที่...๔.๖.... เดือน...พฤษภาคม....พ.ศ. 2544

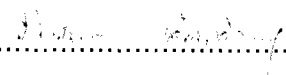
คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมใจ ศิริโคก)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์วิทยา ตันสุวรรณนนท์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สุมาลี เหลืองสกุล)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ จรียา สินเดิมสุข)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือ และแนะนำอย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมใจ ศิริโชค ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์วิทยา ตันสุวรรณหนงค์ และรองศาสตราจารย์ สุมาลี เหลืองสกุล ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความช่วยเหลือ ในเรื่องเครื่องมือวิทยาศาสตร์ และสารเคมี ต่าง ๆ ส่วนหนึ่ง

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้ใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และสารเคมีต่าง ๆ อีกส่วนหนึ่ง

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดามารดา และขอบคุณพี่-น้องในครอบครัว ที่ให้กำลังใจ มาโดยตลอด

ศรีอัมพร หนูกลับ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
โครงสร้างและความสำคัญของไลซีน.....	3
วิธีการผลิตไลซีน.....	4
ประวัติการผลิตไลซีนจากจุลินทรีย์.....	6
กลไกการผลิตไลซีนจากจุลินทรีย์.....	7
การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีปริมาณการผลิตไลซีนที่สูงขึ้น.....	9
ปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการผลิตไลซีนของเชื้อจุลินทรีย์.....	13
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
อุปกรณ์และสารเคมี.....	16
วิธีการทดลอง.....	18
การเก็บตัวอย่างดินและแยกแบคทีเรียจากดิน.....	18
การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลซีนได้.....	18
การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียโดยรังสี UV และสารเคมี NTG.....	19
การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน ของมิวแตนท์ที่คัดเลือกได้.....	20
การศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ ที่คัดเลือกได้.....	21
4 ผลการวิจัย.....	22
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	46
บรรณานุกรม.....	50
ภาคผนวก.....	54
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	61

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แหล่งที่เก็บตัวอย่างดินและลักษณะแบคทีเรียที่แยกได้.....	22
2 ปริมาณการผลิตไลซีนของแบคทีเรียที่แยกได้.....	24
3 จำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญได้และอัตราการอยู่รอดหลังการผ่านรังสี UV ที่เวลาต่าง ๆ.....	25
4 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จาก Met+Thr auxotroph ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV	25
5 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จาก AEC ^R ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG.....	26
6 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย SK2M5N4 และปริมาณกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อใน PM ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ.....	27
7 ผลของ NH ₄ Cl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4..	29
8 ผลของ tryptone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4	30
9 ผลของ yeast extract ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4.....	31
10 ผลของ K ₂ HPO ₄ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4.....	32
11 ผลของ KH ₂ PO ₄ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4.....	33
12 ผลของ MgSO ₄ ·7H ₂ O ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4.....	34
13 ผลของ FeSO ₄ ·7H ₂ O ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4.....	35
14 ผลของ MnSO ₄ ·HO ₂ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4.....	36
15 ผลของ biotin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4...	37
16 ผลของ thiamine-HCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4.....	38

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
17 ผลของ L-methionine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	39
18 ผลของ L-threonine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	40
19 ผลของ CaCO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4	41
20 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	42
21 ผลของการให้อากาศเมื่อใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่าง ๆ ต่อ การผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	43
22 ชนิดและปริมาณสารอาหาร และสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อ การผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4 เปรียบเทียบกับสูตรอาหารเริ่มต้น....	45

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 การสังเคราะห์ไลซีนจาก caprolactam.....	5
2 การสังเคราะห์ไลซีนผ่านวิถี Diaminopimelate.....	8
3 การเกิด ไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ในดีเอ็นเอโดยรังสี UV.....	9
4 โครงสร้าง NTG และการเติมหมู่อัลคิลที่อะตอมออกซิเจนของ Guanine ในดีเอ็นเอโดย NTG ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่สมติดไป (G จับกับ T).....	10
5 การติดสีย้อมแกรมและลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย SK2 (330X).....	24
6 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย SK2M5N4 และปริมาณกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อใน PM ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ.....	28
7 ผลของ NH_4Cl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4.....	29
8 ผลของ tryptone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	30
9 ผลของ yeast extract ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	31
10 ผลของ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	32
11 ผลของ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	33
12 ผลของ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	34
13 ผลของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	35
14 ผลของ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	36
15 ผลของ biotin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	37

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
16 ผลของ thiamine-HCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	38
17 ผลของ L-methionine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	39
18 ผลของ L-threonine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	40
19 ผลของ CaCO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน ของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	41
20 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4	42
21 ผลของการให้อากาศเมื่อใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4.....	43

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

กรดอะมิโน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่นใช้เป็นอาหารคนและสัตว์ ผลิตภัณฑ์และเครื่องสำอาง และยังใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสารเคมีต่างๆ (กำเนิด สุภณวงษ์. 2534)

ไลซีน เป็นกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) สำหรับการเจริญเติบโตของคนและสัตว์ มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ และสารต่างๆ ที่ร่างกายต้องสร้างเพื่อดำรงชีวิต เช่น พวกลิวซีน ฮิสทีดีน โพรลีน เอนไซม์ ตลอดจนช่วยให้ระบบประสาท และระบบเลือด ทำงานได้ปกติ ร่างกายคนและสัตว์ไม่สามารถที่จะสังเคราะห์ไลซีนได้เอง จำเป็นต้องได้รับจากสารอาหารเข้าไป เพื่อสร้างสมดุลของกรดอะมิโนที่ใช้ในการเจริญเติบโต หรือเพื่อให้ร่างกายเป็นปกติสุขในการดำรงอยู่หลังจากที่หยุดการเจริญเติบโตแล้ว โดยปกติร่างกายสามารถรับไลซีนได้จากแหล่งอาหารพวกเมล็ดธัญพืช แต่ในเมล็ดธัญพืชจะมีปริมาณไลซีนไม่เพียงพอ กับความต้องการของร่างกาย หรือมีในปริมาณจำกัด ฉะนั้นจึงมีผู้คิดค้นนำเอาผลผลิตไลซีนที่ได้จากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์บางชนิดที่เหมาะสมมาเสริมในอาหารคนและสัตว์ ซึ่งจะช่วยให้คนและสัตว์มีสมดุลของกรดอะมิโนของร่างกายได้อีกทางหนึ่ง ในทางการแพทย์มีการใช้ไลซีนสำหรับเด็กที่ขาดโปรตีน ส่วนในทางการเกษตรก็ใช้ไลซีนผสมในอาหารสัตว์ เพื่อช่วยเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์และให้อัตรารอดชีวิตอยู่ในระดับสูง ทำให้เกษตรกรมีกำไรจากการผลิตสูงขึ้น (Barrett. 1985 ; Hirose and Shibata. 1980 ; Prescott and Dunn. 1959)

การผลิตไลซีนในอุตสาหกรรมสามารถทำได้ ทั้งโดยวิธีการทางเคมีและวิธีการทางชีววิทยา ในปัจจุบันประมาณร้อยละ 80 ของไลซีนที่ผลิตจำหน่ายนั้น ผลิตโดยวิธีการหมักมีเพียงร้อยละ 20 เท่านั้นที่ผลิตโดยวิธีการทางเคมี การใช้วิธีการทางชีววิทยาโดยการหมักมีข้อดีกว่าการใช้วิธีการทางเคมี คือ ผลผลิตไลซีนที่ได้จะอยู่ในรูป L-lysine ซึ่งร่างกายคนและสัตว์สามารถนำไปใช้ได้ทั้งหมด แต่การใช้วิธีการทางเคมีจะทำให้ได้ทั้ง D-lysine และ L-lysine ซึ่ง D-lysine คนและสัตว์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ (Hirose and Shibata. 1980 ; Yamada and others. 1972) สำหรับการผลิตไลซีนในประเทศไทย ที่บริษัทอายิโนะโมะโต๊ะ ประเทศไทย จำกัด ผลิตได้ขณะนี้ใช้กระบวนการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ แต่กระบวนการผลิตไลซีนในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศยังต้องอาศัยการนำเข้าเชื้อจุลินทรีย์และเทคโนโลยีจากต่างประเทศ ซึ่งในส่วนนี้ยังเป็นปัญหาต่อการพัฒนาเศรษฐกิจแบบยั่งยืน เพราะยังขาดการพึ่งพาตนเอง ดังนั้นหากมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีนได้ในประเทศของเรา และนำไป

ปรับปรุงพันธุ์ให้มีความสามารถในการผลิตไลซีนได้สูงขึ้น รวมทั้งศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตไลซีนในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะทำให้เราพึ่งตนเองได้ และช่วยลดการเสียเปรียบดุลการค้าระหว่างประเทศได้บ้าง

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลซีนได้จากดิน
2. เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ให้สามารถผลิตไลซีนได้สูงขึ้น โดยการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) และใช้สารเคมี N-methyl-N' - nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)
3. ศึกษาปัจจัยบางอย่างเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของมิวแทนท์ที่คัดเลือกได้

ความสำคัญของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ คาดว่าจะทำให้ได้แบคทีเรียที่สามารถผลิตไลซีนจากดิน และสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่กลายพันธุ์ที่ผลิตไลซีนได้สูงขึ้น ซึ่งผลจากการศึกษาสามารถนำไปปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงเพียงพอที่จะใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ขอบเขตของการวิจัย

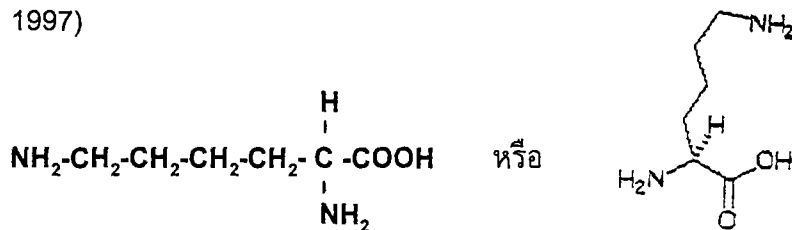
1. แยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนได้จากตัวอย่างดิน ที่เก็บจากจังหวัดพัทลุง และจังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 30 ตัวอย่าง
2. นำแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด มากระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้รังสี UV และสารเคมี NTG แล้วคัดเลือกมิวแทนท์ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงขึ้นมาที่สุด
3. ศึกษาปัจจัยบางอย่างเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของมิวแทนท์ที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

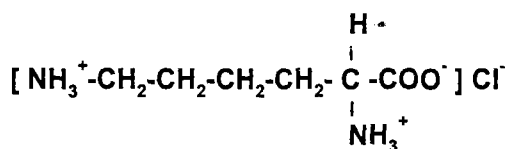
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงสร้างและความสำคัญของไลซีน

ไลซีน มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วย หมู่อะมิโน (-NH_2) และหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ที่ต่อกับสายไฮโดรคาร์บอน (CH_2) ซึ่งมีองค์ประกอบของธาตุเป็น $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ และเขียนเป็นสูตรโครงสร้างได้ดังนี้ (Barrett. 1985 ; Voet and Voet. 1990 ; Devlin. 1997)



หรือหากอยู่ในรูป L-lysine HCl ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์สามารถเขียนสูตรโครงสร้างได้ดังนี้คือ



ไลซีนเป็นกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) สำหรับเป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่ใช้ในการเจริญเติบโตของคนและสัตว์ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและสารต่าง ๆ ที่ร่างกายต้องสร้างเพื่อดำรงชีวิต เช่นพวกแอนติบอดี ฮอร์โมน เอนไซม์ ตลอดจนช่วยให้ระบบประสาทและระบบเลือดทำงานได้ปกติ

การนำไลซีนไปใช้ประโยชน์ ทำให้หลายลักษณะดังต่อไปนี้

1. การใช้ไลซีนในคน

- นำไลซีนมาผสมในอาหารคน ได้แก่ อาหารประเภทขนมที่ทำจากแป้ง และอาหารเสริมต่าง ๆ
- ผลิตเป็นยาในรูปของแคปซูล เม็ด และน้ำเชื่อม
- นำมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางพวกประทินผิว แชมพูและครีมทาผิว

2. การใช้ไลซีนในสัตว์

- ผสมในอาหารสัตว์ เช่น ในอาหาร สุนัข โคเนื้อ ม้า สุนัข แมว เป็ด ไก่ และ ปลา เป็นต้น

3. การใช้ไลซีนในห้องปฏิบัติการ เช่น ใช้ไลซีนในการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ transglutaminase ที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อม (crosslinking - reaction) ระหว่างไลซีนกับกลูตามีน ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม การประสานชิ้นเนื้อ ชิ้นปลาแผ่นบางๆ ให้เกาะกันเป็นรูปทรงใหม่ตามต้องการ และการแปรรูปอาหารพวกผลิตภัณฑ์ไส้กรอก เป็นต้น (Yamada and others. 1972)

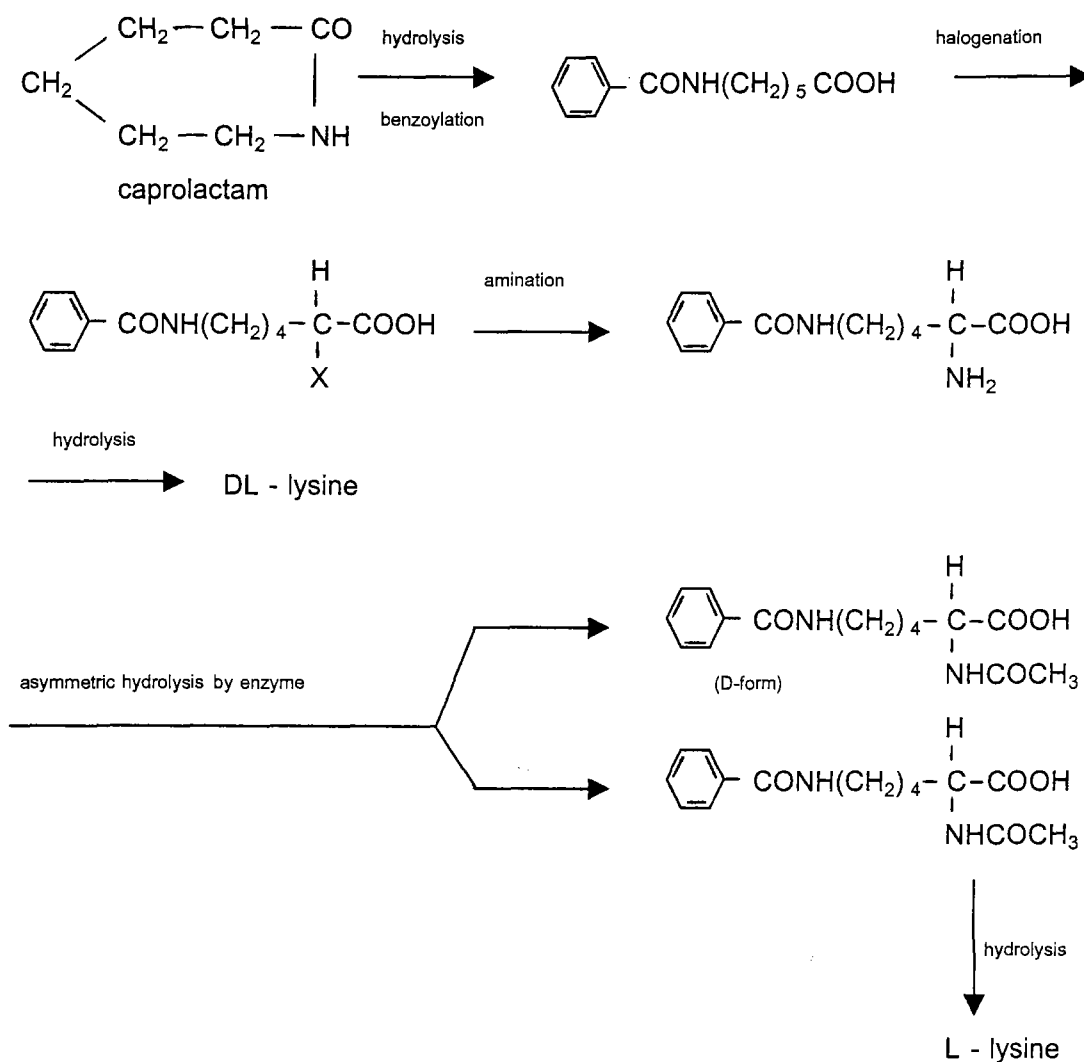
วิธีการผลิตไลซีน

แต่ก่อนการผลิตไลซีน จะใช้การแยกจากโปรตีนในธรรมชาติ เช่นจากถั่วเหลือง และ ข้าวสาลี เป็นต้น แต่เนื่องจากแหล่งโปรตีนในธรรมชาติเหล่านี้มีสารอาหารอื่นรวมอยู่ด้วยซึ่งจะให้ประโยชน์โดยตรงต่อร่างกายคนและสัตว์ที่อยู่แล้ว เป็นการไม่คุ้มทุนที่จะนำมาสกัดแยกไลซีนมาใช้เพียงอย่างเดียว

ในระยะต่อมาการผลิตไลซีนสามารถทำได้ ด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี และวิธีการทางชีววิทยาโดยการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ (Yamada and others. 1972)

วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี

กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนทางเคมีต้องผ่านขั้นตอนต่าง ๆ หลายขั้นตอน โดยอาจเริ่มจาก caprolactam, dihydropyran, cyclohexanone หรือ piperidine เป็นต้น ตัวอย่างการสังเคราะห์จาก caprolactam เป็นดังภาพประกอบ 1 (Yamada and others. 1972)



ภาพประกอบ 1 การสังเคราะห์ไลซีนจาก caprolactam

จะเห็นได้ว่าในกระบวนการสังเคราะห์ไลซีนทางเคมี จะได้ผลผลิตคือ DL - lysine และจะต้องมีวิธีการแยกต่อเพื่อให้ได้เป็น L - lysine ซึ่งทำให้ผลผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำ

วิธีการทางชีววิทยาโดยการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์

การผลิตไลซีนโดยวิธีการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันมากที่สุดในปัจจุบัน ขั้นตอนทั่วไปจะใช้เชื้อจุลินทรีย์มาทำการกลายพันธุ์ให้สามารถเพิ่มผลผลิตไลซีนได้สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ที่พบในธรรมชาติ และปรับสภาพแวดล้อมในกระบวนการหมักให้เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน ซึ่งไลซีนที่ได้จะอยู่ในรูป L-lysine (Yamada and others. 1972) ดังจะได้กล่าวในรายละเอียดในหัวข้อถัดไป ตั้งแต่ประวัติการผลิตไลซีนจากจุลินทรีย์ เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลซีนได้ กลไกการผลิตไลซีนจากจุลินทรีย์ การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้ผลิตไลซีนได้สูงขึ้น ตลอดจนปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไลซีนของจุลินทรีย์ ตามลำดับ

ประวัติการผลิตไลซีนจากจุลินทรีย์

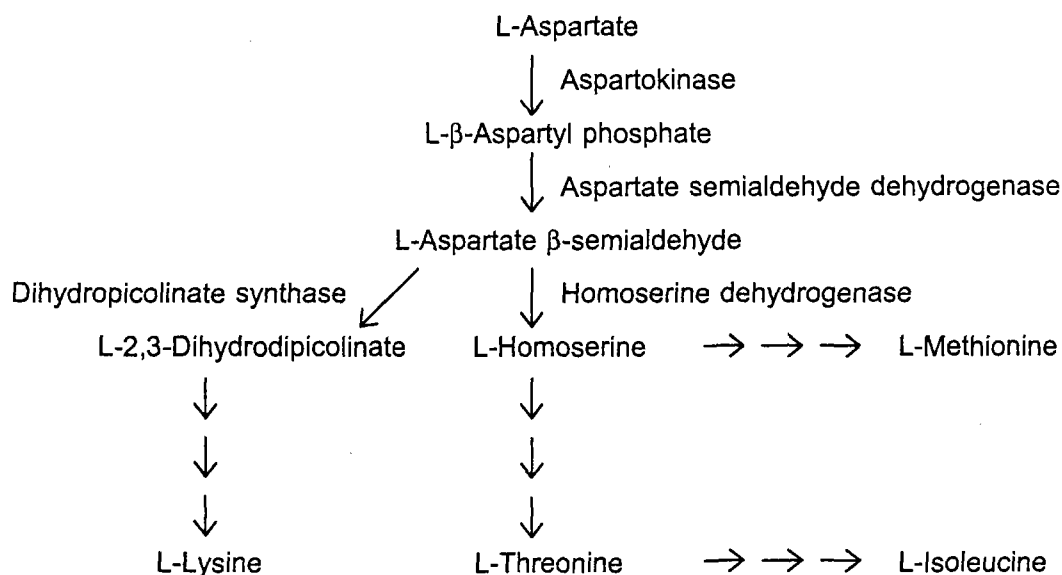
การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดอะมิโนจากจุลินทรีย์เริ่มมีมาตั้งแต่ปี 1950 Dagley and others ได้รายงานไว้ว่า *E. coli* สามารถผลิตและปล่อยกรดอะมิโนอะลานีน กรดกลูตามิก กรดแอสพาร์ติก และฮิสติดีน ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ปริมาณเล็กน้อย และถ้าเติมเกลือแอมโมเนียมปริมาณมากเกินพอลงในอาหารก็จะทำให้เชื้อผลิตกรดอะมิโนได้ปริมาณสูงขึ้น ต่อมา Kita ได้ทำการทดลองพบว่า *Cephalosporium* สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูเตนจากข้าวสาลี ถั่วเหลืองผง น้ำแช่ข้าวโพด ของเหลือจากการกลั่นแอลกอฮอล์ หรือยูเรียเป็นวัตถุดิบเริ่มต้น ในปริมาณสูงถึง 3.5 กรัมต่อลิตร และได้จดลิขสิทธิ์วิธีการผลิตกรดกลูตามิกโดยใช้เชื้อ *Cephalosporium* ไว้ตั้งแต่ปี 1957 ในช่วงเวลาเดียวกันนี้ Tada and Nakayama ก็ได้ค้นพบจุลินทรีย์ที่ผลิต α - ketoglutarate ได้ปริมาณสูง ซึ่งสามารถทำให้ผลิตกรดกลูตามิกได้ปริมาณสูงด้วยถึง 14.5 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการค้นพบที่เป็นพื้นฐานที่ทำให้เกิดอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโนโดยใช้กระบวนการหมักเป็นครั้งแรกได้แก่การวิจัยของ Kinoshita ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย *Micrococcus glutamicus* สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคาร์โบไฮเดรตและเกลือแอมโมเนียมเป็นส่วนประกอบ โดยให้ผลผลิตสูงมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคสที่เติมลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อ (Yamada and others. 1972)

ต่อมามีผู้สนใจศึกษาการผลิตไลซีนจากจุลินทรีย์กันอย่างกว้างขวาง และพบว่า มีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตไลซีนได้ เช่น *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *C. lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *B. lactofermentum*, *B. divaricatum*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. sphaericus*, *B. polymyxa*, *B. stearothermophilus*, *Comamonas testosteroni*, *Gordona bronchialis* (*Rhodococcus bronchialis*), *Rhodopseudomonas capsulatus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas putida*, *P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. acidovorans*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *S. bovis*, *Streptomyces coroniformis*, *S. clavulgerus*, *Torulopsis utilis*, *Ustilago maydis*, *Gliocladium* sp., *Arthrobacter globiformis*, *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น (Demain and Solomon. 1986 ; Hirose and Shibata. 1980 ; Kyriacou and others. 1997 ; Miller and Litsky. 1976 ; Peppler and Perlman. 1979 ; Prescott and Dunn. 1959 ; Samanta and Bhattacharyya. 1991 ; Yamada and others. 1972) แต่สายพันธุ์ที่พบในธรรมชาตินั้น ไม่สามารถผลิตไลซีนได้มากพอที่จะใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากมีกลไกการควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback control) จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไลซีนในอุตสาหกรรมปัจจุบันล้วนเป็นมิวแทนท์ทั้งสิ้น (Shvinka and others. 1980 ; Yamada and others. 1972)

กลไกการผลิตไลซีนจากจุลินทรีย์

การสังเคราะห์ไลซีนในแบคทีเรียโดยทั่วไปมีการสังเคราะห์ผ่านวิถี diaminopimelate ซึ่งเป็นวิถีที่มีการแตกแขนง (branched pathway) โดยมี L-aspartate เป็นสารตั้งต้น (precursor) ทำให้ได้กรดอะมิโน 4 ชนิดคือ ไลซีน เมทไธโอนีน ทรีโอนีน และไอโซลิวซีน ดังแสดงในภาพประกอบ 2 (Barrett. 1985 ; Cremer and others. 1991 ; Jetten and others. 1993)

การควบคุมการผลิตไลซีนในวิธีนี้ เป็นการควบคุมแบบย้อนกลับ โดยมีเอนไซม์หลักที่สำคัญ 2 ชนิดคือ aspartokinase เร่งปฏิกิริยาแรกในวิถี และ homoserine dehydrogenase เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน aspartate β -semialdehyde ไปเป็น homoserine ที่จุดแยกของวิถี (branched point)



ภาพประกอบ 2 การสังเคราะห์ไลซีนผ่านวิถี Diaminopimelate

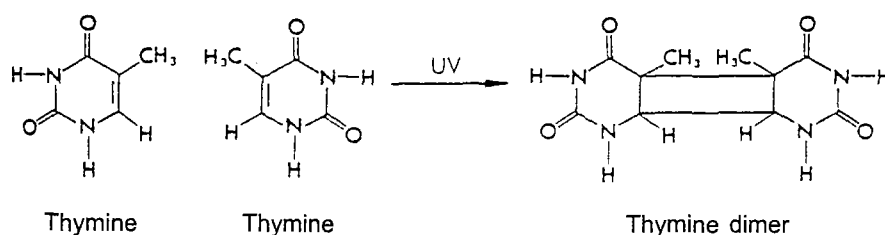
ใน *E. coli* มี aspartokinase 3 ชนิด และมี homoserine dehydrogenase 2 ชนิด ซึ่งมีการควบคุมกิจกรรมและการสังเคราะห์แตกต่างกันคือ aspartokinase I จะถูกควบคุมกิจกรรมโดย L-threonine และถูกยับยั้งการสังเคราะห์ได้โดย L-threonine + L-isoleucine ในขณะที่ aspartokinase II จะถูกยับยั้งการสังเคราะห์ได้โดย L-methionine และ aspartokinase III จะถูกยับยั้งกิจกรรมและการสังเคราะห์ได้โดย L-lysine สำหรับ homoserine dehydrogenase I จะถูกควบคุมกิจกรรมโดย L-threonine เช่นเดียวกับ aspartokinase I ส่วน homoserine dehydrogenase II จะถูกควบคุมการสังเคราะห์โดย L-methionine เช่นเดียวกับ aspartokinase II (Barrett. 1985)

ใน *Rhodopseudomonas capsulatus*, *Bacillus polymyxa*, *Brevibacterium flavum* และ *Corynebacterium glutamicum* มี aspartokinase เพียงชนิดเดียว และจะถูกยับยั้งการสังเคราะห์ได้เมื่อมี L-lysine และ L-threonine ในปริมาณมากเกินไปทั้งสองชนิด ในขณะที่ aspartokinase ใน *Brevibacterium lactofermentum*, *Bacillus brevis* และ *Pseudomonas putida* จะถูกยับยั้งการสังเคราะห์ได้ทั้งในสภาวะที่มี L-lysine หรือ L-threonine เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือในสภาวะที่มีกรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้อยู่ร่วมกันก็ได้ (Barrett. 1985 ; Cremer and others. 1991 ; Jetten and others. 1993)

การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีปริมาณการผลิตไลซีนที่สูงขึ้น

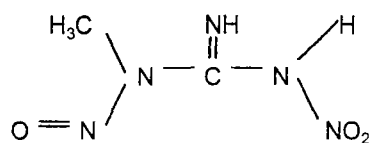
จุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติโดยทั่วไป จะให้ผลผลิตไลซีนปริมาณไม่สูงพอที่จะใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ แม้ว่าจะเลือกใช้อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์แล้วก็ตาม ซึ่งความสามารถสูงสุดในการผลิตจะถูกควบคุมโดยยีน ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นไปอีก จึงต้องปรับปรุงยีนให้มีการเปลี่ยนแปลงไป โดยวิธีการที่นิยมใช้ทั่วไปได้แก่ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี หรือ สารเคมี จากนั้นจึงคัดเลือกหาชนิดที่สร้างผลผลิตได้สูงขึ้น (Crueger and Crueger. 1984 ; Kinoshita and others. 1958 ; Stanbury and Whitaker. 1984)

รังสี UV มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 15-390 นาโนเมตร ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด รังสีนี้มีความสามารถในการทะลุทะลวงต่ำ จึงใช้ฆ่าจุลินทรีย์เฉพาะที่พื้นผิววัตถุเท่านั้น สำหรับความยาวคลื่นที่สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์แก่สิ่งมีชีวิตได้อยู่ในช่วง 200-300 นาโนเมตร โดยจะทำให้เกิดความเสียหายกับ ดีเอ็นเอ มีการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างอนุพันธ์ของเบสไพริมิดีนที่อยู่ติดกัน โดยเฉพาะระหว่างไทมีนในสายเดียวกันหรือสายตรงข้ามกันทำให้เกิดเป็นไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ดังภาพประกอบ 3 การเกิดไทมีนไดเมอร์ของดีเอ็นเอที่ได้รับรังสี UV ในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *E. coli* จะมีเอนไซม์ DNA polymerase I ทำหน้าที่กำจัดไทมีนไดเมอร์ แต่กระบวนการซ่อมแซม ดีเอ็นเอนั้นจะต้องอาศัยเอนไซม์ endonuclease ทำหน้าที่ตรวจหาไทมีนไดเมอร์ และตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ทางด้าน 5' ของเส้นที่มีไทมีนไดเมอร์ก่อน หลังจากนั้น DNA polymerase I ก็จะเข้าจับและสร้างเส้นใหม่ขึ้นจากปลาย 3' และใช้คุณสมบัติที่เป็น 5'→3' exonuclease ย่อย ดีเอ็นเอบริเวณที่มีไทมีนไดเมอร์ พร้อมสร้างดีเอ็นเอใหม่เข้ามาแทน แล้วเอนไซม์ DNA ligase จะเชื่อมปลาย 3' ของดีเอ็นเอชิ้นใหม่ และปลาย 5' ของดีเอ็นเอเดิมให้ต่อเป็นเส้นเดียวกัน ใน *E. coli* ที่ขาด DNA polymerase I หรือ DNA ligase จะไม่สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอได้ จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ (สุวณี สุภเวชย์ และคนอื่นๆ. 2540 ; Burns and Bottino. 1989 ; Hartl and Jones. 1998 ; Voet and Voet. 1990)

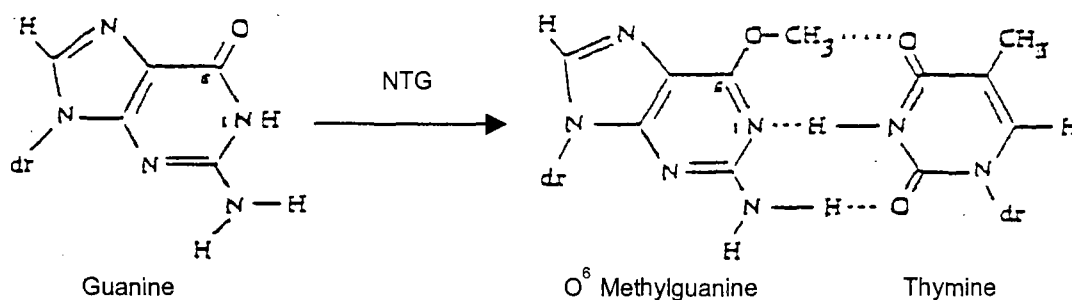


ภาพประกอบ 3 การเกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ในดีเอ็นเอโดยรังสี UV

สารเคมี NTG เป็นมิวตาเจน ในกลุ่ม แอลคิลเลตติ้ง เอเจนต์ (alkylating agents) สารนี้จะเติมหมู่แอลคิล (alkyl group) ที่อะตอมออกซิเจนของกัวนีน ได้เป็น O⁶-Methylguanine การเกิดอนุพันธ์แบบนี้ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เนื่องจากทำให้ความสามารถในการสร้างพันธะไฮโดรเจนของเบสในดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลง ผลคือจะเกิดการจับกับเบสคู่สมผิดไป Guanine (G) จับกับ Thymine (T) แทนที่จะเป็น Cytosine (C) ดังแสดงในภาพประกอบ 4 การซ่อมแซมในกรณีนี้ทั้งใน *E. coli* และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะอาศัยเอนไซม์ O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase ทำหน้าที่ย้ายหมู่แอลคิลจากดีเอ็นเอไปยังกรดอะมิโนซิสเทอีนของเอนไซม์นี้ มีผลทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อีก (สุวณี สุภเวทย์ และคนอื่นๆ. 2540 ; Burns and Bottino. 1989 ; Hartl and Jones. 1998 ; Voet and Voet. 1990)



NTG



ภาพประกอบ 4 โครงสร้าง NTG และการเติมหมู่แอลคิลที่อะตอมออกซิเจนของ Guanine ในดีเอ็นเอโดย NTG ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่สมผิดไป (G จับกับ T)

แม้ว่าการควบคุมกิจกรรม หรือการสังเคราะห์ของเอนไซม์ aspartokinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการผลิตไลซีนในจุลินทรีย์ต่างชนิดกันอาจมีความแตกต่างกันไปบ้าง แต่การคัดเลือกมิวแทนท์ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงโดยทั่วไปจะเลือกจากพวก homoserine auxotroph หรือ analogue resistance mutant (Demain and Solomon. 1985) เนื่องจากพวก homoserine auxotroph มีแนวโน้มที่จะให้ผลผลิตไลซีนได้สูงกว่า prototroph เพราะ L-aspartate β -semialdehyde ไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็น homoserine ดังนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาได้ทางเดียวคือเปลี่ยนไปเป็นไลซีน นอกจากนี้ยังทำให้ไม่สร้างเมทไธโอนีนและทรีโอนีน ซึ่งอาจเป็นตัวร่วมทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมหรือการสังเคราะห์เอนไซม์ aspartokinase อีกด้วย สำหรับ analogue resistance mutant นั้นจะสามารถสร้างไลซีนสูงขึ้นได้ในกรณีที่ความเป็นพิษของ analogue เกิดจากการที่ analogue สามารถควบคุมเอนไซม์ aspartokinase ได้เช่นเดียวกับผลผลิตขั้นสุดท้าย และตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในมิวแทนท์เป็นตำแหน่งที่ถูกควบคุมโดยผลผลิตขั้นสุดท้ายด้วยเช่นกัน (Stanbury and Whitaker. 1984)

ในปี 1958 Kinoshita and others รายงานว่าใช้รังสีอัลตราไวโอเลต และโคบอลท์ (Co^{60}) ในการชักนำให้ *Micrococcus glutamicus* เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้ได้ auxotroph หลายชนิด และในบรรดา auxotroph ที่ได้นี้ พบว่า homoserine auxotroph (*M. glutamicus* No. 613-1) และ methionine and threonine auxotroph (*M. glutamicus* No. 614-5) สามารถผลิตไลซีนออกมาได้ในปริมาณสูง

ในปี 1990 Schendel and others รายงานว่าได้ชักนำเชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งเป็น thermophilic methylotroph ทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ ethylmethane sulfonate (EMS) แล้วแยกหา homoserine auxotroph โดยใช้ replica plating technique จากนั้นนำ homoserine auxotroph ที่ได้ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำ และแยกมิวแทนท์ที่มีความต้านทานต่อ S-2-aminoethyl-L-cysteine (AEC) ซึ่งเป็น analogue ของไลซีน โดยเฉพาะเชื้อในอาหารที่มี AEC ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วนำมิวแทนท์ที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีนในอาหารเหลว คัดเลือกมิวแทนท์ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด แล้วนำไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำ จนกระทั่งไม่สามารถเพิ่มผลผลิตไลซีนได้อีก พบว่ามิวแทนท์ที่ได้สามารถผลิตไลซีนได้สูงถึง 7.8 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่เหมาะสม

ในปี 1991 Crociani and others รายงานว่าได้ชักนำเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ NTG แล้วแยกหามิวแทนท์ที่มีความต้านทานต่อ AEC (AEC^R) โดยใช้อาหารที่เติม AEC 0.1, 0.4, 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมทรีโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่าแยกได้ AEC^R ทั้งหมด 350 ไอโซเลท จากนั้นจึงนำไปแยกมิวแทนท์ที่สามารถผลิตไลซีนได้โดยใช้ replica plating technique แล้วเททับด้วย minimal agar ที่ผสม *Leuconostoc mesenteroides* P60 ซึ่งเป็น lysine auxotroph เลือก AEC^R ที่สร้างไลซีนได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีนในอาหารเหลว พบว่ามิวแทนท์ที่ให้ผลผลิต

ไลซีนสูงสุดคือ AEC12 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 4.5 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเมื่อนำ AEC12 ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำอีกโดยใช้ NTG ผสมกับเพนนิซิลิน แล้วแยกหา homoserine - auxotroph นำไปทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีนในอาหารเหลว พบว่ามีวุ้นที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดคือ AEC12 A5 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 7.5 กรัมต่อลิตร

ในปี 1991 Samanta and Bhattacharyya ได้กลายพันธุ์เชื้อ *Arthrobacter globiformis* ด้วย NTG แล้วคัดเลือก homoserine auxotroph ซึ่งเป็นเชื้อที่ให้ glutamate และปล่อย L-lysine ออกมาด้วย จากนั้นได้ทำการกลายพันธุ์ต่อ แล้วคัดเลือก AEC^R โดยเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ ด้วยสูตรอาหารของไวท์ (White's medium) ได้ L-lysine 36 กรัมต่อลิตร

ในปี 1992 Schrupf and others ได้รายงานที่ใช้ NTG ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* โดยใช้ NTG ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที แล้วแยกหา AEC^R บนอาหารที่เติม AEC และ threonine ความเข้มข้น 12 มิลลิโมล ได้ AEC^R 96 ไอโซเลท แต่มีเพียง 7 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตและปลดปล่อยไลซีนออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และมี 4 ไอโซเลท ที่ผลิตไลซีนได้สูงใกล้เคียงกันประมาณ 35 มิลลิโมล (6.39 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ MH20 ซึ่งผลิตไลซีนสูงและเจริญได้ดี ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำอีก แล้วแยกหา auxotroph ที่ต้องการลิซีน หรือไอโซลิซีน หรือเมทไธโอนีน ได้ประมาณ 50 ไอโซเลท และในจำนวนมีวุ้นที่ที่ได้ทั้งหมดนี้ พบว่าสายพันธุ์ MH20-22B ซึ่งเป็น leucine auxotroph สามารถผลิตไลซีนได้มากเกือบสองเท่าของ MH20 คือ 55 มิลลิโมล (10.05 กรัมต่อลิตร)

ในปี 1994 Ohsumi and others รายงานว่าได้ใช้รังสี UV ในการกระตุ้นเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้ผลิตไลซีนได้สูงขึ้น โดยกระจายเชื้อ 10⁸ เซลล์ ลงบนอาหารที่มี AEC เป็นส่วนผสมอยู่ด้วย 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปฉายรังสี UV โดยใช้หลอด UV ที่มีความยาวคลื่น 253 นาโนเมตร วางห่างจากจานเพาะเชื้อ 35 เซนติเมตร ผลปรากฏว่าได้ AEC^R ทั้งหมด 190 ไอโซเลท แต่ที่สามารถผลิตไลซีนสะสมภายในเซลล์ได้มี 48 ไอโซเลท และมีวุ้นที่ผลิตไลซีนอิสระสะสมภายในเซลล์ได้สูงสุดคือ LA-1 ซึ่งสามารถผลิตได้สูงถึง 4 เปอร์เซ็นต์ (40 กรัมต่อลิตร)

ปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการผลิตไลซีนของเชื้อจุลินทรีย์

แหล่งคาร์บอน วัตถุประสงค์ที่มีรายงานว่าใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไลซีนได้ผลดี มีหลายชนิด เช่น กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส (Crueger and Crueger. 1984 ; Kinoshita and others. 1958) อย่างไรก็ตามในอุตสาหกรรมนิยมใช้ในรูปแบบของ starch hydrolysate หรือ cane molasses (Yamada and others. 1972)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีการใช้กรดอะซิติก แอมโมเนียมอะซิเตท เมทานอล และเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไลซีนได้ผลดีอีกด้วย เมื่อใช้ชนิดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันไป (Motoyama and others. 1993 ; Schendel and others. 1990 ; Shvinka and others. 1980)

แหล่งไนโตรเจน โดยทั่วไปนิยมใช้แก๊สแอมโมเนีย และเกลือแอมโมเนียม หรือยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนในกรณีที่จุลินทรีย์สามารถเมแทบอลิซึมยูเรียไปเป็นแอมโมเนียได้ (Stanbury and Whitaker. 1984)

เกลือแอมโมเนียมที่มีรายงานว่าได้ผลดีในการผลิตไลซีน ได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NH_4Cl (Crociani and others. 1991 ; Kinoshita and others. 1958 ; Motoyama and others. 1993 ; Schendel and others. 1990 ; Schrumpf and others. 1992) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า การเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นสูงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* CII19 มีผลทำให้เชื้อผลิต ornithine แทนที่จะผลิตไลซีน (Chatterjee and White. 1982)

นอกจากแหล่งไนโตรเจนที่กล่าวมาแล้วก็ยังมีสารอื่นๆ อีก เช่น แอมโมเนียมอะซิเตท ซึ่งนอกจากจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนแล้วยังใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ด้วย และสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีรายงานว่าใช้ในการผลิตไลซีน ได้แก่ yeast extract, meat extract, peptone, polypeptone, NZ-amine (casein hydrolysate), soybean meal hydrolysate, corn steep liquor (Crueger and Crueger. 1984 ; Kinoshita and others. 1958 ; Motoyama and others. 1993 ; Shiiro and others. 1990)

เกลือแร่ โดยทั่วไปมักมีการเติม KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , MnSO_4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Coello and others. 1992 ; Hollander. 1994 ; Kinoshita. 1985 ; Tosaka and others. 1983 ; Yamada and others. 1972) นอกจากนี้ก็ยังมีรายงานว่า มีการใช้เกลือแร่ชนิดอื่นๆ อีกด้วย เช่น KCl , MgCl_2 , CaCl_2 , MnCl_2 , H_3BO_3 , CuSO_4 , Na_2MoO_4 , CoNO_3 , NaH_2PO_4 , CoCl_2 (Crociani and others. 1991 ; Schendel and others. 1990)

วิตามิน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตไลซีนโดยทั่วไปจะมีการเติมไบโอตินลงไป ด้วย ยกเว้นในกรณีที่ใช้กากน้ำตาลอ้อยไม่จำเป็นต้องเติมไบโอติน แต่ถ้าใช้กากน้ำตาลจาก หัวบีท จะต้องเติมไบโอตินอย่างน้อย 30 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่ก็มีรายงานว่า *Corynebacterium glutamicum* (homoserine auxotroph) จะผลิตแลคเตทและซัคซิเนทแทนที่จะผลิตไลซีน ในสภาวะที่มีไบโอตินความเข้มข้นสูงมากเกินไป และถ้าใช้ไบโอตินความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อ ลิตรร่วมกับกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของ auxotroph ความเข้มข้นสูง ๆ จะทำให้เชื้อผลิต แลคเตทขึ้นแทนที่ไลซีน โดยทรีโอนีนและโฮโมซีรีนจะมีผลมากกว่าเมทไธโอนีนและไอโซลิวซีน (Jetten and others. 1993 ; Yamada and others. 1972)

อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า การเติมไบโอตินปริมาณ 200-500 ไมโครกรัมต่อลิตร จะ ทำให้ *Brevibacterium lactofermentum* AJ 3991 ผลิตไลซีนได้สูงขึ้น (Tosaka and others. 1983)

สำหรับวิตามินชนิดอื่นๆ ที่ใช้เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลซีน ได้แก่ ไทอะมีน นิโคตินาไมด์ แคลเซียมแพนโทธีเนท ไรโบฟลาวิน กรดโฟลิก และไซยาโนโคบาลามิน (Crociani and others. 1991 ; Motoyama and others. 1993 ; Schendel and others. 1990 ; Schrumpf and others. 1992)

กรดอะมิโน เนื่องจากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติส่วนใหญ่ จะสร้างไลซีนได้ใน ปริมาณค่อนข้างน้อยเกินไปที่จะใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าผลิต ไลซีนได้สูงในปัจจุบันได้มาจากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีต่าง ๆ และคุณสมบัติที่สำคัญของ จุลินทรีย์พวกนี้ก็คือ เป็นพวก auxotroph ที่มีความต้องการกรดอะมิโนบางชนิดในการเจริญ ดังนั้นการที่จะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์พวกนี้ให้ผลิตไลซีนได้สูงจึงต้องเติมกรดอะมิโนที่เชื่อต้องการ ลงไปด้วยในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปได้แก่ โฮโมซีรีน หรือ ทรีโอนีนร่วมกับเมทไธโอนีน และ auxotroph บางชนิดอาจมีความต้องการลิวซีน ไอโซลิวซีน อะลานีน หรือ เฟนิลอะลานีน เพื่อการเจริญอีกด้วย (Shiio and others. 1990 ; Schrumpf and others. 1992 ; Tosaka and others. 1983)

ตามปกติแล้ว homoserine auxotroph จะผลิตไลซีนได้ดีในอาหารที่มีทรีโอนีนหรือ โฮโมซีรีนปริมาณจำกัดและมีไบโอตินในระดับปานกลาง แต่ในสภาวะที่มีทั้งทรีโอนีนหรือ โฮโมซีรีนและไบโอตินในปริมาณจำกัด จุลินทรีย์จะผลิตทั้งไลซีนและกรดกลูตามิกควบคู่กัน ใน ปริมาณลดลง การเติมทรีโอนีนหรือโฮโมซีรีนความเข้มข้นสูงและไบโอตินปริมาณเล็กน้อยจะ ส่งเสริมการผลิตกรดกลูตามิก และโดยทั่วไปการเติมกลูตาเมทหรือกลูตามีนปริมาณเล็กน้อยลง ในอาหารจะช่วยส่งเสริมการผลิตไลซีน ซีสเทอีนจะยับยั้งการผลิตไลซีนได้เล็กน้อย แต่ในอาหาร ที่มีทรีโอนีนและโฮโมซีรีนความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ จะยับยั้งการสร้างไลซีนได้อย่างสมบูรณ์ (Tosaka and others. 1983 ; Yamada and others. 1972)

สภาพความเป็นกรดต่าง ตามปกติแล้วใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ pH เริ่มต้น 7-7.5 และปรับ pH ในระหว่างการหมักให้อยู่ในช่วง pH ที่เป็นกลาง โดยเติมสารละลายแอมโมเนียมหรือยูเรีย หรือใช้ CaCO_3 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Yamada and others. 1972)

อุณหภูมิ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไลซีนส่วนใหญ่สามารถเจริญและผลิตไลซีนได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 28-33 องศาเซลเซียส (Tosaka and others. 1983 ; Yamada and others. 1972) แต่ก็มีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถผลิตไลซีนได้ที่อุณหภูมิสูงๆ เช่น *Bacillus* sp. (Hom^- , AEC^R) ผลิตไลซีนได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Schendel and others. 1990) และ *Bacillus stearothermophilus* (Hom^- , AEC^R) ผลิตไลซีนได้ดีที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นต้น (Crociani and others. 1991)

การให้อากาศ การสังเคราะห์ไลซีนเป็นกระบวนการที่ต้องการออกซิเจน ดังนั้นการให้อากาศจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากในกระบวนการหมักไลซีน ถ้าให้ออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอจุลินทรีย์จะผลิตไลซีนปริมาณสูง แต่ถ้าให้ออกซิเจนปริมาณไม่เพียงพอจุลินทรีย์จะเกิดการสะสมกรดแลคติกแทน (Demain and Solomon. 1985 ; Hirose and Shibata. 1980 ; Peppler and Perlman. 1979 ; Shvinka and others. 1980)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. หม้อแรงดันความดันฆ่าเชื้อ (autoclave ; IWAKI Model ACV-3167)
2. ตู้ปลอดเชื้อชนิดเป่าลมตามแนวราบ (laminar air flow ; BIOHAZARD/Class II Type A/B3, NUAIRE Model No. NU-425-400E)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง (table top centrifuge ; IEC Centra-HN)
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer ; UV-1601 Shimadzu with Program UVPC)
5. เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำพร้อมตัวเลื่อนเขย่า (water bath shaker ; NEW BRUNSWICK Model G76D)
6. ตู้อบ (hot air oven ; MEMMERT)
7. ตู้เย็น
8. หลอด UV
9. โหลแก้วพร้อมฝาปิด (glass chamber)
10. ถาดแก้ว สำหรับซึบสารนินไฮดริน (ninhydrin)
11. เครื่องเป่าแห้ง (dryer)
12. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter ; ORION Model SA720)
13. กล้องจุลทรรศน์ - กล้องถ่ายรูป
14. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
15. เครื่องผสมสารละลายพร้อมควบคุมอุณหภูมิ (hot plate stirrer)
16. เครื่องดูดสารละลาย (automatic pipette)
17. ตู้ดูดควัน (hood)
18. กระดาษโครมาโตกราฟี (paper chromatography ; Whatman No.1)
19. ถุงมือ
20. เครื่องแก้ว ได้แก่ flask, volumetric flask, beaker, tube, screw cap tube, plate, pipette, cylinder, slide และอื่น ๆ

21. สารเคมี สารอาหาร และน้ำยาฆ่าเชื้อ ได้แก่ K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl , $NaCl$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CaCO_3$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 3,5-dinitrosalicylic acid, NTG, L-lysine HCl, L-methionine, L-threonine, glucose, beef extract, peptone, yeast extract, casein hydrolysate, biotin, thiamine-HCl, agar, n-butanol, acetic acid, ninhydrin, acetone, absolute ethanol, normal saline (0.9 % NaCl), 70 % alcohol และ lysol

22. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดินและการแยกแบคทีเรียจากดิน

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน เลือกเก็บเฉพาะดินที่อยู่บริเวณผิวหน้าลึกไม่เกิน 10 เซนติเมตร ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง จากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้คือ

1.1.1 บริเวณศูนย์เพาะชำกล้าไม้ หมู่บ้านโคกโหนด ตำบลป่าพะยอม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง

1.1.2 บริเวณหมู่บ้านไสกุณ ตำบลป่าพะยอม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง

1.1.3 บริเวณหมู่บ้านไม้เสียบ ตำบลเกาะขันธุ์ อำเภอยะรัง จังหวัดนครศรีธรรมราช

1.2 การแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะมิโนได้จากดิน

1.2.1 นำดินตัวอย่างมาทำซัสเพนชันให้มีความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} และ 10^{-2}

1.2.2 นำซัสเพนชัน จากข้อ 1.2.1 มา 0.1 มิลลิลิตร กระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium (MM ; ภาคผนวก ก ข้อ 1) ทำ 2 ซ้ำ

1.2.3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง

1.2.4 เลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะต่าง ๆ กัน แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บบน nutrient agar slant (NA slant ; ภาคผนวก ก ข้อ 3)

1.2.5 ศึกษาลักษณะของเชื้อ โดยย้อมสีแกรม ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลซีนได้

2.1 เตรียม inoculum medium (IM ; ภาคผนวก ก ข้อ 4) ฟลาสก์ละ 20 มิลลิลิตร บรรจุลงใน ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร และ production medium (PM ; ภาคผนวก ก ข้อ 5) ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร บรรจุลงใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.2 นำเชื้อบริสุทธิ์มา 1 ลูบ ใส่ลงใน IM เพื่อเพิ่มจำนวน โดยนำไปวางบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 ดูดเชื้อที่เพิ่มจำนวนใน IM มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน PM ที่เตรียมไว้ นำไปวางบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

2.4 เก็บตัวอย่างจาก PM ส่วนหนึ่งนำไปหมักเหียงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ($2,025 \times g$) เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณไลซีน โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ เปรียบเทียบกับไลซีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

3. การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียโดยรังสี UV และสารเคมี NTG

3.1 การกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV

3.1.1 นำเชื้อที่ผลิตไลซีนได้สูงสุดจากข้อ 2 (อายุ 18-24 ชั่วโมง) เจือจางให้เป็น 10^{-4} ด้วย 0.9 % NaCl

3.1.2 ปิเปตเชื้อที่เจือจางแล้วจากข้อ 3.1.1 ใส่ในจานเพาะเชื้อขนาด 5 เซนติเมตร จานละ 1 มิลลิลิตร วางไว้บน stirrer และฉายรังสี UV ขนาด 15 วัตต์ โดยวางเหนือจานเพาะเชื้อ 10 นิ้ว ที่เวลาต่างๆ กัน คือ 0, 1, 3, 5 และ 10 นาที (ทำ 2 ซ้ำ) เมื่อครบเวลานำเชื้อไปเก็บในที่มืด

3.1.3 นำเชื้อที่ฉายรังสี UV แล้ว 0.1 มิลลิลิตร ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร NA บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.1.4 เลือกเก็บเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ มาทดสอบหา methionine + threonine auxotroph (Met+Thr auxotroph) โดยใช้ replica plating technique เชื้อเชื้อที่ต้องการทดสอบด้วยเข็มเชื้อปลายแหลมมาแตะลงบน MM, MM+Met, MM+Thr และ MM+Met+Thr โดยทำหมายเลขให้ตรงกัน และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (วิธีเตรียมอาหาร ในภาคผนวก ก ข้อ 2)

3.1.5 เก็บเชื้อ Met และ Thr auxotroph ลงบน NA slant โดยเลือกเก็บเฉพาะเชื้อที่เจริญบนอาหาร MM+Met หรือ MM+Thr หรือ MM+Met+Thr แต่ไม่เจริญบน MM

3.1.6 นำ auxotroph มาเลี้ยงใน IM และ PM แล้ววิเคราะห์หาปริมาณไลซีน จากนั้นใช้ auxotroph ที่ให้ผลผลิตดีที่สุดไปทำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ต่อไป

3.2 การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

3.2.1 นำเชื้อที่เป็น auxotroph ซึ่งผ่านการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดมาทำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG โดยนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ใน NA slant 24 ชั่วโมง มา 1 ลูบ เลี้ยงใน IM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย NTG ที่มีความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer ให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

3.2.2 นำเชื้อจากข้อ 3.2.1 มาล้างเซลล์ 2 ครั้ง โดยการเติม 0.9 % NaCl ลงไป ครั้งละ 4 มิลลิลิตร และหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

3.2.3 นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.2.2 มาเจือจางให้ได้ความเจือจางเท่ากับ 10^{-2} แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MM+Met+Thr+AEC ที่ความเข้มข้น 0.1 % บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร NA slant

3.2.4 นำเชื้อที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี AEC มาเลี้ยงใน IM และ PM แล้ววิเคราะห์หาปริมาณไลซีน เลือกเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงที่สุดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4. การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของมิวแทนท์ที่คัดเลือกได้

โดยการเลี้ยงเชื้อใน PM บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วแปรผันส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

4.1 ปริมาณของแหล่งคาร์บอน ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้น ดังนี้คือ 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 % (W/V) และวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่เหลือด้วยวิธี DNS ; Bernfeld. 1955 (ภาคผนวก ค) เลือกความเข้มข้นที่ดีที่สุดไปใช้ต่อไป

4.2 ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในโตรเจน ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, และ 4 % (W/V) เลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่ดีที่สุดไปใช้ต่อไป

4.3 ชนิดและปริมาณสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน

4.3.1 ใช้ tryptone (pancreatic digest of casein) ที่ความเข้มข้น 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0% (W/V) ความเข้มข้นที่ดีที่สุดไปใช้ต่อไป

4.3.2 ใช้ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 % (W/V) เลือกความเข้มข้นที่ดีที่สุดไปใช้ต่อไป

4.4 ชนิดและปริมาณเกลือแร่ แปรผันปริมาณเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ดังนี้

4.4.1 ใช้ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 % (W/V)

4.4.2 ใช้ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 % (W/V)

4.4.3 ใช้ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.025, 0.05, 0.10 และ 0.20 % (W/V)

4.4.4 ใช้ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.001, 0.005, 0.01 และ 0.05 % (W/V)

4.4.5 ใช้ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01, 0.02 และ 0.04 % (W/V) เลือกความเข้มข้นที่ดีที่สุดของเกลือแร่แต่ละชนิดตามลำดับไปใช้ต่อไป

4.5 ชนิดและปริมาณวิตามิน แปรผันปริมาณของ biotin และ thaimine-HCl ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0, 100, 250, 500, 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร เลือกความเข้มข้นที่ดีที่สุดไปใช้ต่อไป

4.6 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน แปรผันปริมาณของ L-methionine และ L-threonine ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 % (W/V) เลือกความเข้มข้นที่ดีที่สุดไปใช้ต่อไป

5. การศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ที่คัดเลือกได้

โดยการเลี้ยงเชื้อใน PM เป็นเวลา 3 วัน และแปรผันปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

5.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) แปรผันปริมาณ CaCO_3 ที่ความเข้มข้น 0, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1.0 % (W/V) เลือกความเข้มข้นที่ดีที่สุดไปใช้ต่อไป

5.2 อุณหภูมิ โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27, 30, 33 และ 36 องศาเซลเซียส เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดไปใช้ต่อไป

5.3 การให้อากาศ โดยปรับความเร็วรอบของเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เลือกความเร็วรอบที่เหมาะสมที่สุดไปใช้ต่อไป

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดินและการแยกแบคทีเรียจากดิน

ผลการแยกแบคทีเรียจากดิน จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยเลือกเก็บแบคทีเรียที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่มีลักษณะแตกต่างกันในอาหาร MM ได้แบคทีเรียทั้งหมด 93 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอะมิโน พบว่าได้แบคทีเรียที่ผลิตกรดอะมิโนที่มีค่า R_f เท่ากับ R_f ของไลซีนมาตรฐาน 30 ไอโซเลท ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แหล่งที่เก็บตัวอย่างดินและลักษณะแบคทีเรียที่แยกได้

แหล่งที่เก็บตัวอย่างดิน	ลักษณะดิน	รหัสเชื้อ	ลักษณะและการติดสีแกรม	
บริเวณศูนย์เพาะชำกล้าไม้ หมู่บ้านโคกหนอง ต. ป่าพะยอม อ. ป่าพะยอม จ. พัทลุง		P		
1. ใต้ต้นพะยอมในแปลงสาธิต	ดินสีเทา ความชื้นปานกลาง	P1	Short rod	gram +
2. ข้างตึกสำนักงานศูนย์ฯ	ดินสีเทา-ดำ ความชื้นปานกลาง	P2	rod	gram +
3. ขอบร่องน้ำแปลงไม้ประดับ ทางมุ้งกันแสง	ดินสีน้ำตาล ความชื้นสูง	P3	rod	gram +
4. ริมสระน้ำ	ดินสีเทา-ดำ ความชื้นสูง	P4	Coccus	gram +
5. ในโรงเรือนเพาะชำ	ดินสีเทา ร่วนปนทราย	P5	Diplococcus	gram +
6. ร่องน้ำของแปลงไม้ยืนต้นกลางแจ้ง	ดินสีเทา-ดำ ความชื้นสูง	P6	Coccus	gram +
7. ดินผสม (ดินเขาปุ๋ย + ขี้เลื่อย) เตียมลงถุงเพาะชำกล้าไม้ยืนต้น	ดินสีน้ำตาลแดง(สีอิฐ) ร่วน ความชื้นต่ำ	P7	Short rod	gram +
8. ข้างถนนทางเข้า-ออกศูนย์ฯ	ดินสีเทาจาง ความชื้นปานกลาง	P8	Short rod	gram +
9. บริเวณสนามหญ้า	ดินสีเทา ความชื้นปานกลาง	P9	Short rod	gram -
10. บริเวณต้นบอน	ดินสีเทา ความชื้นปานกลาง	P10	Short rod	gram +
11. ใต้ต้นไม้ปาล์ม	ดินสีเทา-ดำ ร่วน, ความชื้นปานกลาง	P11	Coccus	gram +
12. ในคูน้ำด้านทิศเหนือของศูนย์ฯ	ดินสีเทา ความชื้นปานสูง(แฉะ)	P12	rod	gram +
13. ดินเชิงปลวก	ดินสีเทา จาง ความชื้นต่ำ	P13	Coccus	gram +

ตาราง 1 (ต่อ)

แหล่งที่เก็บตัวอย่างดิน	ลักษณะดิน	รหัสเชื้อ	ลักษณะและการติดสีแกรม	
บริเวณหมู่บ้านไสกุณ ด. ป่าพะยอม อ. ป่าพะยอม จ. พัทลุง		SK		
14. ใต้ต้นตะแบก ในสวนป่า ร.ร. บ้านไสกุณ	ดินสีเทา ความชื้นปานกลาง	SK1	Coccus	gram +
15. ในนาข้าว	ดินสีเทา ความชื้นสูง	SK2	rod	gram +
16. ขอบคันนา	ดินสีเทาจาก เหนียวปานกลาง ความชื้นปานกลาง	SK3	rod	gram +
17. ใต้ต้นมะขาม	ดินสีเทา ร่วน, ความชื้นต่ำ	SK4	Short rod	gram -
18. ขอบบ่อดินเลี้ยงปลาตุ๊ก	ดินสีเทาจาก ความชื้นสูง	SK5	rod	gram +
19. ในสวนยางพารา	ดินสีเทา ความชื้นปานกลาง	SK6	rod	gram +
20. ใต้ต้นเงาะ	ดินสีเทา , ร่วน ความชื้นปานกลาง	SK7	rod	gram +
บริเวณหมู่บ้านไม้เสียบ ด. เกาะขันธุ์ อ. ชะอวด จ. นครศรีธรรมราช		N		
21. ใต้ต้นขี้เหล็ก ในบริเวณ ร.ร. เกาะขันธุ์	ดินสีเทา ร่วน, ความชื้นต่ำ	N1	rod	gram +
22. ใต้ต้นहुกวาง ในบริเวณ ร.ร. เกาะขันธุ์	ดินสีเทาปนสีอิฐ ร่วน, ความชื้นปานกลาง	N2	Short rod	gram -
23. สนามฟุตบอล ร.ร. เกาะขันธุ์	ดินสีเทา ความชื้นปานกลาง	N3	rod	gram +
24. ในสวนทุเรียน	ดินสีเทา-ดำ ร่วน, ความชื้นปานกลาง	N4	rod	gram +
25. ริมคลองห้วยกรวด	ดินสีเทาดำ ความชื้นสูง	N5	Coccus	gram +
26. ริมคลองไม้เสียบ	ดินสีเทาจาก ความชื้นสูง	N6	rod	gram +
27. ขอบสระบัว	ดินสีเทาดำ ความชื้นสูง	N7	rod	gram +
28. ในสวนส้ม	ดินสีเทาดำ ความชื้นสูง	N8	Coccus	gram +
29. ข้างถนนทางไปวัดไม้เสียบ	ดินสีเทาจาก ความชื้นปานกลาง	N9	rod	gram +
30. ในนาใกล้โรงอิฐ	ดินสีเทา ความชื้นปานกลาง	N10	rod	gram +

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลซีนได้

ผลการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน ซึ่งผ่านการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอะมิโนมาแล้วจำนวน 30 ไอโซเลท ในอาหาร PM บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และนำมาวิเคราะห์หาไลซีน โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ เปรียบเทียบกับไลซีนมาตรฐาน พบว่ามี 5 ไอโซเลท ที่ผลิตไลซีนได้มากกว่าไอโซเลทอื่น ๆ และเมื่อวัดปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ พบว่าผลิตไลซีนได้ในช่วง 0.38-0.70 กรัมต่อลิตร (ในอาหาร PM ที่มีกลูโคส 10%) ดังตาราง 2

ตาราง 2 ปริมาณการผลิตไลซีนของแบคทีเรียที่แยกได้

รหัสแบคทีเรีย	ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)
P3	0.38
P7	0.54
P10	0.46
SK2	0.70
SK3	0.58

จะเห็นได้ว่าแบคทีเรีย รหัส SK2 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบทั้งหมด จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาพบว่าแบคทีเรีย SK2 มีลักษณะโคโลนีสีขาว ติดสีย้อมแกรมบวก เซลล์เป็นรูปท่อน มีการสร้างเอนโดสปอร์ได้ จัดอยู่ในจีนัส *Bacillus* ดังภาพประกอบ 5 ดังนั้นจึงเลือกใช้แบคทีเรีย รหัส SK2 ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพประกอบ 5 การติดสีย้อมแกรมและลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย SK2 (330X)

3. การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย โดยรังสี UV และสารเคมี NTG

3.1 การกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV

ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้เวลาในการผ่านรังสี UV นานขึ้น จำนวนโคโลนีและอัตราการอยู่รอดของเชื้อลดลงตามลำดับ และเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ คือ 3 นาที ซึ่งทำให้มีอัตราการอยู่รอดในช่วง 0.15-0.75 % ดังตาราง 3

ตาราง 3 จำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญได้และอัตราการอยู่รอดหลังการผ่านรังสี UV ที่เวลาต่างๆ

เวลาที่ผ่านรังสี UV (นาที)	จำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญได้ (CFU/ml)	อัตราการอยู่รอด (%)
0	2×10^7	100
1	1.6×10^7	80
3	3×10^4 - 1.5×10^5	0.15-0.75
5	0	0
10	0	0

เมื่อนำเชื้อที่ได้จากการผ่านรังสี UV 3 นาที มาทดสอบหา Met+Thr auxotroph แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีน คัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตไลซีนได้สูงสุดไปผ่านรังสี UV ซ้ำ โดยใช้เชื้อที่สร้างไลซีนได้สูงสุดของแต่ละครั้งไปผ่านรังสี UV ในครั้งถัดไป ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียรหัส SK2M5 ซึ่งเป็น Met+Thr auxotroph ที่ได้จากการผ่านรังสี UV ครั้งที่ 5 ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด 1.08 กรัมต่อลิตร (ในอาหาร PM ที่มีกลูโคส 10%) ดังตาราง 4 และเมื่อนำแบคทีเรีย SK2M5 ไปผ่านรังสี UV ซ้ำอีกหลายครั้งก็ไม่พบไอโซเลทที่ให้ผลผลิตไลซีนที่สูงขึ้นได้อีก จึงนำแบคทีเรีย SK2M5 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตาราง 4 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จาก Met+Thr auxotroph ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV

รหัสเชื้อที่กลายพันธุ์	ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)
SK2 (เริ่มต้น)	0.70
SK2M1	0.72
SK2M2	0.74
SK2M3	0.75
SK2M4	0.94
SK2M5	1.08

หมายเหตุ

- M = มิวแทนท์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV
- ตัวเลขถัดจาก M ; จำนวนครั้งที่ให้รังสี UV
- นำไอโซเลทที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากแต่ละครั้งของการผ่านรังสี UV ไปผ่านรังสี UV ครั้งถัดไป
- แสดงผลเฉพาะไอโซเลทที่ให้ค่าไลซีนสูงสุดของการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV ของแต่ละครั้ง ซึ่งได้คัดเลือก auxotroph ครั้งละ 20 ไอโซเลท
- เลี้ยงเชื้อใน PM (กลูโคส 10%) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

3.2 การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

ผลจากการเลือกใช้แบคทีเรีย SK2M5 มาทำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทดสอบหา AEC^R แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีน คัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตไลซีนได้สูงสุดไปผ่าน NTG ซ้ำ โดยใช้เชื้อที่สร้างไลซีนได้สูงสุดของการผ่าน NTG แต่ละครั้งไปผ่าน NTG ในครั้งถัดไป ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียรหัส SK2M5N4 ซึ่งเป็น AEC^R ที่ได้จากการผ่าน NTG ครั้งที่ 4 ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด 1.56 กรัมต่อลิตร (ในอาหาร PM ที่มีกลูโคส 10%) ดังตาราง 5 และเมื่อนำแบคทีเรีย SK2M5N4 ไปผ่าน NTG ซ้ำอีกหลายครั้งก็ไม่พบไอโซเลทที่ให้ผลผลิตไลซีนที่สูงขึ้นได้อีก จึงนำแบคทีเรีย SK2M5N4 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตาราง 5 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จาก AEC^R ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG

รหัสเชื้อที่กลายพันธุ์	ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)
SK2M5 (เริ่มต้น)	1.08
SK2M5N1	1.30
SK2M5N2	1.38
SK2M5N3	1.41
SK2M5N4	1.56

หมายเหตุ

- N = มิวแทนท์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG
- ตัวเลขถัดจาก N ; จำนวนครั้งที่ให้ สารเคมี NTG
- นำไอโซเลทที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากแต่ละครั้งแรกของการผ่าน NTG ไปผ่าน NTG ครั้งถัดไป

- แสดงผลเฉพาะไอโซเลทที่ให้ค่าไลซีนสูงสุดของการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ของแต่ละครั้ง ซึ่งได้คัดเลือก AEC^R ครั้งละ 20 ไอโซเลท

- เลี้ยงเชื้อใน PM (กลูโคส 10%) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

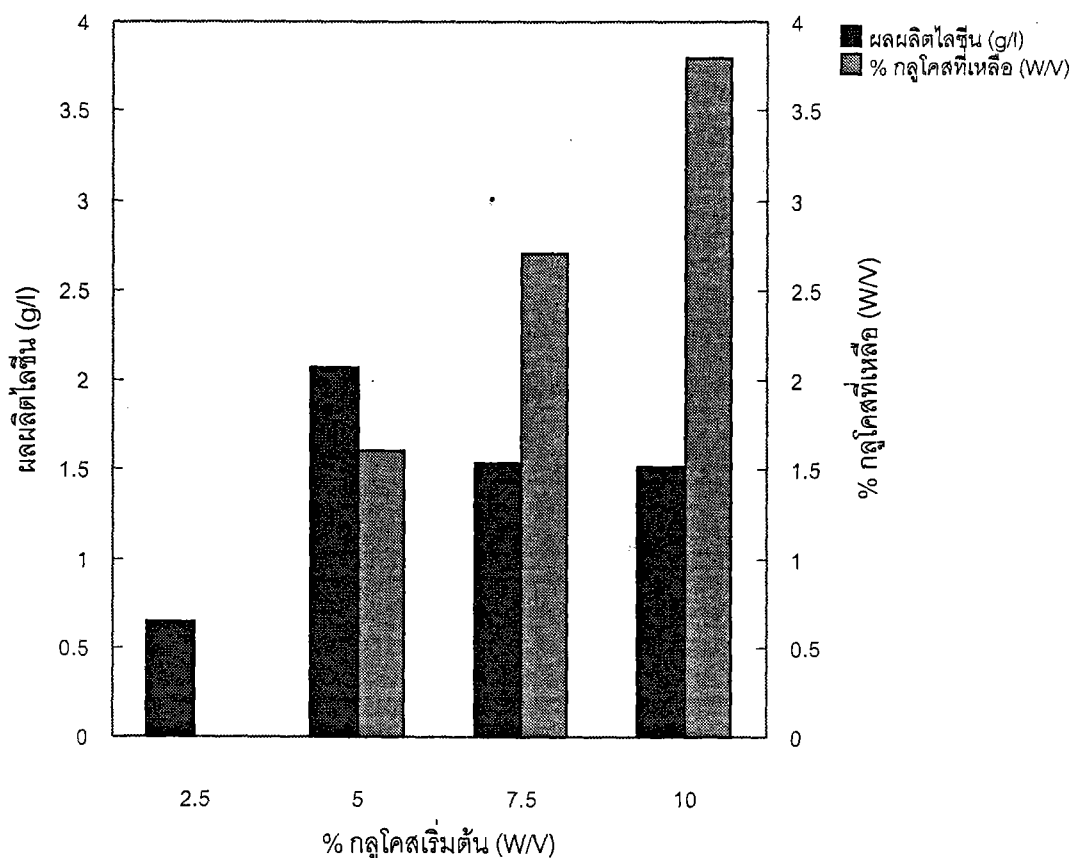
4. การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

4.1 ปริมาณของแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยงแบคทีเรีย รหัส SK2M5N4 ใน PM ที่แปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอนโดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 2.5-10 % (W/V) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้ววิเคราะห์หาปริมาณไลซีน และปริมาณกลูโคสที่เหลือได้ผลดังตาราง 6 และภาพประกอบ 6 และพบว่าปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ผลผลิตไลซีนสูงที่สุด คือ 5.0 % (W/V) จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของกลูโคสดังกล่าวในการทดลองต่อไป

ตาราง 6 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย SK2M5N4 และปริมาณกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อใน PM ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ

% กลูโคสเริ่มต้น (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)	% กลูโคสที่เหลือ (W/V)
2.5	0.64	0
5	2.07	1.6
7.5	1.54	2.7
10	1.51	3.8



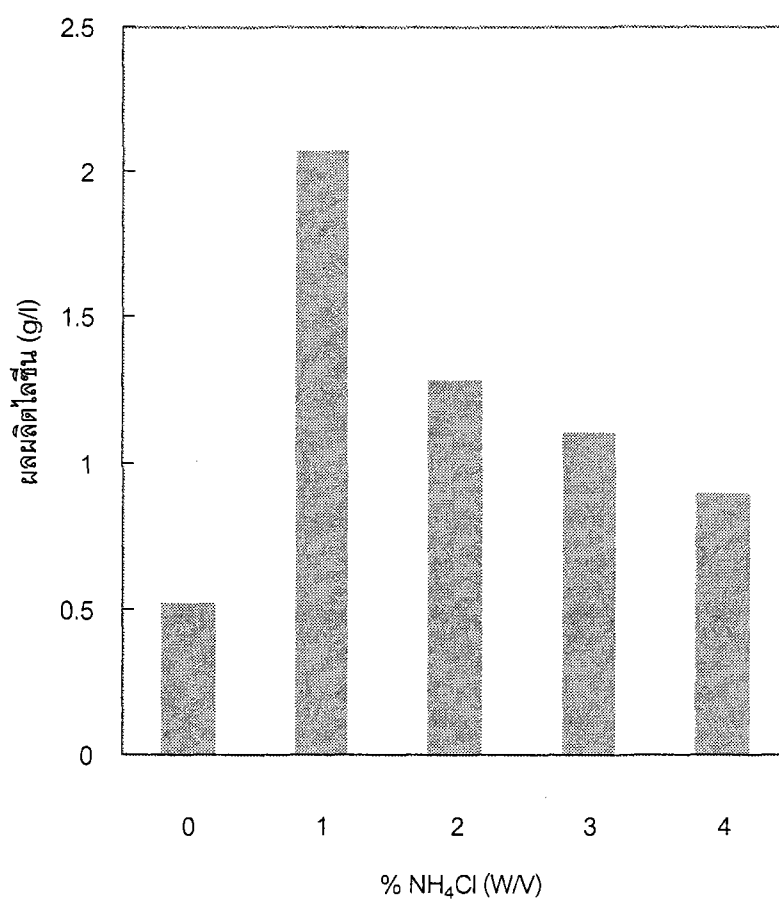
ภาพประกอบ 6 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย SK2M5N4 และปริมาณกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อใน PM ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ

4.2 ชนิดและปริมาณของแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน

จากการเลี้ยงแบคทีเรีย SK2M5N4 ใน PM ใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 5 % (W/V) โดยแปรผัน NH_4Cl ที่ความเข้มข้น 0-4 % (W/V) และแปรผัน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แทนปริมาณ NH_4Cl ที่ความเข้มข้นเดียวกัน บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าการใช้ NH_4Cl ที่ความเข้มข้น 1 % (W/V) จะให้ผลผลิตไลซีนดีที่สุด ดังตาราง 7 และภาพประกอบ 7 เมื่อเปลี่ยนมาใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แทน NH_4Cl พบว่าแบคทีเรีย SK2M5N4 มีการเจริญได้ดี แต่ผลผลิตไลซีนได้น้อยมาก ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้ NH_4Cl 1 % (W/V) เป็นแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน

ตาราง 7 ผลของ NH_4Cl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

% NH_4Cl (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	0.52
1	2.07
2	1.28
3	1.10
4	0.89

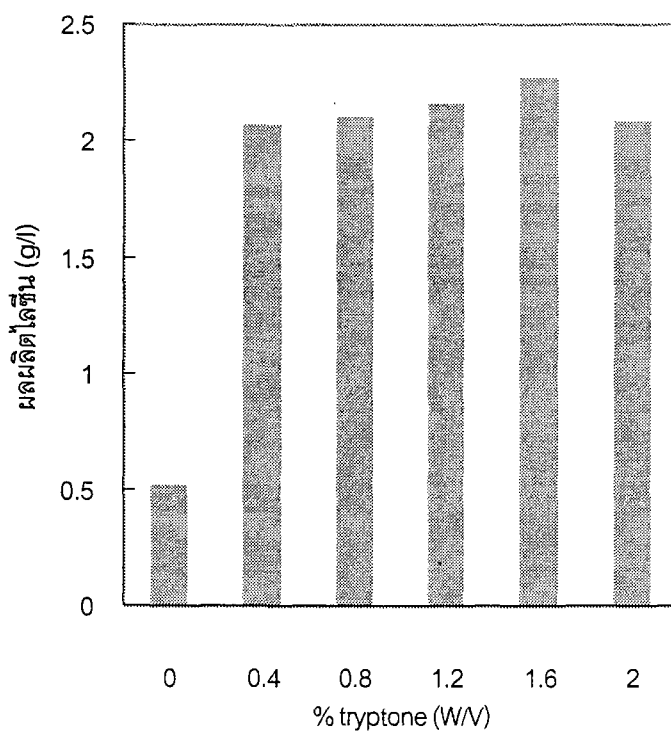


ภาพประกอบ 7 ผลของ NH_4Cl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

4.3 ชนิดและปริมาณสารประกอบอินทรีย์ในโตรเจน เมื่อใช้ tryptone และ yeast extract ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับ พบว่า tryptone ที่ความเข้มข้น 1.6 % (W/V) ให้ผลผลิตไลซีนได้ดีที่สุด ดังตาราง 8 และภาพประกอบ 8 และ yeast extract ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.15 % (W/V) ดังตาราง 9 และภาพประกอบ 9 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้ tryptone 1.6 % (W/V) และ yeast extract 0.15 % (W/V)

ตาราง 8 ผลของ tryptone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

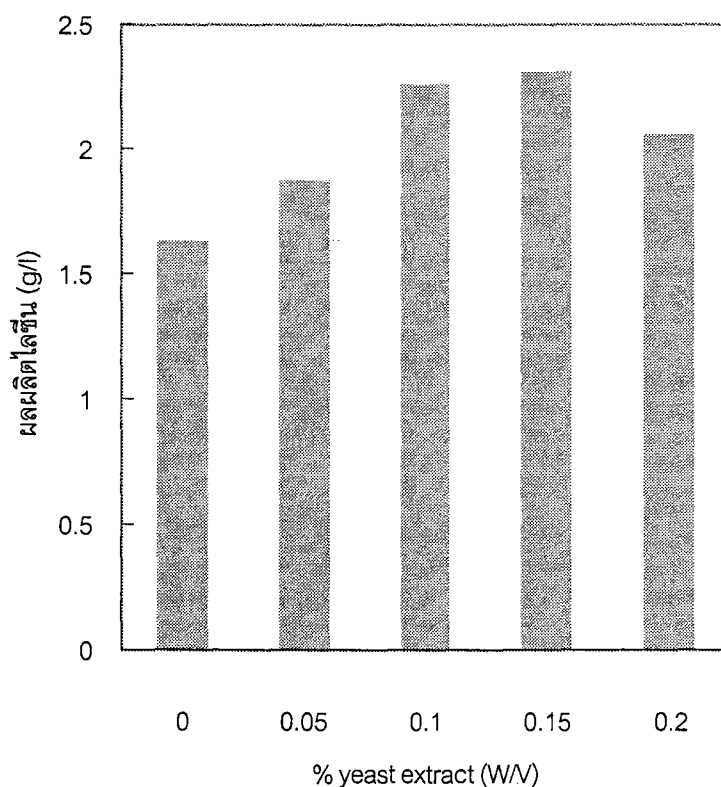
% tryptone (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	0.52
0.4	2.06
0.8	2.10
1.2	2.15
1.6	2.27
2	2.08



ภาพประกอบ 8 ผลของ tryptone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

ตาราง 9 ผลของ yeast extract ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน
ของแบคทีเรีย SK2M5N4

% yeast extract (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	1.63
0.05	1.88
0.1	2.26
0.15	2.31
0.2	2.06



ภาพประกอบ 9 ผลของ yeast extract ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน
ของแบคทีเรีย SK2M5N4

4.4 ชนิดและปริมาณเกลือแร่ แปรผันปริมาณเกลือแร่ชนิดต่างๆ ตามลำดับ
แล้วพบว่า

4.4.1 K_2HPO_4 ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนได้ดีที่สุดคือ 0.05 % (W/V)

4.4.2 KH_2PO_4 ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนได้ดีที่สุดคือ 0.05 % (W/V)

4.4.3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ จากปริมาณที่ทดลอง พบว่าเมื่อไม่เติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ จะให้ผลผลิตไลซีนดีที่สุด

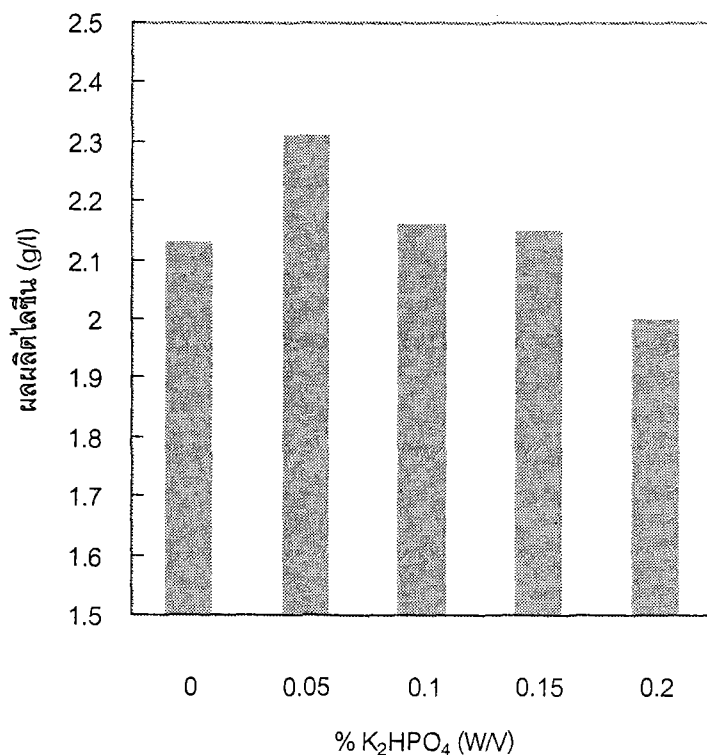
4.4.4 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนได้ดีที่สุดคือ 0.001 % (W/V)

4.4.5 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตไลซีนได้ดีที่สุดคือ 0.02 % (W/V)

ดังตาราง 10-14 และภาพประกอบ 10-14

ตาราง 10 ผลของ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

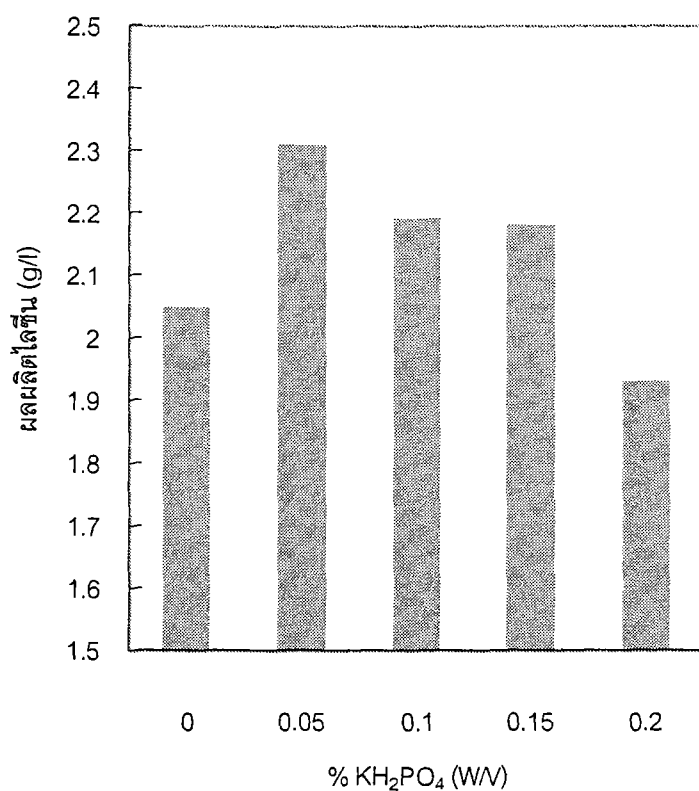
% K_2HPO_4 (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	2.13
0.05	2.31
0.1	2.16
0.15	2.15
0.2	1.96



ภาพประกอบ 10 ผลของ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

ตาราง 11 ผลของ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

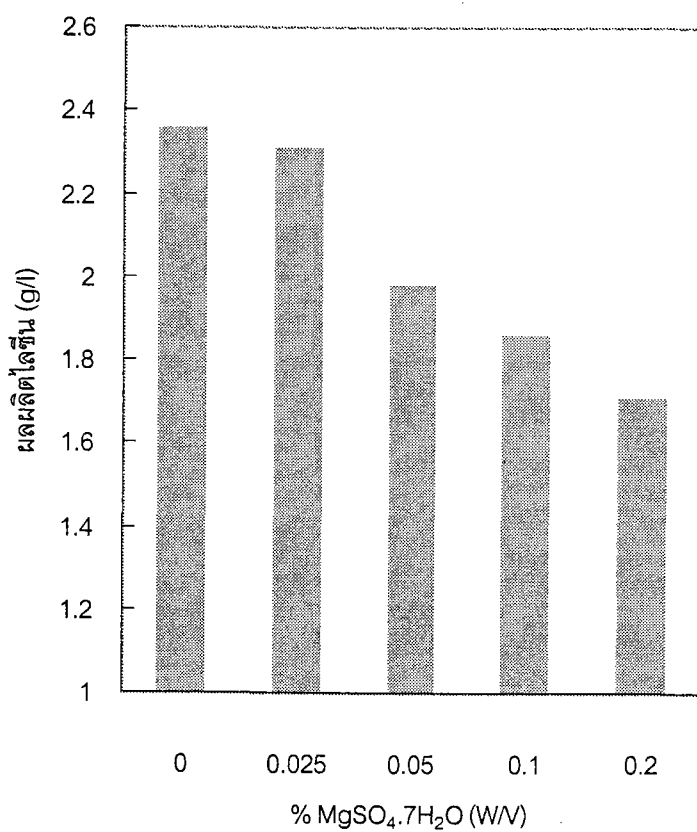
% KH_2PO_4 (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	2.06
0.05	2.31
0.1	2.19
0.15	2.18
0.2	1.93



ภาพประกอบ 11 ผลของ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

ตาราง 12 ผลของ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ
แบคทีเรีย SK2M5N4

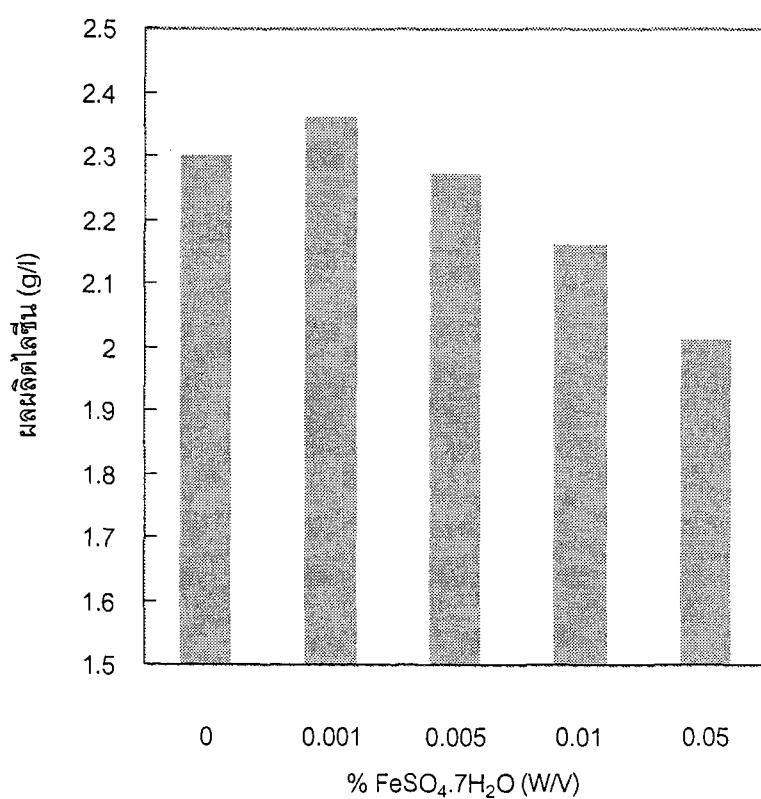
% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	2.36
0.025	2.31
0.05	1.98
0.1	1.86
0.2	1.71



ภาพประกอบ 12 ผลของ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ
แบคทีเรีย SK2M5N4

ตาราง 13 ผลของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ
แบคทีเรีย SK2M5N4

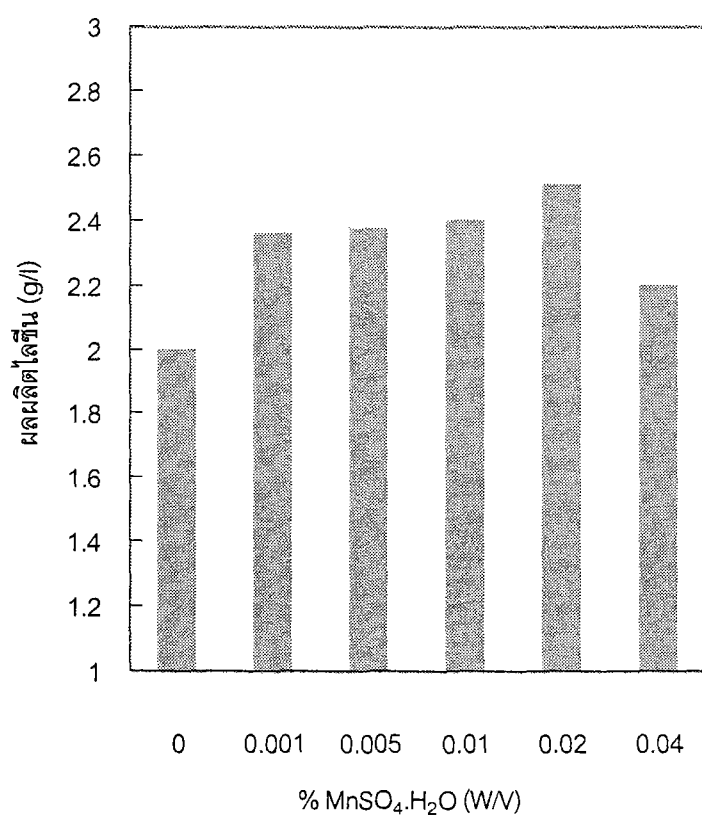
% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	2.30
0.001	2.36
0.005	2.27
0.01	2.16
0.05	2.01



ภาพประกอบ 13 ผลของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ
แบคทีเรีย SK2M5N4

ตาราง 14 ผลของ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ
แบคทีเรีย SK2M5N4

% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	2.00
0.001	2.36
0.005	2.37
0.01	2.40
0.02	2.51
0.04	2.20



ภาพประกอบ 14 ผลของ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ
แบคทีเรีย SK2M5N4

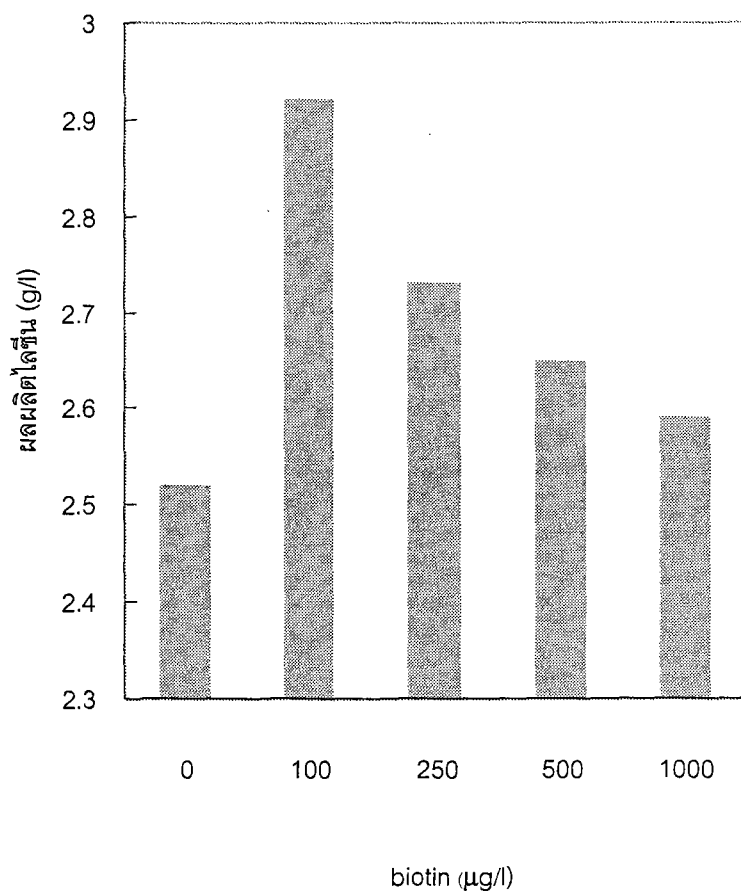
4.5 ชนิดและปริมาณวิตามิน

4.5.1 แปรผันปริมาณ biotin ความเข้มข้น 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/l}$

พบว่า biotin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/l}$ ให้ผลผลิตไลซีนดีที่สุด ดังตาราง 15 และภาพประกอบ 15

ตาราง 15 ผลของ biotin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

biotin ($\mu\text{g/l}$)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	2.53
100	2.92
250	2.73
500	2.65
1000	2.59



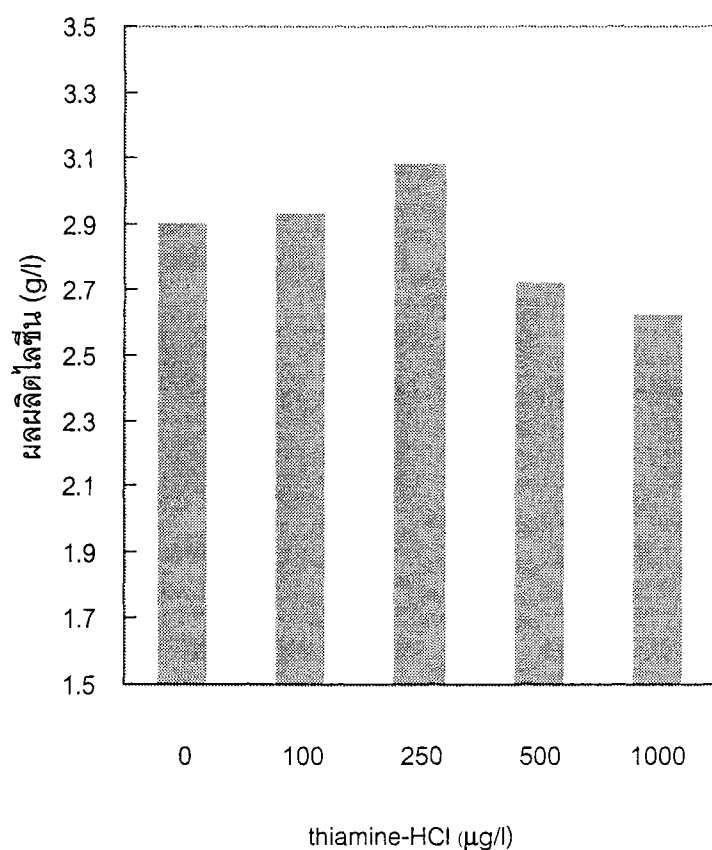
ภาพประกอบ 15 ผลของ biotin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย

SK2M5N4

4.5.2 แปรผันปริมาณ thiamine-HCl ความเข้มข้น 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/l}$ พบว่า thiamine-HCl ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/l}$ ให้ผลผลิตไลซีนดีที่สุด ดังตาราง 16 และภาพประกอบ 16

ตาราง 16 ผลของ thiamine-HCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4

thiamine-HCl ($\mu\text{g/l}$)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	2.90
100	2.93
250	3.08
500	2.71
1000	2.62



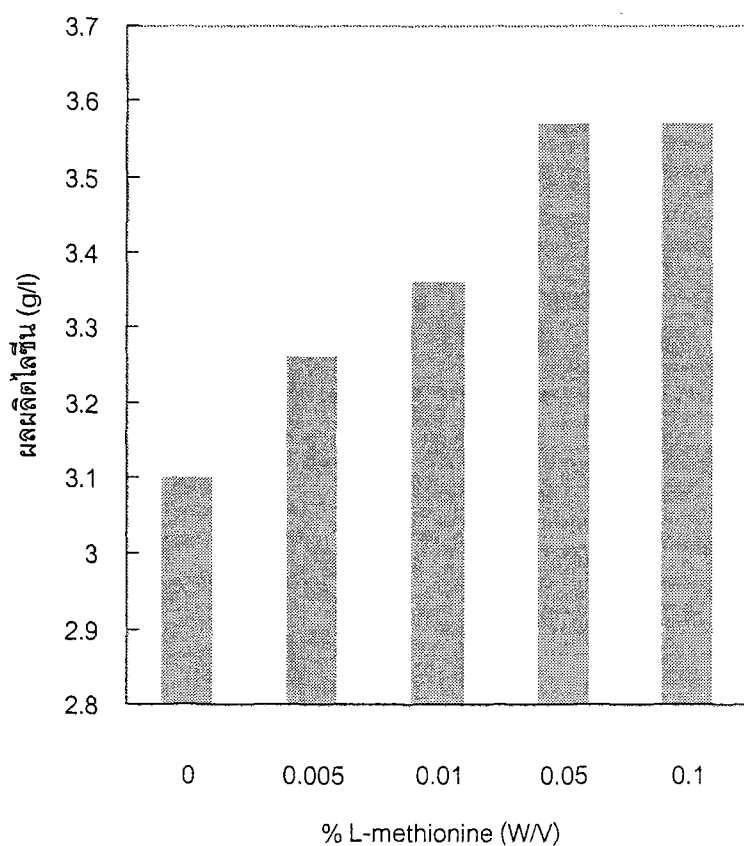
ภาพประกอบ 16 ผลของ thiamine-HCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4

4.6 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน

4.6.1 แปรผันปริมาณของ L-methionine ความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.05 และ 0.1 % (W/V) พบว่า L-methionine ความเข้มข้น 0.05 % (W/V) ให้ผลผลิตไลซีนได้ดีที่สุด ดังตาราง 17 และภาพประกอบ 17

ตาราง 17 ผลของ L-methionine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ
แบคทีเรีย SK2M5N4

% L-methionine (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	3.10
0.005	3.26
0.01	3.36
0.05	3.57
0.1	3.57

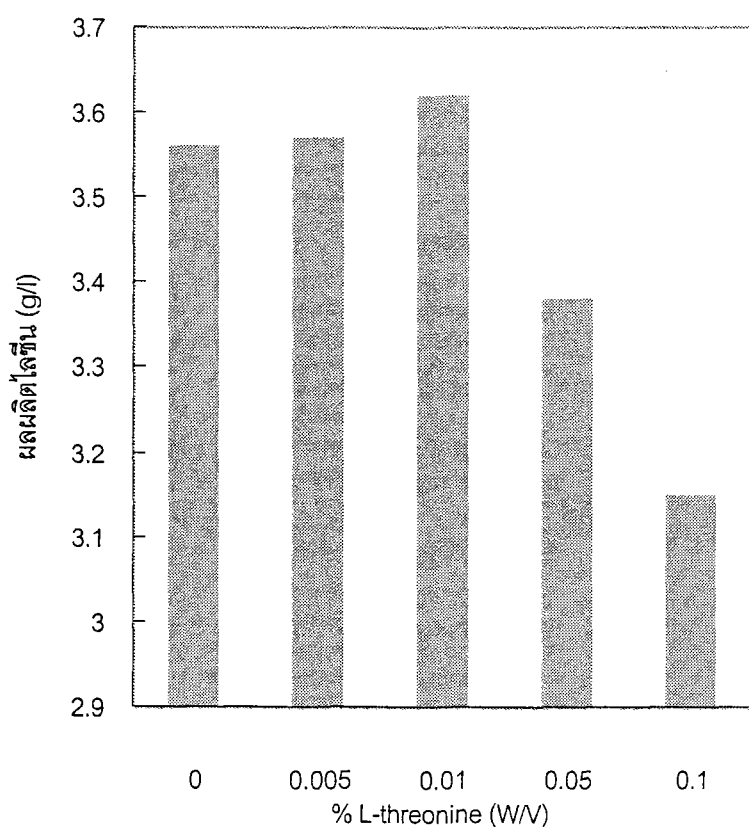


ภาพประกอบ 17 ผลของ L-methionine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ
แบคทีเรีย SK2M5N4

4.6.2 แปรผันปริมาณของ L-threonine พบว่า L-threonine ความเข้มข้น 0.01 % (W/V) ให้ผลผลิตไลซีนได้ดีที่สุดดังตาราง 18 และภาพประกอบ 18

ตาราง 18 ผลของ L-threonine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4

% L-threonine (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	3.57
0.005	3.58
0.01	3.62
0.05	3.38
0.1	3.15



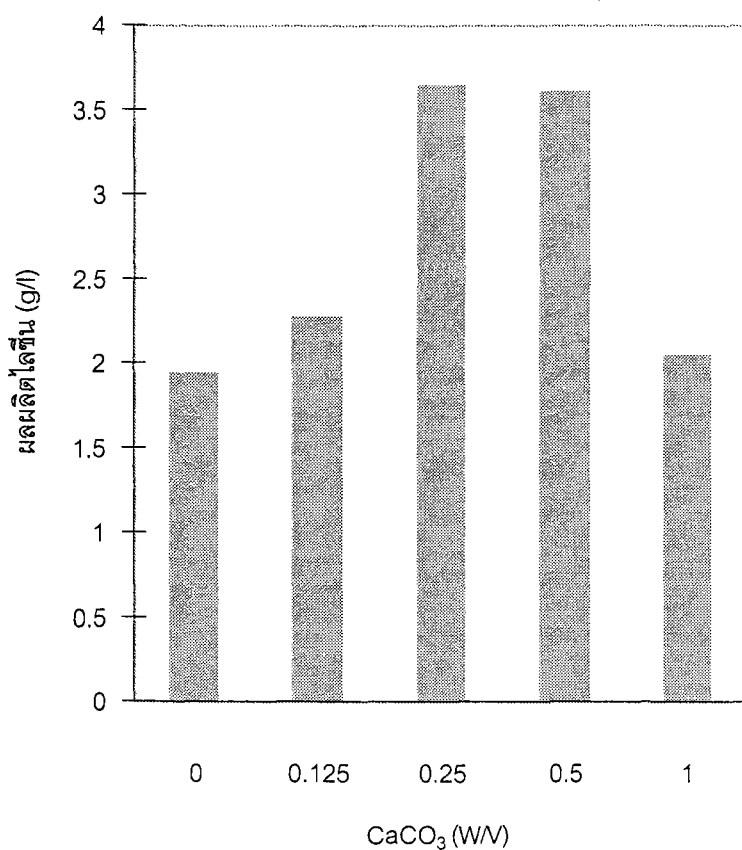
ภาพประกอบ 18 ผลของ L-threonine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4

5. การศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

5.1 กรด-ด่าง (pH) โดยปรับปริมาณสาร CaCO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรีย SK2M5N4 สามารถให้ผลผลิตไลซีนได้ดีที่สุดเมื่อใช้ CaCO_3 ที่ความเข้มข้น 0.25 % (W/V) ดังตาราง 19 และภาพประกอบ 19

ตาราง 19 ผลของ CaCO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

% CaCO_3 (W/V)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
0	1.94
0.125	2.27
0.25	3.64
0.5	3.61
1	2.05

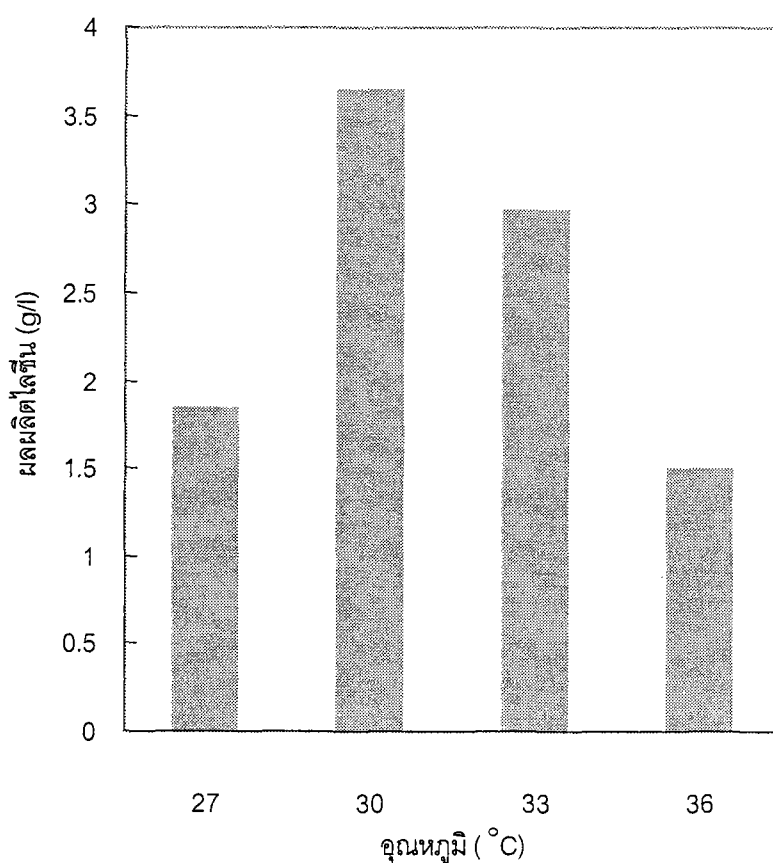


ภาพประกอบ 19 ผลของ CaCO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

5.2 อุณหภูมิ โดยปรับอุณหภูมิในการเลี้ยงแบคทีเรีย SK2M5N4 ในอาหาร PM ที่ปรับส่วนประกอบต่าง ๆ ได้เหมาะสมแล้ว พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไลซีน คือ 30 องศาเซลเซียส ดังตาราง 20 และภาพประกอบ 20

ตาราง 20 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

อุณหภูมิ (°C)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
27	1.84
30	3.64
33	2.97
36	1.50

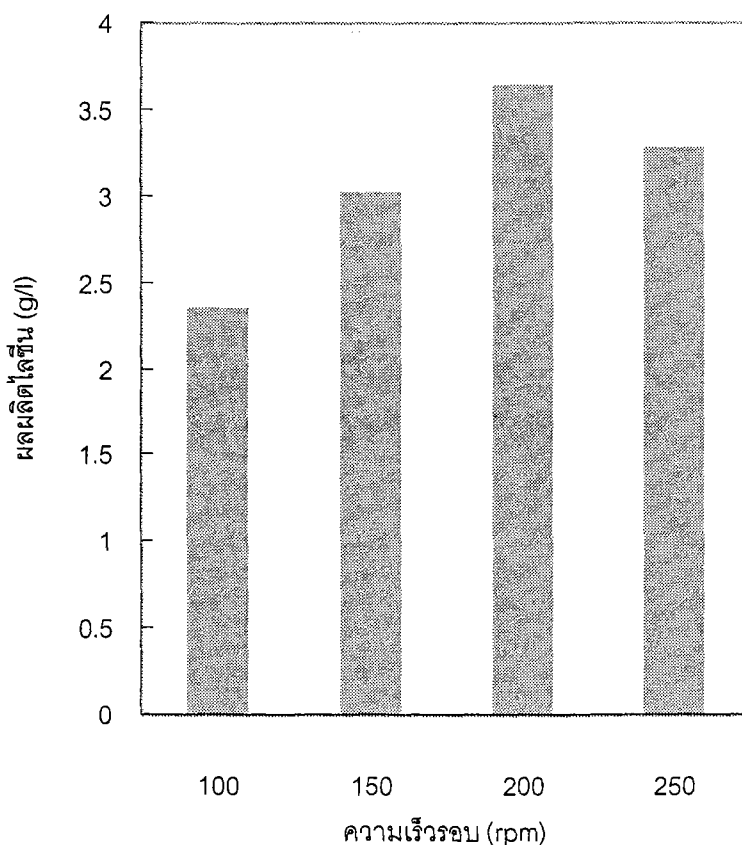


ภาพประกอบ 20 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

5.3 การให้อากาศ ปรับความเร็วรอบของเครื่องเขย่าในช่วง 100-250 รอบต่อนาที พบว่าความเร็วรอบที่เหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรีย SK2M5N4 สามารถผลิตไลซีนได้ดีที่สุด คือ 200 รอบต่อนาที ดังตาราง 21 และภาพประกอบ 21

ตาราง 21 ผลของการให้อากาศเมื่อใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของ แบคทีเรีย SK2M5N4

ความเร็วรอบ (rpm)	ผลผลิตไลซีน (g/l)
100	2.36
150	3.02
200	3.64
250	3.28



ภาพประกอบ 21 ผลของการให้อากาศเมื่อใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

จากผลการทดลองทั้งหมด สรุปได้ว่าแบคทีเรีย SK2M5N4 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 3.64 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้อาหาร optimized production medium ซึ่งมีส่วนประกอบต่างจากสูตรอาหารเริ่มต้น ดังแสดงในตาราง 22 โดยปมเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

ตาราง 22 ชนิดและปริมาณสารอาหาร และสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4 เปรียบเทียบกับสูตรอาหารเริ่มต้น

ส่วนประกอบ / สภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณเริ่มต้น	ปริมาณที่แปรผัน	ปริมาณที่เหมาะสม	ผลผลิตไลซีน (g/l)
glucose	10 %	2.5 - 10 %	5 %	2.07
NH ₄ Cl	1 %	0 - 4 %	1 %	2.07
tryptone	0.4 %	0 - 2 %	1.6 %	2.27
yeast extract	0.1 %	0 - 0.2 %	0.15 %	2.31
KH ₂ PO ₄	0.05 %	0 - 0.2 %	0.05 %	2.31
K ₂ HPO ₄	0.05 %	0 - 0.2 %	0.05 %	2.31
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.025 %	0 - 0.2 %	0 %	2.36
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001 %	0 - 0.05 %	0.001 %	2.36
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.001 %	0 - 0.04 %	0.02 %	2.51
biotin	-	0 - 1000 µg/l	100 µg/l	2.92
thiamine	-	0 - 1000 µg/l	250 µg/l	3.08
L-methionine	-	0 - 0.1 %	0.05 %	3.57
L-threonine	-	0 - 0.1 %	0.01 %	3.62
CaCO ₃	0.5 %	0 - 1 %	0.25 %	3.64
temp.	30 °C	27 - 36 °C	30 °C	3.64
rpm	200 rpm	100 - 250 rpm	200 rpm	3.64

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ผลการแยกแบคทีเรียโดยใช้อาหาร minimal medium จากดิน 30 ตัวอย่าง ที่เก็บจากจังหวัดพัทลุง และจังหวัดนครศรีธรรมราช ได้แบคทีเรียที่สร้างกรดอะมิโนได้จำนวน 93 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร production medium และทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอะมิโน โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ พบว่าได้แบคทีเรียที่ผลิตกรดอะมิโนที่มีค่า R_f เท่ากับ R_f ของไลซีนมาตรฐาน 30 ไอโซเลท และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณไลซีน พบว่าแบคทีเรียที่ให้ผลผลิตไลซีนได้ดี ได้แก่ แบคทีเรียรหัส P3, P10, P7, SK3 และ SK2 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 0.38, 0.46, 0.54, 0.58 และ 0.70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

แบคทีเรีย SK2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนได้สูงที่สุดนี้ แยกได้จากดินนาข้าวบริเวณหมู่บ้านไสกุน ตำบลป่าพะยอม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง มีลักษณะโคโลนีสีขาว เชลล์เป็นรูปท่อน ติดสีย้อมแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ได้ จัดอยู่ในจีนัส *Bacillus*

การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียรหัส SK2 โดยใช้รังสี UV วางเหนือจานเพาะเชื้อ 10 นิ้ว พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการผ่านรังสี UV คือ 3 นาที เชื้อมีอัตราการอยู่รอด 0.15-0.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโดยทั่วไปการคัดเลือกมิวแทนต์นิยมใช้เชื้อจากตัวอย่างที่มีอัตราการอยู่รอด 0.1 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากจำนวนเชื้อไม่มากเกินไปและมีแนวโน้มสูงที่จะพบเชื้อกลายพันธุ์ได้ เมื่อคัดเลือก Met+Thr auxotroph ที่ให้ผลผลิตไลซีนดีที่สุดไปผ่านรังสี UV ซ้ำอีก พบว่าได้ผลผลิตไลซีนสูงสุดจากเชื้อที่ผ่านรังสี UV ครั้งที่ 5 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 1.08 กรัมต่อลิตร ได้ให้รหัสเป็น SK2M5 และเมื่อนำเชื้อ SK2M5 มากระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคัดเลือก AEC^R ที่ให้ผลผลิตไลซีนดีที่สุดไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำโดยใช้ NTG ซ้ำอีก พบว่าเชื้อที่ผ่าน NTG ครั้งที่ 4 ผลิตไลซีนได้สูงสุด 1.56 กรัมต่อลิตร และให้รหัสเป็น SK2M5N4

การศึกษาผลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ production medium ต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ SK2M5N4 พบว่าได้ผลดังนี้

แหล่งคาร์บอน จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ SK2M5N4 ในอาหาร production medium ที่แปรผันกลูโคส 2.5-10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสมีผลต่อความสามารถในการผลิตไลซีนของเชื้อ เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้นต่ำหรือสูงเกินไป เชื้อจะผลิตไลซีนได้น้อย โดยเชื้อ SK2M5N4 จะผลิตไลซีนได้สูงสุด 2.07 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่เติมกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์

ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับที่ Samanta and Bhattacharyya (1991) ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Arthrobacter globiformis* เพื่อผลิตไลซีน

แหล่งไนโตรเจน จากการทดลองแปรผันชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ NH_4Cl หรือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 0-4% พบว่าเชื้อ SK2M5N4 สามารถเจริญได้ดีทั้งในอาหารที่ใช้ NH_4Cl และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่จะผลิตไลซีนได้น้อยมากในอาหารที่ใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งอาจเกิดเนื่องจาก SO_4^{2-} ไปยับยั้งการสังเคราะห์ไลซีนในเชื้อ SK2M5N4 ได้ เช่นเดียวกับรายงานของ Chatterjee and White (1982) ซึ่งพบว่าถ้าเลี้ยง *Bacillus megaterium* ในอาหารที่มี SO_4^{2-} ปริมาณสูงจะทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ไลซีนได้ สำหรับความเข้มข้น NH_4Cl ที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ SK2M5N4 คือ 1 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองแปรผันปริมาณสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน พบว่าถ้าไม่ใส่ tryptone และ yeast extract ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้เชื้อ SK2M5N4 ผลิตไลซีนได้น้อยลง แต่ถ้าใส่ tryptone และ yeast extract ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ผลิตไลซีนได้สูงขึ้น ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก tryptone และ yeast extract เป็นแหล่งของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ใน yeast extract ยังมีเกลือแร่และวิตามินอีกหลายชนิด (Halasz and Lasztity. 1991) ซึ่งอาจมีส่วนช่วยให้เชื้อเจริญและสร้างไลซีนได้ดีขึ้น สำหรับปริมาณของ tryptone และ yeast extract ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไลซีนของเชื้อ SK2M5N4 คือ 1.6 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งทำให้ผลิตไลซีนได้ 2.31 กรัมต่อลิตร

ชนิดและปริมาณเกลือแร่ จากการทดลองแปรผันชนิดและปริมาณเกลือแร่ในอาหาร production medium พบว่าเชื้อ SK2M5N4 จะผลิตไลซีนได้สูงสุดในอาหารที่มี KH_2PO_4 , K_2HPO_4 และ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.05, 0.05 และ 0.001 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับในสูตร production medium ของ Kinoshita and others (1958) แต่ความต้องการ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ เพิ่มขึ้นเป็น 0.02 เปอร์เซ็นต์ และถ้าไม่เติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ลงในอาหาร จะทำให้เชื้อผลิตไลซีนได้ดีขึ้น สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากการปรับสูตรอาหารที่ใช้ โดยเติม yeast extract ปริมาณเพิ่มขึ้น และใน yeast extract นี้ก็มีแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ เป็นส่วนประกอบอยู่หลายชนิด รวมทั้ง Mg (Halasz and Lasztity. 1991) ซึ่งอาจเพียงพออยู่แล้ว จึงไม่จำเป็นต้องเติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ลงในอาหารอีก และเมื่อเลี้ยงเชื้อ SK2M5N4 ในอาหารที่เติมเกลือแร่ในปริมาณที่เหมาะสมดังกล่าวมาแล้ว พบว่าจะผลิตไลซีนได้สูงขึ้นเป็น 2.51 กรัมต่อลิตร

ชนิดและปริมาณวิตามิน จากการศึกษาผลของ biotin และ thiamine ต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ SK2M5N4 โดยแปรผันความเข้มข้นในช่วง 0-1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าการเติม biotin และ thiamine ปริมาณที่เหมาะสมลงในอาหาร จะช่วยให้เชื้อผลิตไลซีนได้สูงขึ้น และเชื้อ SK2M5N4 จะผลิตไลซีนได้สูงสุด 2.93 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ biotin และ thiamine ความเข้มข้น 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณที่ใช้ใกล้เคียงกับที่ Coello and others (1992) ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลซีนจาก *Corynebacterium glutamicum*

ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน จากการศึกษาคผลของ L-methionine และ L-threonine ต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ SK2M5N4 โดยแปรผันในช่วง 0-0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า กรดอะมิโน ทั้งสองชนิดนี้ถ้าเติมในปริมาณที่เหมาะสม จะทำให้ได้ผลผลิตไลซีนสูงขึ้น การเติม L-methionine 0.05 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อผลิตไลซีนเพิ่มขึ้นมากเป็น 3.57 กรัมต่อลิตร และการเติม L-threonine 0.01 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้มีการผลิตไลซีนเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยเป็น 3.61 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อ SK2M5N4 เป็นมิวแตนท์ที่ต้องการ L-methionine และ L-threonine ดังนั้นถ้าเติมกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้ในปริมาณที่เหมาะสม จึงทำให้เชื้อเจริญและผลิตไลซีนได้มากขึ้น

การศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4 โดยการแปรผันปริมาณ CaCO_3 เพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง การปรับอุณหภูมิ และการปรับความเร็วรอบของเครื่องเขย่าเพื่อให้อากาศ พบว่าได้ผลดังนี้

การแปรผันปริมาณ CaCO_3 0-1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อ SK2M5N4 จะผลิตไลซีนได้สูงสุด 3.64 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มี CaCO_3 0.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับเมื่อใช้ CaCO_3 0.5 เปอร์เซ็นต์ (3.61 กรัมต่อลิตร) แต่ถ้าใช้ CaCO_3 น้อยหรือมากเกินไป ผลผลิตไลซีนจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อใช้ CaCO_3 น้อยเกินไป pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงต่ำถึง 5.0 ซึ่งอาจทำให้เชื้อเจริญได้ไม่ดี และเมื่อใช้ CaCO_3 มากเกินไปทำให้มี pH ประมาณ 6.8 ซึ่งแม้ว่าเชื้อจะเจริญได้ดี แต่อาจไม่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ SK2M5N4 เพราะในอาหารที่เติม CaCO_3 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มี pH ประมาณ 6.0 ใกล้เคียงกัน จะให้ผลผลิตไลซีนสูงกว่าอาหารที่มี pH เป็นกรดมากเกินไป หรืออาหารที่มี pH เป็นกลาง ซึ่งต่างจากเชื้ออื่น ๆ ที่มักจะผลิตไลซีนได้ดีในอาหารที่มี pH อยู่ในช่วงที่เป็นกลาง (Yamada and others. 1972)

อุณหภูมิ จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ SK2M5N4 ที่อุณหภูมิต่างกัน ตั้งแต่ 27-36 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อจะผลิตไลซีนได้สูงสุด 3.64 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไลซีนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ในการทดลองของ Coello and others (1992)

ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ SK2M5N4 บนเครื่องเขย่าความเร็วต่างกัน 100-250 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเพิ่มขึ้นเชื้อ SK2M5N4 จะผลิตไลซีนได้มากขึ้นตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากการผลิตไลซีนจะเกิดภายใต้สภาวะที่มีอากาศ อย่างไรก็ตามถ้าใช้ความเร็วรอบมากเกินไปก็จะทำให้ผลผลิตไลซีนลดลงได้ เชื้อ SK2M5N4 จะผลิตไลซีนได้สูงสุด 3.64 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เช่นเดียวกับที่ใช้ในการผลิตไลซีนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ในการทดลองของ Coello and others (1992)

จากผลการทดลองทั้งหมด สรุปได้ว่าแบคทีเรีย SK2M5N4 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 3.64 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร optimized production medium ที่มีส่วนประกอบดังนี้ คือ 5% glucose, 1% NH_4Cl , 1.6% tryptone, 0.15% yeast extract, 0.05% KH_2PO_4 , 0.05% K_2HPO_4 , 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 $\mu\text{g/l}$ biotin, 250 $\mu\text{g/l}$ thiamine, 0.05% L-methionine, 0.01% L-threonine, 0.25% CaCO_3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

ข้อเสนอแนะ

1. แบคทีเรียที่แยกได้และปรับปรุงสายพันธุ์ในการวิจัยครั้งนี้ ยังมีผลผลิตไม่สูงมากพอ ควรมีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำอีก เพื่อให้ได้ผลผลิตไลซีนสูงขึ้น
2. ควรศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลซีนในส่วนที่ยังไม่ได้ทำการศึกษา เช่น surfactant และ penicillin
3. ควรนำไปเพาะเลี้ยงในถังหมัก (fermenter) เพื่อจะได้สามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ดีกว่า ซึ่งอาจทำให้ได้ผลผลิตไลซีนสูงขึ้น
4. ควรศึกษาวิเคราะห์ชนิดแบคทีเรียให้ถึงระดับ species และศึกษาทางด้านพิษวิทยา (toxicology) ของเชื้อก่อนนำไปใช้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- 17 กำเนิด สุภณวงษ์. (2534). จุลชีวอุตสาหกรรม. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ๒๓ สมใจ ศิริโชค และคนอื่นๆ. (2541). การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลซีน.
รายงานการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2540. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ๒๔ สุวณี สุขเวช และคนอื่นๆ. (2540). แบคทีเรียพื้นฐาน. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล.
- Barrett, G.C. (1985). *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*. London :
Chapman and Hall.
- ๒๕ Burns, W.G. and Bottino, J.P. (1989). *The Science of Genetics*. New York : Macmillan.
- Chatterjee, P.S. and White, P.J. (1982). "Activities and Regulation of the Enzymes of
Lysine Biosynthesis in a Lysine-Excreting Strain of *Bacillus megaterium*,"
J. Gen. Microbiol. 128 : 1073-1081.
- Coello, N., Pan, J.G. and Lebeault, J.M. (1992). "Physiological Aspects of L-Lysine
Production : Effect of Nutrition Limitation on a Producing Strain of
Corynebacterium glutamicum," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38 : 259-262.
- Cremer, J., Eggeling, L. and Sahm, H. (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.
- Crociani, F.A. and others. (1991). "L-Lysine Production at 65°C by Auxotrophic-
Regulatory Mutants of *Bacillus stearothermophilus*," *J. Indus. Microbiol.* 8 : 127-
132.
- Crueger, W. and Crueger, A. (1984). "Strain Development," in *Biotechnology : a
Text book of Industrial Microbiology*. Sunderland : Sinauer Associates.
- ๘๕ Demain, A.L. and Solomon, N.A. (1985). *Biology of Industrial Microorganisms*. London :
Benjamin/Cummings.
- (1986). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington :
American Society for Microbiology.
- ๙๕ Devlin, M.T. (1997). *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. New York :
John Wiley & Sons.

- Gasparic, J. and Churacek, J. (1978). *Laboratory Handbook of Paper and Thin Layer Chromatography*. England : Elliss Horwood.
- 28 Halasz, A. and Lasztity, R. (1991) *Use of Yeast Biomass in Food Production*. Boston : CRP.
- Hartl, L.D. and Jones, W.E. (1998). *Genetics Principles and Analysis*. Boston : Jones and Bartlett.
- Hirose, Y. and Shibata, H. (1980). "Amino Acid Fermentation," *Biotechnol. Bioeng.* 22(1) : 115-125.
- Hollander, J.A. (1994). "Potential Metabolic Limitation in Lysine Production by *Corynebacterium glutamicum* as Revealed by Metabolic Network Analysis," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42 : 508-515.
- Jetten, M.S.K. and others. (1993). "Molecular Organization and Regulation of the Biosynthetic Pathway for Aspartate-Derived Amino Acid in *Corynebacterium glutamicum*," in *Industrial Microorganisms : Basic and Applied Molecular Genetics*. Washington : American Society for Microbiology.
- Kinoshita, S., Nakayama, K. and Kitada, S. (1958). "L-Lysine Production Using Microbial Auxotroph," *J. Gen. Appl. Microbiol.* 4(2) : 128-129.
- Kyriacou, A., Balis, C. and Typas, M.A. (1997). "Improvement of Lysine Production by Analog-Sensitive and Auxotroph Mutants of the Acetylene-Utilizing Bacterium *Gordona bronchialis* (*Rhodococcus bronchialis*)," *Appl. Biotechnol.* 66(3) : 281-289.
- 29 Miller, B.M. and Litsky, W. (1976). *Industrial Microbiology*. New York : McGraw-Hill.
- Motoyama, H. and others. (1993). "Amino Acid Production from Methanol by *Methylobaccillus glycogenes* Mutants : Isolation of L-Glutamic Acid Hyper-Producing Mutants from *M. glycogenes* Strains, and Derivation of L-Threonine and L-Lysine-Producing Mutants from Them," *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(1) : 82-87.
- Ohsumi, T. and others. (1994). "Selection and Breeding of Lysine Accumulating *Saccharomyces cerevisiae* as a Stable Source of Lysine in the Rumen," *Biosci. Biotech. Biochem.* 58(7) : 1302-1305.
- Peppler, H.J. and Perlman, D. (1979). *Microbial Technology*. London : Academy.
- Prescott, S.C. and Dunn, C.G. (1959). *Industrial Microbiology*. 3rd ed. New York : McGraw-Hill.

- Samanta, T.K. and Bhattacharyya, R. (1991). "L-Lysine Production by S-2-Aminoethyl-L- Cysteine-Resistant Mutants of *Arthrobacter globiformis*," *Folia. Microbiol.* (Praha). 36 (1) : 59-66.
- Schendel, F.J. and others. (1990). "L-Lysine Production at 50°C by Mutants of a Newly Isolated and Characterized Methylophilic *Bacillus* sp.," *Appl. Environ. Microbiol.* 56(4) : 963-970.
- Schrumpf, B., Eggeling, L. and Sahm, H. (1992). "Isolation and Prominent Characteristics of an L-Lysine Hyperproducing Strain of *Corynebacterium glutamicum*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37(5) : 566-571.
- Shio, I., Yoshino, H. and Sugimoto, S. (1990). "Isolation and Properties of Lysine-Producing Mutants with Feedback-Resistant Aspartokinase Derived from a *Brevibacterium flavum* Strain with Citrate Synthase and Pyruvate Kinase Defects and Feedback-Resistant Phosphoenolpyruvate Carboxylase," *Agric. Biol. Chem.* 54(12) : 3275-3282.
- Shvinka, J., Viesturs, U. and Ruklisha, M. (1980). "Yield Regulation of Lysine Biosynthesis in *B. flavum*," *Biotechnol. Bioeng.* 22 : 897-912.
- Stanbury, P.F. and Whitaker, A. (1984). *Principles of Fermentation Technology*. Oxford : Pergamon.
- Tosaka, O., Enei, H. and Hirose, Y. (1983). "The Production of L-Lysine by Fermentation," *Trends in Biotechnology.* 1(3) : 70-80.
- Voet, D. and Voet, J.G. (1990). *Biochemistry*. New York : John Wiley & Sons.
- 48 Yamada, K. and others. (1972). *The Microbial Production of Amino Acids*. Tokyo : Kodansha.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Minimal medium (MM)

ใช้เป็นอาหารสำหรับการแยกแบคทีเรียที่สร้างกรดอะมิโนได้จากดิน

(สนใจ คีรีโคค และคณะ. 2541) มีส่วนประกอบดังนี้

น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร
agar	15	กรัม
Mineral salt *	100	มิลลิลิตร
1M MgSO ₄ *	1	มิลลิลิตร
20% Glucose *	10	มิลลิลิตร

หมายเหตุ * แยกหนึ่งฆ่าเชื้อ

Mineral salt เตรียมโดยชั่ง K₂HPO₄ 10.5 กรัม, KH₂PO₄ 4.5 กรัม และ (NH₄)₂SO₄ 0.5 กรัม ละลายน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1M MgSO₄ เตรียมโดยชั่ง MgSO₄ .7H₂O 6.15 กรัม ละลายน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร

20% Glucose เตรียมโดยชั่ง Glucose 20 กรัม ละลายน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2. MM + Methionine +Threonine

ใช้สำหรับคัดเลือก Met, Thr auxotroph โดยมีส่วนประกอบของอาหารเป็นดังนี้
MM+Met, MM+Thr และ MM+Met+Thr

0.2% Met* เตรียมโดยชั่ง Met 0.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
(ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อ MM 100 มิลลิลิตร)

0.2% Thr* เตรียมโดยชั่ง Thr 0.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
(ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อ MM 100 มิลลิลิตร)

* หนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้

3. Nutrient agar (NA)

ใช้เป็นอาหารสำหรับการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และการเก็บเชื้อไว้เป็น stock มีส่วนประกอบดังนี้

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

4. Inoculum medium (IM)

ใช้เตรียม starter สำหรับการผลิตไลซีนใน production medium (สมใจ ศิริโชค และคณะ. 2541) มีส่วนประกอบดังนี้

Glucose	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
yeast extract	1.0	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
ละลายน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้	1000	มิลลิลิตร
pH	7	

5. Production medium (PM)

ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีน โดยดัดแปลงจากสูตรของ สมใจ ศิริโชค และคณะ. (2541) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Glucose*	100	กรัม
NH ₄ Cl	10	กรัม
Tryptone	4	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.5	กรัม
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.25	กรัม
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01	กรัม
MnSO ₄ . H ₂ O	0.01	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
CaCO ₃ **	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ (ยกเว้นกลูโคส และ CaCO₃) ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แบ่งบรรจุในฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ซึ่ง CaCO₃ ใส่ไว้แล้วฟลาสก์ละ 40 มิลลิลิตร

หมายเหตุ

* ชั่ง Glucose 100 กรัม ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร แยกหนึ่งขวดเชื้อมานำไปใช้ (ใช้ 10 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์)

** ชั่ง CaCO₃ 0.25 กรัมต่อฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์ปริมาณไลซีนโดยวิธี **paper chromatography** (Gasparic and Churacek. 1978 : ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์โดย สมใจ ศิริโชค และคณะ. 2541)

1.1 การเตรียมสารเคมี

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

1.1.2 สารละลายนินไฮดริน เตรียมโดยชั่งนินไฮดริน 5 กรัม ละลายใน acetone : absolute ethanol (อัตราส่วน 7 : 3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา

1.1.3 สารละลายไลซีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่ง ไลซีนไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

1.1.4 สารละลาย 0.005% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน 75% absolute ethanol เตรียมโดยชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 กรัม ละลายน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม absolute ethanol ลงไปให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา (ควรเตรียมให้พอใช้ในแต่ละครั้ง ไม่ควรเตรียมทิ้งไว้นานเพราะจะขึ้น ทำให้ค่า OD ที่วัดได้คลาดเคลื่อน)

1.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของไลซีน

1.2.1 กระดาษโครมาโตกราฟฟี Whatman No.1 ขนาด 25 x 40 เซนติเมตร ใช้ ดินสอขีดเส้นตรงเบาๆ ห่างจากขอบด้านล่างของกระดาษ 2 เซนติเมตร เว้นขอบกระดาษด้านซ้ายและขวาข้างละ 5 เซนติเมตร และแบ่งจุดบนเส้นตรงให้แต่ละจุดห่างกัน 1.5 เซนติเมตร วัดจากแนวเส้นตรงขึ้นไป 20 เซนติเมตร แล้วขีดเส้นตรงอีกเส้นหนึ่งโดยห่างจากขอบบนของกระดาษ 3 เซนติเมตร

1.2.2 หยดสารละลายไลซีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 ไมโครลิตร ในแต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ ตามลำดับ ลงบนจุดที่แบ่งไว้ในข้อ 1.2.1 เป่าให้แห้งด้วย dryer

1.2.3 นำไป run ใน chamber ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1.1 จนกระทั่งตัวทำละลายซึมผ่านกระดาษขึ้นไปถึงเส้นด้านบนซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง จึงนำกระดาษออกจาก chamber วางทิ้งไว้ให้แห้ง

1.2.4 นำกระดาษที่แห้งแล้วจากข้อ 1.2.3 มาชุบสารละลายนินไฮดรินให้ทั่ว ใน ถาดแก้ว แล้วยกออก และเปิดตู้ดูดควันทิ้งไว้ให้กระดาษแห้ง

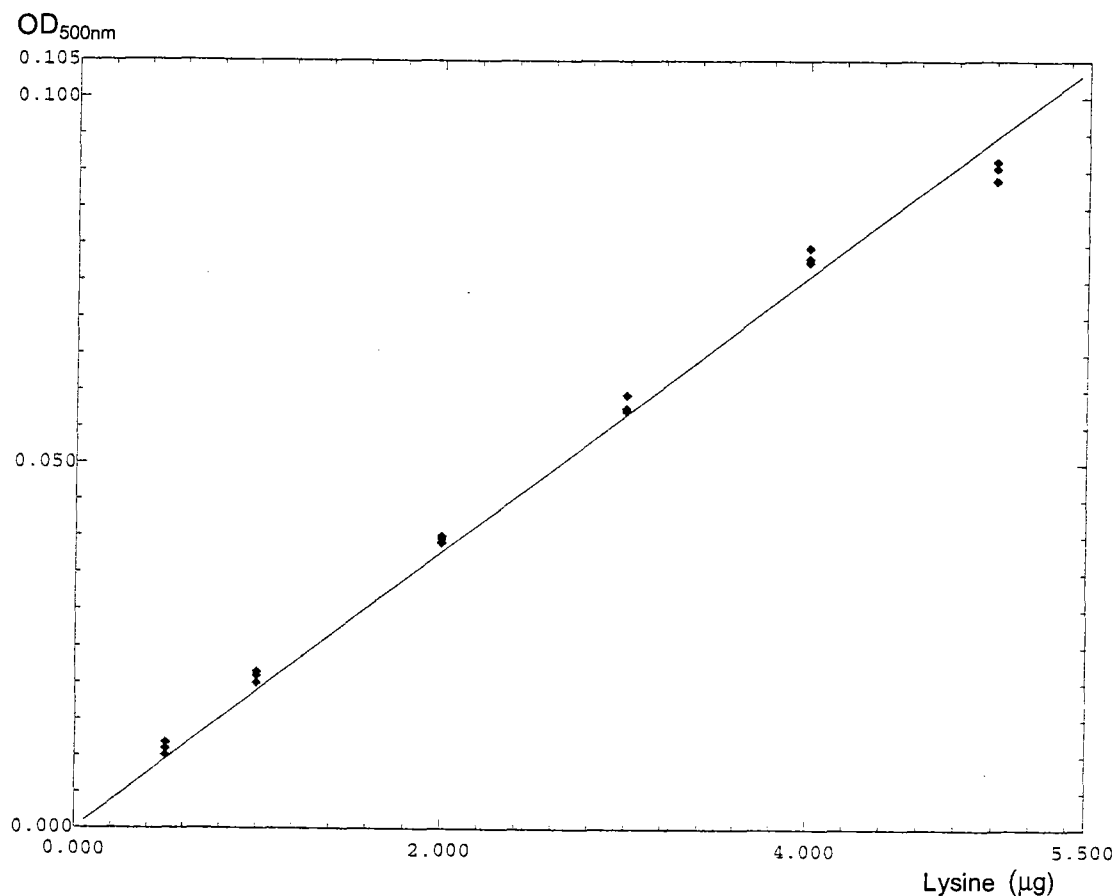
1.2.5 นำกระดาษไปอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นเป็นแถบสีม่วงเกิดขึ้นในบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่

1.2.6 วัดระยะทางที่กรดอะมิโนและตัวทำละลายเคลื่อนที่ เพื่อนำไปหาค่า retardation factor or ratio-to-front (R_f)

1.2.7 ตัดกระดาษบริเวณที่มีแถบสีม่วงเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย 0.005% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน 75% absolute ethanol ลงไป 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม เขย่าด้วย vortex mixer แล้วทิ้งไว้ 15 นาที

1.2.8 นำไปวัด OD ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง

1.2.9 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD ที่วัดได้กับปริมาณไลซีน



กราฟมาตรฐานของไลซีน

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไลซีนในตัวอย่าง

1.3.1 เตรียมกระดาษโครมาโตกราฟฟี เช่นเดียวกับข้อ 1.2.1

1.3.2 หยดตัวอย่าง 1-4 ไมโครลิตรต่อจุด (ขึ้นกับปริมาณไลซีนในตัวอย่าง ทำ 3 ซ้ำ)

1.3.3 นำไป run ใน chamber เช่นเดียวกับการ run ไลซีนมาตรฐาน

1.3.4 นำกระดาษออกจาก chamber ทิ้งไว้ให้แห้ง

1.3.5 นำกระดาษที่แห้งแล้วมาชุบสารอินไฮดรินให้ทั่วในภาชนะแก้ว แล้วยกออก และเปิดตู้ดูดควัน ทิ้งไว้ให้กระดาษแห้ง

1.3.6 นำกระดาษไปอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นเป็นแถบสีม่วงเกิดขึ้นในบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่ (ดังตัวอย่าง)

1.3.7 ตัดกระดาษบริเวณที่มีแถบสีม่วงซึ่งมีค่า R_f เท่ากับไลซีน ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย $0.005\% \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน $75\% \text{ absolute ethanol}$ ลงไป 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม เขย่าด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

1.3.8 นำไปวัด OD ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

1.3.9 คำนวณหาปริมาณไลซีนในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

แถบไลซีนมาตรฐาน (Standard lysine ; Std. Lys) $2 \mu\text{g}$

1 = แถบไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5

2 = แถบไลซีนของแบคทีเรีย SK2M6

3 = แถบไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N4

4 = แถบไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N5

5 = แถบไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N6

6 = แถบไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N7

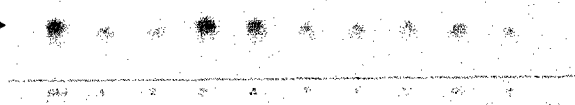
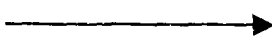
7 = แถบไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N8

8 = แถบไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N9

9 = แถบไลซีนของแบคทีเรีย SK2M5N10

Sample 1-9 spot $1 \mu\text{l}$

แถบไลซีน



ตัวอย่างแถบอะมิโน

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส (ด้วยวิธี DNS ; Bernfeld. 1955) มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

ก. การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

1. เตรียมกลูโคสความเข้มข้น 1 mg/ml เพื่อใช้เป็น stock solution โดยชั่ง anhydrous glucose 0.1 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml
2. เจือจาง stock ด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 0.2 - 1.0 mg/ml ดังนี้

ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/ml)	Stock solution (ml)	น้ำกลั่น (ml)
0.2	0.2	0.8
0.4	0.4	0.6
0.6	0.6	0.4
0.8	0.8	0.2
1.0	1.0	0.0

3. ใช้กลูโคสความเข้มข้นละ 1 ml ผสมกับ 0.1 % 3,5-dinitrosalicylic acid solution 1 ml (ทำ 3 ซ้ำ) สำหรับหลอด blank ใช้ น้ำกลั่น 1 ml
4. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วนำออกมาแช่ในอ่างน้ำเย็นทำให้เย็นทันที
5. เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml นำไปวัด OD ที่ 540 nm
6. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับความเข้มข้นของกลูโคส

ข. การหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่าง

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 1 ml (ทำ dilutionให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่จะวัดค่า OD หรือมีน้ำตาลไม่เกิน 1 mg/ml) ลงในหลอดทดสอบ
2. ปิเปต 0.1 % 3,5-dinitrosalicylic acid solution ลงไป 1 ml
3. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วนำออกมาแช่ในอ่างน้ำเย็นทำให้เย็นทันที
4. เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml นำไปวัด OD ที่ 540 nm
5. เปรียบเทียบค่า OD ที่ได้กับกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสในแต่ละตัวอย่าง

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวศรีอัมพร หนูกลับ
วัน เดือน ปี เกิด	14 เมษายน 2509
สถานที่เกิด	อ. ป่าพะยอม จ. พัทลุง
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	27/1-2 ถ. ประชาสงเคราะห์ 28 เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ 10310
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์ ระดับ 6
สถานที่ทำงานในปัจจุบัน	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2527	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนพัทลุง จังหวัดพัทลุง
พ.ศ. 2531	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงขลา
พ.ศ. 2544	กศ.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร